

REGULACION POSTRANSKRIPCIONAL DE LOS ALELOS A Y E DEL GEN DE LA CASEINA α_{s1} CAPRINA

Marta Jansà Pérez^a, Patrice Martin^b, Armand Sánchez Bonastre^a

^aUnitat de Genètica i Millora, Departament de Patologia i Producció Animals, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra.

^bLaboratoire de Génétique biochimique et de Cytogénétique, Bâtiment 440, Institut National de la Recherche Agronomique, 78352 Jouy-en-Josas, France.

INTRODUCCION:

El gen de la caseína α_{s1} (α_{s1} -Cn) caprina se caracteriza por un extensivo polimorfismo representado por al menos siete alelos autosómicos: A, B, C, D, E, F y 0 (alelo nulo). Existe una correlación entre variante alélica y contenido de α_{s1} -Cn en leche, con un rango de variación de 0 a 7.2 g/l, según el genotipo del animal (1). Tres variantes (A, B y C) están asociadas a un alto nivel de α_{s1} -Cn (3.6 g/l) por alelo, mientras que para la variante E intermedia el contenido es sólo 1.6 g/l y para F y D 0.6 g/l. La secuencia proteica de la variante E se distingue de las de elevado contenido por sustituciones aminoacídicas (2).

La reducción en la tasa proteica para el alelo E se encuentra correlacionada con un menor contenido en ARNm en glándula mamaria lactante, de tal forma que el ARNm α_{s1} -Cn E es tres veces menos abundante que el ARNm α_{s1} -Cn A en individuos heterocigotos A/E (3).

Estudios del alelo E realizados a nivel genómico han permitido la caracterización de una inserción de 457 pb localizada en el último exón del gen, que corresponde a casi la totalidad de la región 3' no codificante (3' UTR). Se trata de un elemento LINE incompleto, insertado en el gen de la α_{s1} -Cn caprina en orientación inversa, de tal forma que la cola de poly A del retroposón se presenta en este caso en forma de larga serie de T, sólo interrumpida por algunas A (3).

La 3' UTR de los ARNm ha sido descrita como una región determinante de la estabilidad y el inicio de traducción (4, 5), de tal forma que la presencia de secuencias ricas en A y U en esta región confiere una reducción de la vida media de algunos ARNm (6, 7). La secuencia consensus descrita (5'AUUUA), así como varios motivos ricos en A y U, se hallan presentes en el elemento LINE del alelo α_{s1} -Cn E. En este sentido, este elemento podría originar la reducción de la α_{s1} -Cn en leche mediante una desestabilización del ARNm. Este es el objeto de análisis de este estudio utilizando transfecciones transitorias en cultivos de células heterólogos.

MATERIAL Y METODOS:

Las construcciones se realizaron en un plásmido de expresión eucariota por introducción del ADNc completo de la α_{s1} -Cn para los alelos A y E bajo el control del promotor constitutivo de Citomegalovirus

(construcciones CMV.A y CMV.E). A partir de estos clones, la región codificante de la α_{s1} -Cn fue remplazada por la región correspondiente del ADNc de la hormona de crecimiento humana (hGH) de tal forma que en estas construcciones híbridas se conserva la 3' UTR de los alelos A y E de la α_{s1} -Cn (plásmidos CMV.hGH.A y CMV.hGH.E).

Células Cos-7 fueron cultivadas en DMEM suplementado con un 10% de suero fetal bovino, 2mM L-glutamina y 10 μ g/ml penicilina/streptomina.

Las transfecciones transitorias fueron realizadas por el método de precipitación en fosfato de calcio con shock glicerol (8). Las células y los medios de cultivo fueron recolectados 72 h después de la transfección.

Para la detección de la α_{s1} -Cn sintetizada se utilizó la técnica de Western blot, mientras que la hGH secretada al medio fue cuantificada mediante un método ELISA sandwich.

ARN totales fueron purificados de las células en cultivo utilizando RNazol™ B (Biotecx) y analizados por Northern blot (9). Las sondas utilizadas fueron el ADNc α_{s1} -Cn A completo o bien la región codificante del ADNc de la hGH (según las construcciones transfectadas) marcadas por "random primer" con [α -32P]dCTP.

El bloqueo de la transcripción en células transfectadas de forma transitoria se llevó a cabo según el protocolo descrito en (10), con una concentración de 10 μ g/ml de Actinomicina D en el medio de cultivo. Posteriormente se realizaron extracciones de ARN totales a diferentes tiempos.

RESULTADOS Y DISCUSION:

Para analizar con detalle los mecanismos que intervienen en la reducción del ARNm y proteína para el alelo E, se han realizado estudios de expresión transitoria y de bloqueo de la transcripción en sistemas de células Cos-7, utilizando el alelo A como referencia.

Expresión transitoria:

Mediante transfección transitoria de las construcciones CMV.A y CMV.E se han obtenido diferencias cuantitativas a nivel de ARNm, que reproducen las observadas en glándula mamaria lactante para los dos alelos. La proteína (α_{s1} -Cn) sintetizada, tanto en la fracción intracelular como en la secretada al medio, no ha podido ser detectada por técnicas de Western blot, debido probablemente a una cantidad demasiado reducida de la misma.

Las construcciones CMV.hGH.A y CMV.hGH.E nos permiten observar el efecto directo de la 3' UTR del alelo E sobre la expresión de un gen reporter como el de la hGH. Además, se trata de una proteína igualmente secretada al medio y cuantificable mediante una técnica ELISA, altamente sensible. La expresión transitoria de estas construcciones muestra una reducción equivalente de los ARNm para la construcción CMV.hGH.E, demostrando que el efecto del elemento LINE insertado se produce también sobre un gen reporter. La cantidad de hGH secretada al medio también es inferior para la construcción con el alelo E que con la correspondiente al alelo A, aunque las diferencias observadas aquí no son tan importantes como a nivel de transcritos ni como a nivel de proteína en leche. La obtención de más datos

correspondientes a la proteína secretada es necesaria para la confirmación de estos resultados.

Vida media de los ARNm A y E:

Para analizar posibles diferencias en la estabilidad de los ARNm de estos dos alelos, se han realizado experimentos de bloqueo de la transcripción 48 h después de la transfección transitoria de las construcciones híbridas CMV.hGH.A y CMV.hGH.E. La cinética de desaparición de los dos tipos de ARNm parece muy similar, resultado que no nos permite afirmar la existencia de diferencias en la estabilidad. Sin embargo, es posible que los periodos estudiados sean demasiado reducidos para observar un degradación diferencial de los transcritos, que son conocidos como muy estables en las células epiteliales de glándula mamaria en lactación. Además, cabe considerar que las células utilizadas para el estudio (Cos-7, línea proveniente de riñón de simio), son muy distantes de las del tejido donde normalmente se expresan estos genes, y el efecto de posibles factores proteicos específicos que podrían tener un papel principal en la vida media de los ARNm α_1 -Cn no puede ser en este caso detectado.

Tampoco podemos descartar un posible efecto de la inserción en el último exon del alelo E a nivel de la tasa de transcripción del gen, que se produciría igualmente en los experimentos de transfección transitoria, a pesar de que el promotor es el mismo para las dos construcciones comparadas. Diferencias transcripcionales podrían también producirse como consecuencia de mutaciones a nivel del promotor de los alelos A y E. Esta última posibilidad está siendo estudiada por análisis de la secuencia nucleotídica de los dos promotores a nivel genómico.

BIBLIOGRAFIA:

- (1) Grosclaude, F., Mahé, M.F., Brignon, G., Di Stasio, L. & Jeunet, R. Génét. Sél. Evol. 19 (1987) 399-412.
- (2) Brignon, G., Mahé, M.F., Grosclaude, F. & Ribadeau Dumas, B. Protein Seq. Data Anal. 2 (1989) 181-188.
- (3) Jansà Pérez, M., Leroux, C., Sánchez Bonastre, A. & Martin, P. Gene 147 (1994) 179-187.
- (4) Jackson, R.J. & Standart, N. Cell 62 (1990) 15-24.
- (5) Ross, J. & Kobs, G.J. Mol. Biol. 188 (1986) 579-593.
- (6) Wilson, T & Treisman, R. Nature 336 (1988) 396-399.
- (7) Caput, D., Beutler, B., Hartok, K., Thayer, R., Brown-Shimer, S. & Cerami, A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 (1986) 1670-1674.
- (8) Graham, F.L. & van der Eb, A.J. Virology 52 (1973) 456.
- (9) Ausbel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., More, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. & Struhl, K. Current Protocols in Molecular Biology (1991) 4.9.1-4.9.8.
- (10) Aharon, T. & Schneider, R.J. Mol. Cell. Biol. 13 (1993) 1971-1980.