

PERFIL TRANSCRIPCIONAL DE LA GLÁNDULA MAMARIA DURANTE LA LACTACIÓN Y EL SECADO EN CABRAS MURCIANO-GRANADINAS.

Guan¹, D., Mármol-Sánchez¹, E., Gracia-Luigi¹, M.,

Such², X., Jordana², J., Landi³, V., Martínez³, A., Delgado³, J.V. y Amills^{1,2}, M.

¹Centre de Recerca Agrigenòmica (CRAG), Consorci CSIC-IRTA-UAB-UB, Campus UAB, Bellaterra 08193. ²Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra 08193. ³Departamento de Genética, Universidad de Córdoba, Córdoba. marcel.amills@uab.cat

INTRODUCCIÓN

Los estudios de RNA-Seq realizados en bovino (Yang et al., 2016) y ovino (Suárez-Vega et al., 2015) han revelado que cientos de genes se expresan diferencialmente en la glándula mamaria al comparar los periodos de lactación y secado. Muchos de estos genes están relacionados con el metabolismo de proteínas y lípidos, la transducción de señales, la diferenciación de la glándula mamaria y la función inmune, siendo muy significativa la disminución de la expresión de los genes de las caseínas y proteínas del suero (Suárez-Vega et al., 2015; Yang et al., 2016). No obstante, el nivel de conocimiento sobre el perfil de expresión de ARNm de la glándula mamaria es relativamente escaso en cabras, habiéndose publicado un único estudio que comparó los transcriptomas mamaros de cabras que producen calostro versus leche (Crisà et al., 2016). El presente trabajo tiene como objetivo caracterizar la dinámica de la expresión génica durante la lactación en cabras de la raza Murciano-Granadina mediante el uso de un enfoque RNA-seq.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se recolectaron biopsias de tejido mamario (N = 21) de cabras Murciano-Granadinas en tres puntos temporales: T1 (60 días después del parto), T2 (210 días después del parto) y T3 (270 días, secado), tal como puede verse en la **Figura 1A**. El ARN se purificó de acuerdo a lo descrito por Cardoso et al. (2017, 2018). Se realizó una secuenciación "paired-end" del ARN en el Centro Nacional de Análisis Genómico (CNAG-CRG, <http://www.cnag.crg.eu/>). La calidad de secuenciación se evaluó con el software FastQC v0.11.7 (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). El programa TrimGalore 0.5.0 (https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/) se utilizó para eliminar los adaptadores de secuenciación, así como para suprimir lecturas de menos de 30 pb o con más de 5 posiciones ambiguas (Ns). Además, también se eliminaron 15 pb de ambos extremos de cada lectura. Las lecturas que pasaron este control de calidad se alinearon contra el genoma de referencia de cabra ARS1 (Bickhart et al., 2017) con el software HISAT2 (Kim et al., 2015, Pertea et al., 2016).

El programa StringTie se empleó para reconstruir transcritos potenciales a partir de las secuencias alineadas (Pertea et al., 2015; Pertea et al., 2016). Los niveles de expresión se cuantificaron a nivel de gen y de transcrito mediante el uso de un script Python (<https://ccb.jhu.edu/software/stringtie/dl/prepDE.py>). Los análisis de expresión diferencial se llevaron a cabo posteriormente utilizando el software DESeq2 (Love et al., 2014). Se consideró que existía expresión diferencial significativa para aquellos genes/transcritos en los que el *fold-change* (FC) > 1.5 y el q-valor < 0.05. La anotación funcional de los genes expresados diferencialmente (DE) se realizó mediante el uso de la plataforma DAVID Bioinformatics Resources 6.8 (Huang et al., 2008, 2009).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En total, se secuenciaron por separado 21 muestras que representan el inicio (T1) y el final (T2) de la lactación, así como el periodo de secado (T3), tal como puede verse en la **Figura 1A**. Se produjeron 100 Gb de datos de secuencia y más de 58 millones de lecturas para cada muestra. La tasa de alineamiento obtenida con el programa HISAT2 fue superior al 92% (Kim et al., 2015, Pertea et al., 2016). La similitud entre las muestras analizadas mediante el análisis de componentes principales (PCA, **Figura 1B**) evidenció que T3, que corresponde al periodo de secado, se diferencia claramente de T1 y T2, con la única excepción de un individuo (T3-22), que probablemente no fue secado con éxito (y por tanto se procedió a su

eliminación). También observamos una gran semejanza entre las muestras T1 y T2 a pesar del hecho de que representaban el inicio y el final de la lactación (**Figura 1B**).

Para comprender cómo evoluciona la expresión génica durante y después de la lactación, se realizaron análisis de expresión diferencial T1 vs T3 y T2 vs T3. El análisis de los datos con DESeq2 (Love et al., 2014) permitió identificar 1.348 (T1 vs T3) y 1.567 (T2 vs T3) genes expresados diferencialmente, así como 2766 (T1 frente a T3) y 2400 (T2 frente a T3) transcritos con expresión diferencial (**Figura 1C**). Asimismo, 414 genes y 1882 transcritos se ensamblaron *de novo* con StringTie (Pertea et al., 2015). Hemos observado que en T3 (secado) hay un aumento de la expresión de los genes relacionados con la vía de señalización AMPK (p.e. *PRKAG3*), siendo AMPK uno de los principales sensores de energía celular que se activa cuando hay un déficit de energía. También hemos detectado un incremento de la expresión de *PFKFB1*, que está regulada por AMPK y activa la glucólisis (Ros et al., 2013). Estos resultados son consistentes con el hecho de que durante el período de secado, las cabras se alimentan con una dieta rica en forraje y baja en energía. De hecho, hemos encontrado que en T3 el gen de la adiponutrina (*PNPLA3*) tiene una expresión bastante disminuida, un hallazgo consistente con estudios que indican que la actividad de este gen se reduce cuando hay escasez de alimentos (Huang et al., 2010). En paralelo, hemos encontrado que el secado de las cabras implica la desactivación de numerosas rutas biosintéticas. Por ejemplo, los genes lipogénicos *FASN* y *ACACA* están infra-expresados en T3, y también *SCD*, que es fundamental para la síntesis de ácidos grasos insaturados (Bernard et al., 2018). Otros genes relevantes con una expresión disminuida son *DHCR7*, que está involucrado en la biosíntesis del colesterol (Prabhu et al., 2017), *INSIG1*, que regula la homeostasis del colesterol (Janowski et al., 2002), *ACSS2*, que produce acetil-CoA (Mews et al., 2017), y *FA2H*, que participa en la síntesis de 2-hidroxiesfingolípidos (Alderson et al., 2004). También hemos detectado una reducción importante en la expresión de los cuatro genes de las caseínas, así como de *LALBA*, que es necesaria para la síntesis de lactosa. Finalmente, cabe destacar que la marcada disminución de la actividad anabólica de la glándula mamaria está acompañada por la reducción de la expresión de *CD36*, así como de numerosos genes pertenecientes a las familias *ATP-binding cassette transporters* y *solute carriers* (Bernard et al., 2018; Bionaz et al., 2008). Los transportadores de membrana son esenciales para la absorción de lípidos, aminoácidos y otras moléculas empleadas como sustratos en procesos biosintéticos, por lo que su infra-expresión probablemente contribuya a la importante reducción del anabolismo de la glándula mamaria que se observa durante el periodo de secado.

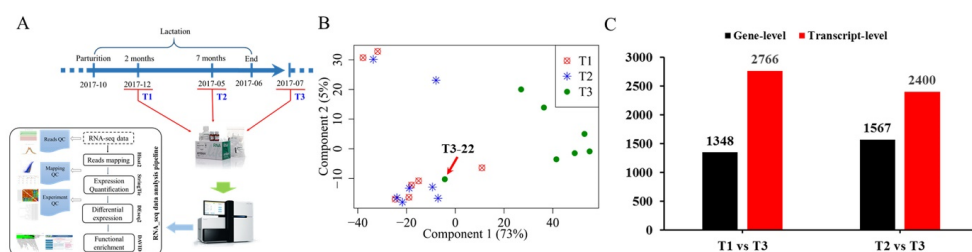


Figura 1. Protocolo experimental (A), evaluación de la similitud entre muestras mediante el análisis de componentes principales (PCA, B), y número de genes y transcritos diferencialmente expresados en T1-T3 y T2-T3 (C).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Bernard, L. et al. 2018. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 120(5): 1700039. • Bickhart, D. M. et al. 2017. *Nat Genet.* 49(4): 643-650. • Bionaz, M. et al. 2008. *BMC Genom.* 9(1): 366. • Cardoso, T. F. et al. 2017. *BMC Genom.* 18(1): 603. • Cardoso, T. F. et al. 2018. *BMC Genom.* 19(1): 145. • Crisà, A. et al. 2016. *BMC Vet. Res.* 12(1): 264. • Huang, D. W. et al. 2008. *Nat. Protoc.* 4(1): 44-57. • Huang, D. W. et al. 2009. *Nucleic Acids Res.* 37(1): 1-13. • Huang, Y. et al. 2010. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107(17): 7892-7897. • Janowski, B. A. 2002. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99(20): 12675-12680. • Kim, D. et al. 2015. *Nat. Methods* 12(4): 357-360. • Love, M. I. et al. 2014. *Genome Biol.* 15(12): 550. • Mews, P. et al. 2017. *Nature* 546: 381. • Perteau, M. et al. 2015. *Nat. Biotechnol.* 33: 290. • Perteau, M. et al. 2016. *Nat. Protoc.* 11(9): 1650-1667. • Prabhu, A. V. et al. 2017. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 165: 363-368. • Ros, S. et al. 2013. *Cancer Metab* 1(1): 8. • Suárez-Vega, A. et al. 2015. *Sci. Rep.* 5: 18399. • Yang, J. et al. 2016. *Animal Genet.* 47(2): 174-180.

Agradecimientos: este proyecto ha sido financiado mediante el proyecto AGL2016-76108-R otorgado por el Ministerio de Economía y Ciencia (MINECO). Dailu Guan fue financiado con una beca de doctorado del China Scholarship Council (CSC). Emilio Mármol-Sánchez fue financiado con un contrato FPU (FPU15/01733). María Gracia-Luigi recibió un contrato FPI del MINECO (BES-2017-079709). Nuestro especial reconocimiento a todo el personal del Servei de Granges i Camps Experimentals de la UAB, y especialmente al Dr. José Luis Ruiz de la Torre Casañas, por toda su valiosa ayuda durante la recolección de biopsias mamarias.

TRANSCRIPTIONAL PROFILE OF MAMMARY GLAND TISSUE DURING THE LACTATION AND DRY OFF PERIODS IN MURCIANO-GRANADINA GOATS

ABSTRACT: The study presented here aimed to characterise the gene profile of the caprine mammary gland during lactation by RNA Sequencing. Biopsies of mammary tissue (N = 21) were collected at three lactation points representing 60 days (T1), 210 days (T2) and 270 days (T3, dry period) after parturition. The analysis of expression data revealed 1,348 (T1 vs T3) and 1,567 (T2 vs T3) differentially expressed (DE) hits at the gene-level, as well as 2766 (T1 vs T3) and 2400 (T2 vs T3) DE hits at the transcript-level by employing the HISAT2-StringTie-DESeq2 pipeline. Functional annotation of DE genes captured terms linked to the synthesis of milk components, such as steroid biosynthesis, lipid biosynthesis and milk proteins. Our results indicate that the reduction of energy supply during the dry period involves an activation of the AMPK signalling pathway and a shutdown of anabolic processes in the mammary gland.

Keywords: mammary gland, lactation, differential expression, goat