

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL GEN DE LA LIPOPROTEIN LIPASA (LPL) CAPRINA

Bouabid Badaoui ¹, Juan Manuel Serradilla ², Jordi Jordana ¹, José Luis Ares ³, Adolfo Falagán ⁴, Juan Carrizosa ⁵, Baltasar Urrutia ⁵, Marcel Amills ¹

¹ Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Universitat Autònoma de Barcelona.

² Departamento de Producción Animal, Universidad de Córdoba.

³ Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica (IFAPA). Centro de Investigación y Formación Agraria (CIFA) de Córdoba.

⁴ Departamento de Ciencia y Tecnología Agraria, Universidad Politécnica de Cartagena.

⁵ Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA). Estación Sericícola. La Alberca (Murcia).

INTRODUCCIÓN

La lipoprotein lipasa (LPL) es un enzima dimérico anclado en el endotelio que desempeña un papel fundamental en el metabolismo lipídico a través de la hidrólisis de los triglicéridos transportados por los quilomicrones y las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) (Goldberg et al 1996). Durante este proceso de hidrólisis se liberan ácidos grasos que son absorbidos por los tejidos periféricos, siendo oxidados y empleados como fuente de energía (p.e. en el músculo), o bien reesterificados en forma de triglicéridos y almacenados, tal como sucede en el tejido adiposo. En este sentido, la LPL actúa como un mediador importante en el mantenimiento de la homeostasis energética y la acumulación de la grasa en el tejido adiposo (Zechner et al. 2000). La LPL se expresa principalmente en el tejido adiposo y muscular. Se han detectado grandes diferencias en cuanto a los niveles de actividad de la LPL de la leche entre las razas Noruega (70 $\mu\text{mol FA/h/ml}$), Alpina (35 $\mu\text{mol FA/h/ml}$) y Saanen (21 $\mu\text{mol FA/h/ml}$) (Chilliard et al. 2003).

En humano, el gen LPL tiene 10 exones y la secuencia codificante posee un tamaño de 1.4 kb. Las regiones 5'UTR y 3'UTR tienen un tamaño aproximado de 0.17 y 1.9 kb respectivamente. La secuencia del cDNA LPL se ha descrito en ovino (Edward et al. 1993) y bovino (Senda et al. 1987). En el presente trabajo se ha abordado la caracterización molecular del gen LPL caprino con la finalidad de identificar SNP que puedan ser empleados como marcadores en estudios de asociación con caracteres de composición de la leche.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizaron extracciones de RNA a partir de muestras de hígado y glándula mamaria utilizando el reactivo Trizol (Gibco BRL). La síntesis de cDNA se llevó a cabo mediante el kit ThermoScript RT-PCR System Kit (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

Fragmento 1 (F1): Los oligonucleótidos empleados fueron LPLEXO3-6FW; 5'-CTC AGG ACT CCC GAA GAC AC-3', LPLEXO3-6RV; 5'-AAG GGA TGT TCT CGC

TCT CA-3'. Las condiciones de la reacción de PCR fueron: 5 µl de tampón de PCR, 1.5 mM MgCl₂, 100 µM de dNTPs, 0.5 µM de cada primer, y 1.25 U de Taq DNA polimerasa (Ecogen) en un volumen final de 50 µl. El perfil térmico fue de 94 °C-45 sec, 61 °C-30 sec, 72 °C-45 sec durante 35 ciclos.

Fragmento 2: Los oligonucleótidos empleados fueron LPL EXO7-8FW, 5'-GTT GCA ACA ACA TGG GCT AC-3', LPL EXO7-8RV; 5'-TGT TCA CTC ACT CTT GAC TAG TTG T. Las condiciones de la reacción de PCR fueron idénticas a las de F1, a excepción de la temperatura de annealing (66 °C).

Fragmento 3: Los oligonucleótidos empleados fueron LPLEXO9-10FW, 5'-GAA TGA AGT AAC TTT TAC AAA AGA CG-3'; LPL9-10RW, 5'-CAT GCT CGA AGT CTG ACT GAA-3'. Las condiciones de la reacción de PCR fueron idénticas a las de F1, a excepción de la temperatura de annealing (57.8 °C)

Fragmento 4: Los oligonucleótidos empleados fueron LPLEXO1-2FW, 5'-AAA CCT GCC GCT TCT AGC TC-3', LPL-12RW, 5'-TGG AGT CTG GTT CCC TCT TG-3'. Las condiciones de la reacción de PCR fueron idénticas a las de F1, a excepción de la concentración de magnesio (2 mM) y la temperatura de annealing (62.2 °C).

El producto amplificado se secuenció mediante el kit de secuenciación BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems). Las reacciones de secuenciación fueron analizadas en un aparato de electroforesis capilar ABI Prism 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se han amplificado 4 fragmentos de un tamaño de 0,9, 0,84, 0,80 y 0,42 kb que abarcan la totalidad de la secuencia codificante y parte de las regiones 5'UTR y 3'UTR del gen LPL caprino. La secuencia consenso LPL caprina fue comparada mediante el programa Blastn con las secuencias almacenadas en la base de datos Genbank, observándose una similitud nucleotídica del 99%, 97%, 91% y 90% con sus ortólogos ovino, bovino, porcino y humano, respectivamente. La similitud aminoacídica con las secuencias ovina y bovina fue del 99%, lo cual indica el elevado grado de conservación de esta proteína. El análisis de la secuencia aminoacídica mediante el programa Scan Prosite ha permitido identificar dos motivos estructurales muy conservados (Figura 1):

1-Un dominio **PLAT**, que podría estar implicado en interacciones proteína-proteína o proteína-lípido. El dominio PLAT posee una estructura en hoja β-plegada constituida por dos láminas de 4 cadenas cada una.

2-Un dominio **lipasa** de 10 aminoácidos en el cual se halla un residuo serina que, junto con otros dos residuos histidina y aspartato, forman parte de un sistema de transferencia de protones (charge relay system).

MESKALLLLALSVWLQSLTVSHGGLVAADRITGGKDFRDIESKFALRTPEDTAEDT
 CHLIPGVTESVANCHFNHSSKTFVVIHGWTVTGMYESWVPKLVAAALYKREPDSN
 VIVVDWLSRAQQHYPVSAGYTKLVGQDVAKFMNWMADFNYPNGVHLLGYSL
GAHAAGIAGSLTSKKVNRITGLDPAGPNFEYAEAPSRLSPDDADFVDVLHTFTRG
 SPGRSIGIQKPVGHVDIYPNGGTFQPGCNIGEALRVIAERGLGDVDQLVKCSHER
 SVHLFIDSLNNEENPSKAYRCNSKEAFEKGLCLSCRKNRCNNMGYEINKVRAKRS
 SKMYLKTRSQMPYKVFHYQVKIHFSGTESNTYTNQAFEISLYGTVAESENIPFTLP
EVSTNKTYSFLLYTEVDIGELLMLKLKWISDSYFSWSNWWSSPGFDIGKIRVKAG
ETQKKVIFCSREKMSYLQKGKSPVIFVKCHDKSLNRKSG

Figura 1. Secuencia aminoacídica de la LPL caprina: Se han indicado los dominios lipasa (en negrilla y doble subrayado) y PLAT (subrayado).

El próximo objetivo consistirá en secuenciar el cDNA LPL de distintos individuos de raza Murciana, Malagueña y Payoya con la finalidad de identificar polimorfismos y realizar estudios de asociación en una población de cabras Murcianas para las que se dispone de datos de control lechero. La caracterización molecular del gen LPL caprino y otros genes relacionados con el metabolismo lipídico resultará fundamental para comprender mejor los factores genéticos que gobiernan el contenido en grasa de la leche.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado mediante el proyecto CICYT Efectos de los haplotipos de los genes de las caseínas y de genes relacionados con el metabolismo de ácidos grasos sobre la composición y propiedades de la leche de la cabra Murciano Granadina (AGL2002-04304-C03-02-GAN). Bouabid Badaoui es becario del CIHEAM-IAMZ.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Chilliard et al. (2003). Journal Dairy Sci. 86: 1751-1770
 Edward et al. (1993). Biochim. Biophys. Acta 1171: 167-170
 Goldberg et al. (1996). J. Lipid Res. 37:, 693-707.
 Senda et al. (1987). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84: 4369-4373
 Zechner et al. (2000). J. Obes. Relat. Metab. Disord. 24: S53-56