

eQTL ASOCIADOS CON LA DEPOSICIÓN Y COMPOSICIÓN DE LA GRASA EN EL MÚSCULO *GLUTEUS MEDIUS* PORCINO

Cánovas, A.¹, Pena, RN.², Gallardo, D.³, Amills, M.³ y Quintanilla, R.¹

¹IRTA. Genètica i Millora Animal. Av Rovira Roure, 191, 25198. Lleida.

²UdL. Departament de Producció Animal. Av Rovira Roure, 191, 25198. Lleida.

³UAB. Departament de Ciència Animal i dels Aliments. Bellaterra, 08193. Barcelona.
angela.canovas@irta.cat

INTRODUCCIÓN

En los últimos 20 años, ha habido importantes avances en el conocimiento de la base genética de caracteres relacionados con el metabolismo lipídico y la calidad de la carne en la especie porcina. El estudio del papel que juega la regulación génica en los procesos biológicos nos ofrece una nueva herramienta para profundizar en la comprensión de estos caracteres complejos (Tuggle et al., 2007).

Estudios realizados en la especie humana y en ratón (Wheeler et al., 2009; van Nas et al., 2010) indican que la expresión génica está modulada por múltiples *expression Quantitative Trait Loci* (eQTL) situados en *cis* y en *trans* (Cookson et al., 2009). En la especie porcina tan solo se han publicado un par de cartografiados parciales de eQTL para genes previamente seleccionados por su asociación con características del músculo (Ponsuksilli et al., 2008; Wimmers et al., 2010).

El objetivo del presente trabajo es detectar asociaciones entre eQTL reguladores de los niveles de ARNm en el músculo *gluteus medius* porcino y caracteres relacionados con la deposición de grasa intramuscular y la calidad de la carne en una población Duroc.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material animal. El material animal utilizado en el presente estudio procede de una población de 350 individuos de una línea comercial Duroc con alto contenido en grasa intramuscular. Con el objetivo de maximizar la posibilidad de encontrar eQTL reguladores de la expresión de genes relacionados con el metabolismo lipídico, se seleccionaron dos grupos de animales (N = 52 y 53) con fenotipos divergentes para una combinación de caracteres relacionados con la deposición de grasa y los niveles plasmáticos de lípidos (Cánovas et al., 2010).

Datos de expresión y normalización. Los datos de expresión de 105 muestras de músculo *gluteus medius*, correspondientes a 53 y 52 animales de los grupos con alto y bajo nivel de deposición de grasa, se obtuvieron utilizando la herramienta *GeneChip Porcine Genome Arrays* (Affymetrix). La normalización de los datos se realizó con el algoritmo gcRMA (Wu y col., 2004).

Análisis de eQTL. Un total de 6139 sondas que superaban una variabilidad mínima en los niveles de expresión de las muestras analizadas fueron incluidas en el estudio de eQTL. La detección de eQTL se realizó usando un panel de 110 microsatélites (Gallardo et al., 2008) mediante el software *GridQTL* (<http://www.gridqtl.org.uk/>). El modelo común utilizado fue:

$$y_{ijk} = \mu + b_i + l_j + \sum_{sire=1}^5 \alpha_{sire} p_k(sire) + \theta_{ijk}$$

donde: y_{ijk} es el dato de expresión del individuo k ; b_i es el efecto del lote de engorde (4 niveles); l_j es el efecto de laboratorio j (2 niveles); α es el coeficiente de regresión (efecto medio de sustitución alélica); p_k es la probabilidad de que el individuo k herede un alelo determinado de su padre común. Para determinar los umbrales de significación a nivel genómico se utilizó la corrección de Bonferroni.

Análisis ontológico y rutas metabólicas afectadas. Se realizó un análisis ontológico y de rutas metabólicas afectadas para clasificar desde una perspectiva funcional los genes *cis* y *trans* regulados, utilizando el paquete de herramientas bioinformáticas DAVID (Huang et al., 2009; <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>).

Concordancia posicional eQTL-QTL y estudio de la correlación expresión-fenotipo. Se realizó un estudio de concordancia posicional entre los eQTL reguladores de la expresión en músculo y los QTL previamente detectados para caracteres relacionados con la grasa

intramuscular y la calidad de la carne. También se calculó la correlación entre los niveles de expresión de los genes regulados y estos fenotipos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de eQTL permitió detectar 613 regiones significativamente (a nivel genómico) asociadas a la variación de la expresión génica en el músculo *gluteus medius*. Debido a la incompleta anotación del genoma porcino, únicamente 478 de los transcritos regulados por eQTL fueron mapeados, clasificándolos en 63 *cis*-eQTL (físicamente próximos al gen/transcrito diana) y 415 *trans*-eQTL (localizados lejos del gen/transcrito diana, normalmente en otro cromosoma). De los 478 eQTL, 127 estaban concentrados en 11 regiones genómicas (eQTL *hotspots*; Tabla 1) que parecen regular los niveles de expresión de un importante número de genes, varios de ellos funcionalmente relacionados con el metabolismo lipídico y la deposición de las grasas.

Tabla 1. Número y lista de genes regulados por las 11 regiones eQTL hotspot.

Posición (cM)	Genes regulados	Lista de genes regulados	QTL concordantes ¹
SSC1 (10)	11	ARPC1A, CBPG , CKS2, CLDND1, CXXC5, G3BP1, IGFBP5 , MYO6 , RBM25, THOC1, WDR70	AG ; Color (L*); HDL_sérico
SSC2 (122)	7	ACOT6 , EHD1 , UFD1L, SEC22B, FUCA1, ZNF236, C10orf28	--
SSC3 (24)	16	PPP1CB , LCMT1, MEPCE, WASL, CPEB4, TANK, EDEM3, RRM2B , RDX, KCNMB3, KDELR2, THUMPD1, CASD1, PLOD1, TRPM7, EMSP1	GIM ; AG ; Col_sérico;
SSC3 (30)	14	EHD1 , IGF1 , TRIB2, NNAT, VCP1P1, BDKRB1, GUSB, RBM39, SAP30, GATAD2A, DUSP7, EBAG9, EMD, FAM20C	HDL_sérico; ETD; %Magro
SSC5 (114)	16	PRKAG2, TRPM7, LYRM2, ALDH1L2, EIF3A, MCFD2, HNRNPH1, PRKAA2 , HIGD1A, AGRP, ISOC2, PSMC6, PRPF39, CYCS, THUMPD1	AG ;
SSC5 (124)	13	SLC5A1, TMEM44, CUL1, NGAP, APOBEC1 , NRXN1, HSD11B1, SF3B1, HMGB2, HRAS, MRPS18C, PFMK, TAF1D	ETD
SSC6 (66)	10	LRP6 , PAFAH1B3, GARS, KIAA1217, DR1, MTSS1, ARF3, LOC6, SIGLEC10, TM2D2	AG ;
SSC6 (124)	9	CEBPG , HRC, FST, MED10, TRIM44, RBM12B, HDGF2, SS18, CAST	AG ; %Magro
SSC7 (134)	14	ACACA , FABP5 , CKAP4, PDE7A, NADK, BAG3, PUS1, ACLY , SLC5A6, ZAN, CNKSR3, CLDN9, GPR160, PTPLB	GIM ; Color(L*); ETD; %Magro
SSC12 (88)	13	TAOK1, COL1A1, TMEM98, TRIP11, IGFBP6 , PAFAH1B3, C20orf79, OBFC1, CCDC39, TRIM27, FAM98C, CUX1, IL18BP	AG ; Color(a*)
SSC18 (40)	4	CYP24A1 , DNAJB6 , HOXA10 , TPPP3	AG (AGS); CE

¹ AG=perfil ácidos grasos; AGS: ácidos graso saturados; CE: Conductividad eléctrica; Col=contenido de colesterol; ETD=espesor tocino dorsal; GIM=contenido grasa intramuscular; HDL: Lipoproteínas de Alta Densidad.

El análisis de ontología génica (resultados no mostrados en tablas) de los genes regulados por los eQTL reveló una sobrerepresentación de términos GO relacionados con el metabolismo lipídico en general, y en particular con la síntesis y oxidación de los ácidos grasos, la actividad acetil-CoA carboxilasa, y el metabolismo de la glucosa, todas ellas funciones a su vez asociadas a los caracteres bajo estudio. El análisis de rutas metabólicas (Tabla 2) permitió también identificar varios genes, regulados en *cis* o *trans*, que formaban parte de rutas bioquímicas relacionadas con el metabolismo de lípidos y carbohidratos.

Paralelamente se realizó un análisis de concordancia posicional que evidenció 80 coincidencias entre los eQTL (66 *trans*-eQTL y 14 *cis*-eQTL) y QTL para caracteres de cantidad y composición de la grasa intramuscular identificados previamente en la misma población Duroc. Particularmente relevante se consideró la concordancia posicional con los eQTL *hotspots* (ver Tabla 1). Por su parte, las correlaciones (resultados no mostrados en tablas) evidenciaron algunas asociaciones significativas entre los niveles de expresión de los genes regulados por eQTL y los fenotipos estudiados, si bien en algunos casos esta asociación varió entre grupos de animales con perfiles divergentes para deposición de grasa

Tabla 2. Rutas metabólicas significativamente sobrerrepresentadas en la lista de los genes *cis* y *trans* regulados por los 478 eQTL detectados.

KEGG pathway name	Genes	Genes (n)	p-value
Hypertrophic cardiomyopathy	LAMA2, ITGA6, ITGAV, PRKAG2, IGF1, PRKAA1, PRKAA2, TTN, TGFB2	9	0.002
Adipocytokine signaling pathway	ACSL1, PRKAG2, PRKAA1, ACACB, PRKAA2, AGRP, IRS1, ACSL5	8	0.003
Aldosterone-regulated sodium reabsorption	HSD11B1, IGF1, NEDD4L, ATP1A2, IRS1	5	0.027
Bladder cancer	HRAS, MMP9, MDM2, CDK4, MMP1	5	0.029
Endocytosis	STAMBP, HRAS, DNM1L, TGFB1, RAB22A, SH3KBP1, ADRBK2, MDM2, NEDD4L, ZFYVE20, EHD1	11	0.034
Insulin signaling pathway	HRAS, PPP1R3B, PRKAG2, ACACA, PRKAA1, ACACB, PRKAA2, PPP1CB, IRS1	9	0.036
PPAR signaling pathway	ACSL1, SCD, MMP1, FABP5, ACOX3, ACSL5	6	0.044
Focal adhesion	LAMA2, CAV2, HRAS, ITGA6, PDGFA, TNC, ITGAV, IGF1, COL1A1, PPP1CB, PARVB	11	0.056
Cell cycle	YWHAZ, MAD2L1, CDC23, MDM2, CDK7, CDK4, CUL1, TGFB2	8	0.061
Pathways in cancer	HRAS, PDGFA, MMP9, TGFB1, IGF1, CDK4, MMP1, TGFB2, LAMA2, CCDC6, ITGA6, ITGAV, MDM2, TPR, GSTP1	15	0.076
TGF-beta signaling pathway	TGFB1, FST, ID4, BMP1B, CUL1, TGFB2	6	0.097

La combinación de los resultados anteriormente descritos permitió elaborar una lista de genes cuyos niveles de expresión y los eQTL-reguladores de los mismos podrían estar particularmente relacionados con la variación en caracteres relacionados con la deposición y la composición de la grasa muscular en la población Duroc analizada.

Agradecimientos: Proyectos financiados por el MICIIN (GEN2003-20658-C05-05 y AGL2007-66707-C02-01). Agradecemos a Dr. James M. Reecy (Iowa State University, USA), Dr. Juan F. Medrano y Dr. Gonzalo Rincón (University of California-Davis) su ayuda en la realización de los análisis estadísticos y David Almuzara su apoyo técnico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Cánovas et al. 2010. BMC Genomics 11:372-315 • Cookson et al. 2009. Nat. Rev. Genet. 10:184-94 • Gallardo et al. 2008. Anim. Genet. 39:205-6 • Huang et al. 2009. Acta Neurol. Taiwan 18:287-295 • Ponsuksili et al. 2008. BMC Genomics 9:367 • Tuggle et al. 2007. Int. J. Biol. Sci. 3:132 • van Nas et al. 2010. Genetics 185:1059 • Wheeler et al. 2009. PLoS Genet. 5:685 • Wimmers et al. 2010. Funct. Genom. 9:251-8 • Wu et al. 2004. Am. Stat. Asso. 99:909.

eQTL FOR LIPID STORAGE AND COMPOSITION IN THE *GLUTEUS MEDIUS* MUSCLE OF DUROC PIGS

In the present study, results from a genome-wide eQTL scan in the pig *gluteus medius* muscle of a Duroc population have been further analysed in order to detect associations to lipid metabolism and meat quality traits variation. The functional classifications revealed that lipid-related GO terms and pathways were amongst the most enriched in the list of eQTL-regulated genes. Subsequently, a positional concordance study between eQTL and QTL linkage maps, and a correlation analysis between phenotypes and expression levels have been carried out. These studies allowed us identifying genes whose expression levels and eQTL-regulators are expected to be directly related to the studied phenotypes. These results represent a first step towards understanding how gene networks and molecular mechanisms involved in lipid metabolism influence variation of meat quality traits in our population.

Key words: genetical genomics, pork quality, lipid metabolism.