

## EVALUACIÓN DEL GEN CANDIDATO PORCINO *ACYL-CoA SYNTHETASE LONG-CHAIN 4* PARA CARACTERES DE CALIDAD DE LA CARNE EN CERDOS

Corominas<sup>1</sup>, J., Ramayo, Y., Castelló, A., Muñoz, M., Ibáñez-Escriche, N., Folch, J.M. y Ballester, M.

<sup>1</sup>Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193, Bellaterra, Spain. E-mail: Jordi.corominas@uab.es

### INTRODUCCIÓN

Las acil-CoA sintetasas de cadena larga (*ACSL*) juegan un papel muy importante en la síntesis de lípidos celulares y en la degradación de ácidos grasos a partir de la  $\beta$ -oxidación. Se han caracterizado cinco isoformas de la familia *ACSL*, las cuales difieren en la preferencia de sustrato, la cinética enzimática, la localización celular y su regulación (Piccini, 1998). La isoforma *ACSL4* codifica para una proteína que utiliza preferencialmente ácido araquidónico y eicosapentaenoico como sustrato. Esta preferencia de sustrato hace que *ACSL4* sea una importante enzima implicada en controlar los niveles de ácido araquidónico, el cual es extremadamente importante en la generación de mediadores lipídicos, como sería el caso de las prostaglandinas i leucotrienos (Cao, 1998). El gen *ACSL4* porcino está localizado muy cerca de un QTL (*Quantitative Trait Loci*) en el SSCX, detectado en un cruce Ibérico x Landrace (IBMAP) y relacionado con el peso vivo y los porcentajes de ácido oleico (C18:1(n-9)) y ácidos grasos monoinsaturados (Mercadé, 2006). Estudios previos en nuestro laboratorio, han evaluado el *ACSL4* como gen candidato posicional para dicho QTL. La secuenciación del ARNm del gen permitió identificar 10 SNPs en la región 3'UTR, segregando en dos haplotipos diferentes en el cruce. El SNP c.2645G>A (DQ144454) fue genotipado en animales del cruce IBMAP y asociado con los porcentajes del ácido oleico y los ácidos grasos monoinsaturados (Mercadé, 2006). El objetivo del presente trabajo consistió en evaluar la implicación funcional del SNP c.2645G>A en el metabolismo de los ácidos grasos.

### MATERIAL Y MÉTODOS

**Material animal:** para este estudio se utilizaron un total de 120 animales procedentes de un retrocruzamiento de verracos F1 IBMAP con cerdas Landrace (BC1-LD) con diferente genotipo para el polimorfismo *ACSL4* c.2645G>A.

**Análisis de expresión del gen *ACSL4*:** La extracción de ARN total se obtuvo a partir de muestras de hígado (120 animales) y grasa dorsal (47 animales) utilizando el kit *RiboPure™ Isolation of High Quality Total RNA (Ambion)*. El ADNc fue obtenido utilizando el kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems)*. El análisis de expresión fue realizado mediante PCR cuantitativa a tiempo real (*SYBR green*), utilizando el gen *HPRT1* como gen endógeno. Los *primers* para amplificar el gen *ACSL4* fueron diseñados con el programa *Primer Express*, utilizando la secuencia del *Genbank* NM\_001038694: *forward* 5'-GGGACCAAAGGACACATATATCG-3' y *reverse* 5'-GGTCAGAGAGTGTTCAGTGGAGAAG-3'. El resultado final fue analizado con el programa estadístico SPSS, mediante un análisis de varianza (ANOVA).

**Genotipado masivo de SNPs:** A partir del ADN genómico extraído de muestras de hígado de todos los animales del cruce, se realizó un genotipado masivo mediante el chip *Porcine SNP60 BeadChip (Illumina)*, obteniéndose un total de 54.988 SNPs informativos de todo el genoma para realizar el análisis de asociación.

**Análisis de asociación genómico de datos de expresión del gen *ACSL4*:** el estudio de asociación de los niveles de expresión del gen *ACSL4* en hígado con los SNPs distribuidos por todo el genoma porcino se hizo con el programa *Qxpak* (Pérez-Enciso y Mistal, 2004). Los modelos asumidos para realizar el análisis, fueron: 1) modelo aditivo sin considerar la dominancia e incluyendo el sexo y el lote como efecto fijo, y 2) modelo aditivo y dominante con los mismos efectos fijos. Los niveles de significación fueron calculados con la librería de *q-values* disponible en R. La anotación de genes se realizó en intervalos de 2 Mb alrededor de los SNPs más significativos, y utilizando el programa *Biomart* (<http://www.ensembl.org/biomart>) con la base de datos disponible: *Ensembl Sscrofa9 Dataset* ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)). Los datos obtenidos de la anotación fueron validados en el *Assembly 10*.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

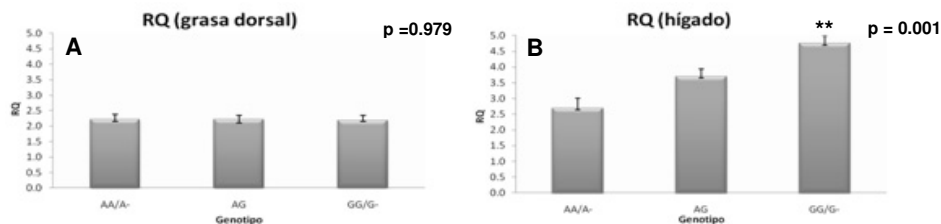
Tras analizar la expresión del gen *ACSL4* en grasa dorsal no se observaron diferencias en los niveles de expresión entre los animales de diferente genotipo del SNP c.2645G>A (Figura 1A). No obstante, el estudio de expresión en hígado reveló un efecto significativo de este genotipo respecto a los niveles de mRNA ( $p$ -value < 0.05) (Figura 1B). Los datos obtenidos demuestran que el genotipo AA/A- presenta una expresión menor respecto al genotipo GG/G-, mientras que el genotipo heterocigoto presenta un valor intermedio respecto a los dos homocigotos (Figura 1B).

A pesar de las diferencias significativas observadas en hígado en los diferentes genotipos, la gran variabilidad observada dentro de cada grupo (no mostrado) sugiere la existencia de otros *loci* que afectan a la expresión del gen *ACSL4*. Con el fin de testar esta hipótesis, se realizó un estudio de asociación de los datos de expresión de *ACSL4* y los genotipos de los SNPs de todo el genoma. Los resultados obtenidos confirmaron nuestra hipótesis, se observaron regiones en los SSC2, SSC6, SSC11 y SSC12 (Tabla 1) más significativas a nivel cromosómico que el SNP del gen *ACSL4*. En el SSC2 se identificó una región significativa entre las posiciones 4-9 Mb. La anotación de esta región permitió identificar el gen *ESRRA*, potencialmente interesante debido a su función de regulador transcripcional de genes relacionados con el metabolismo de ácidos grasos. Otros genes relacionados con la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos fueron encontrados en esta región, hecho que sugiere una posible regulación conjunta con el *ACSL4*. En el SSC6 se obtuvieron resultados relativamente diferentes entre los modelos aditivo y aditivo-dominante. En cada uno aparecieron SNPs significativos en regiones distintas. En el modelo aditivo, se anotó la región englobada entre las posiciones 155-158 Mb y el resultado más interesante fue la aparición del gen *NFYC* que codifica una proteína que forma parte de un complejo que actúa como factor de transcripción en una gran variedad de genes. En el modelo aditivo-dominante, se anotó la región englobada entre las posiciones 121-127 Mb y se observó el gen *ACADM*, el cual es un gen que actúa en los primeros pasos de la  $\beta$ -oxidación y además está relacionado con el *ACSL4*. Esto nos sugiere la posibilidad de una regulación conjunta. La actual anotación del genoma porcino no nos permitió evaluar con exactitud las regiones del SSC11 y SSC12, por este motivo se seguirá trabajando en el estudio de estas regiones, para poder identificar y caracterizar nuevos genes que puedan explicar las diferencias de expresión del gen *ACSL4*.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Piccini, M., Vitelli, F., Bruttini, M., Pober, B.R., Jonsson, J.J., Villanova, M., Zollo, M., Borsani, G., Ballabio, A. & Renieri, A. 1998. *Genomics* 47, 350-8. • Cao, Y., Traer, E., Zimmerman, G.A., McIntyre, T.M. & Prescott, S.M. 1998. *Genomics* 49(2):327-30. • Mercadé, A., Estellé, J., Pérez-Enciso, M., Varona, L., Silió, L., Noguera, J.L., Sánchez, A. & Folch, J.M. 2006. *Anim. Genet.* 37, 219-224. • Pérez-Enciso, M. & Misztal, I. 2004. *Bioinformatics* 20, 2792-8.

**Agradecimientos:** Al Dr. Jordi Estellé por su ayuda en el estudio de asociación de los SNPs del SSCX. A la Dra. Anna Mercadé por el genotipado del chip de SNPs porcino. Este trabajo ha sido financiado por el MICINN AGL2008-04818-C03/GAN. J. Corominas ha sido financiado con la beca FPI del Ministerio de Educación (BES-2009-018223) y Y. Ramayo con una beca FPU (AP2008-01450).



**Figura 1.** Cuantificación relativa (RQ) de los niveles de ARNm de los diferentes genotipos del polimorfismo c.2645G>A, utilizando: A, muestras de grasa dorsal o B, muestras de hígado. Los datos representan la media  $\pm$  SEM. \*\* significa un  $p$ -value inferior a 0,01 respecto al genotipo AA/A-, determinado por ANOVA.

**Tabla 1.** Genes con relevancia biológica identificados en las regiones asociadas con los niveles de expresión del gen *ACSL4*.

Cromosoma	Posición (Mb)	Gen	Descripción
SSC2	3	CPT1A	carnitine palmitoyltransferase 1A
SSC2	6	ESRRA	estrogen-related receptor alpha
SSC2	9	FADS 1/2/3	fatty acid desaturase 2
SSC6	126	ACADM	acyl-Coenzyme A dehydrogenase
SSC6	157	NFYC	nuclear transcription factor Y

### EVALUATION OF PORCINE *ACSL4* GENE AS CANDIDATE GENE FOR MEAT QUALITY TRAITS IN PIGS

**ABSTRACT:** Long-chain acyl-CoA synthetase (*ACSL*) family members catalyse the formation of long-chain acyl-CoA from fatty acid, ATP and CoA, thus, playing an important role in both *de novo* lipid synthesis and fatty acid catabolism. Previous studies in our group, evaluated the *ACSL4* as a positional candidate gene for a quantitative trait loci located in chromosome X in an Iberian x Landrace cross. A c.2645G>A SNP located in the 3'UTR (DQ144454) was associated with the percentages of oleic and monounsaturated fatty acids. The aim of the present work was to evaluate the functional implication of this genetic variant. An expression analysis was performed in 120 individuals with different genotypes for the c.2645G>A polymorphism using the real-time quantitative PCR (SYBR green) method. Differences between genotypes were identified in liver, being the *ACSL4* mRNA expression levels higher in animals with the A allele than in animals with the G allele. A SNP genome-wide association study with the *ACSL4* relative expression levels showed significant positions on chromosomes 2, 6, 11 and 12. Candidate positional genes for *ACSL4* regulation were found.

**Keywords:** *ACSL4*, fatty acid metabolism, GWAS,  $\beta$ -oxidation.