

ESPECIFICIDAD DE PERFILES TRANSCRIPTÓMICOS PARA DIFERENTES TIPOS MUSCULARES EN BOVINO

Moreno-Sánchez, N¹., Carabaño, M. J., Rueda, J., Reverter, A., y Díaz, C.

¹INIA, Dpto. Mejora Genética Animal. Crta. de la Coruña km 7,2. 28040 Madrid, España
E-mail: natalia@inia.es

INTRODUCCIÓN

Uno de los mayores desafíos en la mejora de razas cárnicas consiste en identificar genes clave capaces de provocar cambios concretos y deseables tanto en la cantidad como en la calidad de la carne (Chang, 2007). La mayoría de estudios cuantitativos y moleculares que investigan el componente genético de los caracteres de calidad de carne se basan principalmente en características medidas sobre *M. Longissimus* (Burrow et al., 2001). Asumir que la selección en base a un músculo resultará en la mejora de la calidad de carne en la canal en su conjunto puede tener efectos perniciosos, dependiendo de cómo los genes involucrados en la calidad de ese músculo se comporten en el resto de músculos que componen la canal. Algunos trabajos muestran los perfiles transcriptómicos de diferentes tipos de músculos en bovino, cerdo o ratón (Sudre et al., 2005; Moreno-Sánchez et al., 2010; Bai et al., 2003; Wu et al., 2003). En estos estudios, se encuentran diferencialmente expresados en distintos músculos genes que codifican proteínas estructurales y enzimas metabólicas; así como genes mitocondriales o factores de transcripción entre otros. Otros grupos de genes, como ligandos para receptores de señales o genes relacionados con la matriz extracelular, sólo se encuentran diferencialmente expresados en algunos de estos trabajos, y sugieren especificidades bien de especie bien de tipo de músculo. Independientemente de sus funciones, se han identificado cambios en conectividad (Moreno-Sánchez et al. 2010) entre genes dependiendo del tipo muscular con respecto al patrón de co-expresión obtenido a partir de información de un amplio número de condiciones experimentales por Reverter et al. (2006). Estos cambios de conectividad afectaban a genes relacionados principalmente con la capacidad contráctil o aspectos metabólicos.

El objetivo de este trabajo es estudiar desde la perspectiva integradora de la biología de sistemas la expresión diferencial entre dos tipos musculares distintos en bovino, para profundizar en el conocimiento de los mecanismos que median en estas diferencias fenotípicas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los datos de partida son 207 genes diferencialmente expresados (113 sobreexpresados en el flexor y 94 en el psoas) en un experimento realizado con 40 microarrays, que comprenden dos tandas de 20 microarrays con diseños conectados. La primera tanda de 20 microarrays se utilizó en el estudio previo citado en la introducción (Moreno-Sánchez et al., 2010). En estos experimentos conectados se determinó la expresión diferencial entre dos músculos fenotípicamente distintos en terneros de la raza Avileña Negra Ibérica, los músculos fueron *Flexor digitorum* y *Psoas major*, que previamente habían sido caracterizados (Moreno-Sánchez et al., 2008) como un músculo oxidativo y otro mixto-glicolítico, respectivamente.

Partiendo de este conjunto de datos, se realizaron análisis de ontología y de enriquecimiento utilizando la "David database" (David.abcc.ncifcrf.gov) y el programa GOrilla (cbl-gorilla.cs.technion.ac.il), para explorar por un lado las principales funciones biológicas asociadas a los genes y por otro cuáles eran los términos de ontología/rutas más representados.

Con el objetivo de inferir los patrones de co-expresión entre los genes detectados se introdujo la lista en la base de datos de una red de co-expresión génica de bovino (Reverter et al., 2006), construida con experimentos que usaban la misma plataforma que la utilizada en este trabajo. Los genes sobre-regulados en un mismo músculo deberían presentar correlaciones positivas (ó nulas), mientras que la expresión entre músculos se espera que sea independiente o esté negativamente correlacionada. Los genes que no se comporten de

esta forma representan un cambio de conectividad en la presente comparación (psoas vs flexor) frente a las comparaciones utilizadas para construir la red.

Por último se exploraron los datos desde una perspectiva de biología de sistemas, utilizando el programa IPA (www.ingenuity.com) para situar los genes en su contexto biológico, de la manera más exhaustiva posible. El IPA integra información de otras bases de datos, proporciona las principales rutas, funciones biológicas y redes funcionales asociadas a los genes. El programa Founcoup (<http://founcoup.sbc.su.se>) se usó para predecir interactomas globales.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de los análisis de ontologías y enriquecimiento relacionan los genes sobre-expresados en el psoas, principalmente con procesos en los que interviene la glucosa, mientras que los grupos de genes sobre-expresados en el flexor están relacionados principalmente con la maquinaria ribosomal y las fibras musculares. Las diferencias de expresión entre estos dos tipos de músculos se centran principalmente en genes relacionados con el metabolismo, traducción y colágeno; y esta última parece ser una característica identificativa del flexor. De forma similar, el análisis de las rutas KEGG en las que median los genes diferencialmente expresados muestra glycolisis/gluconeogénesis, fosforilación oxidativa, metabolismo de fructosa y manosa o señalización de insulina del lado del psoas y adhesión de matriz celular o ribosoma del lado del flexor.

De la integración de la lista de genes en la red de co-expresión génica de Reverter et al. (2006) se obtuvo una matriz de más de 9.000 correlaciones en la que se podían identificar diferentes grupos de genes muy correlacionados (tanto positiva como negativamente) entre sí, dentro y entre músculo. Dichos grupos no eran atribuibles a una sola función biológica, sino que estaban constituidos por genes que median en numerosos y diferentes procesos. También se detectaron un número reducido de genes que no presentaban un patrón de correlación definido, sino que mostraban cierto grado de independencia. Los resultados más relevantes se centran en los cambios en conectividad que muestra la matriz. Los clusters de genes detectados que representan cambios en conectividad parecen contribuir al metabolismo oxidativo del músculo más glicolítico de la comparación (*Psoas*) y viceversa. Así, genes como TNNT1, MB o MEF2C pueden ser claves en la plasticidad muscular, y el incremento de su expresión en fibras musculares oxidativas o glicolíticas podría activar programas coordinados característicos de fibras alternativas. Estos resultados corroboran la idea de que las relaciones entre los genes no siempre son las mismas en los diferentes músculos (Moreno-Sánchez et al., 2010), los cambios detectados implican comportamientos diferentes de esos genes dependiendo del tipo de músculo. Queda establecer las implicaciones que puedan tener los cambios en conectividad en relación a las diferencias en calidad de carne entre ambos músculos.

Uno de los objetivos principales de la biología de sistemas es descifrar las redes de transcripción que gobiernan la expresión génica. En este experimento, se han encontrado un total de 7 reguladores transcripcionales diferencialmente expresados. Sorprendentemente, el interactoma generado a partir de ellos muestra como el gen CAPN1, que no está diferencialmente expresado y que ha sido asociado a la terniza en vacuno de carne (Casas et al., 2006) y/o contenido de grasa intramuscular en Japanese Black (Cheong et al., 2005), conecta los reguladores transcripcionales sobre-expresados en el flexor, lo que puede llevarnos al entendimiento de los mecanismos que expliquen la dureza del corte comercial del flexor, el morcillo. En estudio se ha encontrado que 9 de los genes analizados podrían estar involucrados en las diferencias encontradas en cuanto a caracteres de calidad (Díaz et al., 2006) relacionados con la grasa entre estos dos músculos, como perfil de ácidos grasos, grasa intramuscular o colesterol. Aunque de los genes relacionados con el consumo de ácidos grasos hay una mayor proporción que se sobre expresa en el flexor, los genes relacionados con procesos como biosíntesis o deposición de lípidos están similarmente representados en ambos músculos.

Los cambios en conectividad entre genes como consecuencia de los distintos tipos musculares parece que se confirman y afectan a un mayor número de funciones. A través del estudio funcional se han identificado genes que han sido previamente asociados a diferencias en calidad y que nos pueden permitir profundizar en las causas de las diferencias de calidad de carne entre músculos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bai, Q., McGillivray, C., da Costa, N., Dornan, S., Evans, G., Stear, M. J. & Chang, K.-C. 2003. *BMC Genomics* 4: 8
- Burrow, H. M., Moore, S. S., Johnston, D. J., Barendse, W. & Bindon, B. M. 2001. *Aus. J. Exp. Agr.* 41: 893-919
- Byrne, K. A., Wang, Y. H., Lehnert, S. A., Harper, G. S., McWilliam, S. M., Bruce, H. L. & Reverter, A. 2005. *J. Anim. Sci.* 83: 1-12
- Casas, E., White, S. N., Wheeler, T. L., Shackelford, S. D., Koohmaraie, M., Riley, D. G. Chase C. C., Johnson, Jr. D. D. & Smith, T. P. L. 2006. *J. Anim. Sci.* 84: 520-525
- Chang, K. C. 2007. *Animal* 1: 681-698
- Cheong, H. S., Yoon D.-H., Park, B. L., Lyounghyo Kim, L. H., Bae, J. S., Namgoong, S., Lee, H. W., Han, C. S., Kim, J. O., Cheong, I.-C. & Shin, H. D. 2008. *BMC Genetics* 9:3
- Díaz, C., Moreno-Sánchez, N., Moreno, A., Rueda, J. & Carabaño, M. J. 2006. En *Proc. XVI Congreso de Zootecnia*
- Hwang, D., Rust, A. G., Ramsey, S., Smith, J. J., Leslie, D. M., Weston, A. D., de Atauri, P., Aitchison, J. D., Hood, L., Siegel, A. F. & Bolouri, H. 2005. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 17296-17301
- Lehnert, S. A., Byrne, K., Wang, Y.-H., Natrass, G. S., Hudson, N. J. & Greenwood, P. L. 2007. *BMC Dev. Biol.* 7:95
- Moreno-Sánchez, N., Díaz, C., Carabaño, M. J., Rueda, J. & Rivero, J. L. 2008. *BMC Cell. Biol.* 9: 67
- Moreno-Sánchez, N., Rueda, J., Carabaño, M. J., Reverter, A., McWilliam, S., González, C. & Díaz, C. 2010. *Funct. Integr. Genomics* 10: 609-618
- Sudre, K., Cassar-Malek, I., Listrat, A., Ueda, Y., Leroux, C., Jurie, C., Auffray, C., Renand, G., Martin, P. & Hocquette, J.-F. 2005. *Meat Sci.* 70: 267-277
- Wang, Y.-H., Byrne, K. A., Reverter, A., Harper, G. S., Taniguchi, M., McWilliam, S., Mannen, H., Oyama, K. & Lehnert, S. A. 2005. *Mamm. Genome* 16:3 201-210.
- Wu, H., Gallardo, T., Olson, E. N., Williams, R. S. & Shohet, R. V. 2003. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 24: 587-592.

Agradecimientos: a la Asociación de Avileña-Negra Ibérica y al Consejo Regulador de Carne de Ávila por su ayuda en la recogida de muestras. Este trabajo ha sido financiado por el RTA-2007-0081.

AN INSIGHT INTO THE TRANSCRIPTOMIC PROFILES OF DIFFERENT SKELETAL MUSCLE TYPES IN CATTLE

ABSTRACT: While phenotypic differences between skeletal muscles have been described, the differential gene expression underlying them is largely to be elucidated. The goal of this study was to gain insight into the different transcriptomic profiles of two muscle types in cattle, a glycolytic and an oxidative one. Differentially expressed genes were analysed from a system biology perspective and connectivity changes across the skeletal muscle system were detected. Our results confirm the existence of a muscle dependent transcription and coexpression pattern. We argue that genes representing changes in connectivity may play key roles in muscle plasticity.

Keywords: differential expression, system biology, co-expression network, myofibre type.