

## Análisis comparativo de promotores del gen de calpastatina en Angus y Brahman

### Comparative analysis of promoters of the calpastatin gene in Angus and Brahman

MOTTER, MM<sup>1</sup>; CORVA, PM<sup>2</sup>; SORIA, LA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Veterinarias, Cátedra de Genética. <sup>2</sup>Universidad Nacional de Mar del Plata, Facultad de Ciencias Agrarias, Unidad Integrada Balcarce, Departamento de Producción Animal.

### RESUMEN

El gen de la calpastatina bovina (CAST) se expresa en músculo esquelético generando diferentes isoformas de ARNm a partir de tres promotores (I, II y III), *splicing* y poliadenilación alternativos. Su expresión varía entre razas y músculos, lo que es relevante porque contribuye a la variabilidad de la terneza de la carne. El objetivo de este trabajo fue analizar las secuencias de los tres promotores de CAST en toros Angus (n=7) y Brahman (n=7) con el propósito de identificar polimorfismos de ADN, potenciales sitios de unión a factores de transcripción (TFBS o *transcription factor binding site*) e islas CpG. Se identificaron trece SNP, de los cuales cuatro alterarían potenciales TFBS en el promotor I (sitios NF-κB en las posiciones 96.034.491, 96.034.660 y 96.034.661 de BTA7 del genoma bovino de referencia ARS UCD 1.2 y sitios E2F o Sp1 en la posición 96.034.610) y tres en el promotor II (96.034.941 sitio Sp1 y 96.035.456 y 96.035.504 sitios E2F). Se identificaron islas CpG en los tres promotores y SNPs en I y II que alterarían dinucleótidos CpG. Estos resultados plantean nuevas hipótesis y objetivos para la investigación en la calidad de la carne, y la necesidad de estudios complementarios para validarlos.

**Palabras clave:** (bovinos para carne), (calpastatina), (factores de transcripción), (islas CpG)

## SUMMARY

The bovine calpastatin (CAST) gene has different isoforms expressed in skeletal muscle that originate from three promoters (I, II and III), with alternative splicing and variable polyadenylation sites. Total and relative expression of isoforms vary between breeds and muscles, contributing to the variability of the meat tenderness. The objective of this study was to analyze the sequence of the three CAST promoters in Angus (n = 7) and Brahman (n = 7) bulls in order to identify DNA polymorphisms, potential transcription factor binding sites (TFBS) and CpG islands. Thirteen SNPs were identified, four of them would modify potential TFBS in promoter I (NF- $\kappa$ B site: positions 96,034,491, 96,034,660 and 96,034,661 and E2F or Sp1 sites I position 96,034,610 on BTA7; reference genome ARS UCD 1.2) and three in promoter II (in 96,034,941 Sp1 and 96,035,456 and 96,035,504 E2F sites). CpG islands were identified in the three promoters and SNPs in I and II that would alter CpG dinucleotides. These results could lead to new hypotheses and objectives in the investigation of meat quality, particularly about differences among cattle breeds.

**Key words:** (beef cattle), (calpastatin), (transcription factor), (CpG islands)

## INTRODUCCIÓN

La calpastatina es el inhibidor endógeno específico del sistema de las calpaínas, el cual participa en la degradación de las proteínas miofibrilares tanto en el tejido muscular *in vivo* como *postmortem*, y además regula el recambio de proteínas y la diferenciación celular en el tejido muscular y por lo tanto el crecimiento en general<sup>12</sup>. El gen de la calpastatina bovina (CAST) tiene una regulación de la expresión altamente compleja porque depende de cuatro promotores; tres de los cuales (I, II y III) son activos en músculo esquelético dando origen a mensajeros con extremo 5' en los exones 1xa, 1xb y 1u, respectivamente<sup>23</sup>, dicho gen presenta además, *splicing* y poliadenuilación alternativos<sup>2,23,24</sup>.

Las razas índicas y sus cruas se utilizan en sistemas de producción extensiva tropical y subtropical porque tienen mayor adaptabilidad, tolerancia al calor y a garrapatas, longevidad y fertilidad que las razas europeas; sin embargo producen carne de menor calidad que estas últimas. Está confirmado que la raza Brahman tiene mayor actividad de calpastatina en el músculo en comparación con Angus, considerándose como uno de los factores que determina la menor terneza de la carne de dicha raza<sup>22</sup>.

Se han realizado estudios de la expresión del gen CAST en distintas razas y músculos, hallándose diferencias significativas en el nivel de expresión de las distintas isoformas de mensajeros de CAST<sup>15,16,17</sup>, pero aún no hay consenso sobre la relación específica entre la forma de expresión de dicho gen y la magnitud de su efecto sobre la terneza según músculo o raza.

Los promotores alternativos de un gen son responsables de la expresión génica específica de tejido o de una etapa de desarrollo. Algunos posibles mecanismos que explican cómo los múltiples promotores son utilizados selectivamente incluyen: distinta estructura del *core* del promotor, sitios de inicio de transcripción dispersos regulados por proteínas de unión específicas al ADN, como factores Sp1 o NF-Y<sup>9</sup>, presencia de elementos cis-reguladores distales tales como *enhancers*<sup>13</sup> o presencia de componentes tejido-específico homólogos a factores de transcripción basal<sup>5</sup>. Otro mecanismo relevante de control de la expresión génica es el epigenético, el cual incluye, entre otros, a la metilación del ADN, el cual es un mecanismo de silenciamiento génico que consiste en la adición de un grupo metilo al C<sub>5</sub> de una citosina (5-mC) que precede a una guanina (CpG). Con frecuencia,

estos dinucleótidos se encuentran agrupados en regiones denominadas islas CpG. La metilación se ha asociado con una disminución de la actividad transcripcional ya que puede inhibir la unión de los TFIIIs (*transcription factor RNA polymerase II*) de manera directa o indirecta, reclutando proteínas de unión a metil-CpG (MBP, *methyl binding protein*), que poseen actividades represivas de remodelación de la cromatina<sup>10</sup>.

Los patrones de metilación pueden ser inducidos por diversos factores, tales como edad, manejo, infecciones bacterianas, entre otros, lo cual indicaría que en algunos casos, la metilación del ADN es un proceso dinámico de respuesta a estímulos externos<sup>8</sup>.

La expresión génica también puede resultar afectada por la presencia de polimorfismos (SNPs o Indels) en los promotores, tanto por alterar TFBS como las islas CpG y su potencial metilación<sup>18, 29</sup>.

Dada la relevancia del control de la transcripción sobre el nivel y el perfil (isoformas) de la expresión del gen CAST, el objetivo del presente trabajo fue analizar y comparar las secuencias de tres promotores (I, II y III) del gen CAST en las razas Angus y Brahman en busca de polimorfismos que pudieran alterar sitios de unión a factores de transcripción y/o islas CpG.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Muestras

A partir de muestras de semen o sangre (extraída con EDTA como anticoagulante) de 14 toros (7 Angus y 7 Brahman) de uso en inseminación artificial en Argentina, se aisló el ADN mediante un método estándar de fenol/cloroformo<sup>25</sup>, agregándose 0.4M ditiotritol (DDT) a la solución de lisis celular en las muestras de semen.

### Análisis Molecular

La secuencia de nucleótidos de los promotores I, II y III de CAST se recuperaron de la base de datos *GenBank* (Nro. de acceso AH014526). Se diseñaron cebadores específicos mediante el programa Primer3 que fueron utilizados en las reacciones de PCR y de secuenciación (Tabla 1). Se amplificaron fragmentos que contienen las regiones potenciales de dichos promotores,

descriptas por Raynaud *et al*<sup>23</sup>. Para cada reacción de PCR a 100 ng de ADN se le agregaron 0,25 µM de cada cebador, 200 µM de cada dNTP (Promega Corporation, WI, USA), 1,5 mM de Cl<sub>2</sub>Mg, 2U de *Kapa2G Fast DNA Polymerase* (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 5 µl de Buffer 1X y H<sub>2</sub>O en cantidad suficiente para 25 µl de volumen final. Cada reacción se realizó en un termociclador marca *Mastercycler personal* (Eppendorf, Stevenage, UK), en 35 ciclos y con el siguiente programa: 20 seg a 94 °C, 15 seg a la temperatura de *annealing* específica para cada par de cebadores (58 °C, 56 °C y 59 °C para I, II y III, respectivamente), 15 seg a 72 °C, con un primer paso a 95 °C durante 5 min y una extensión final durante 5 min a 72 °C. Los amplicones obtenidos se visualizaron en geles de agarosa al 2 % teñidos con *GelRed® Nucleic Acid Gel Stain* (Biotium, Fremont, USA) y posteriormente se purificaron con *PureLink® Quick Gel Extraction and PCR Purification kit* (Invitrogen Life Technologies, Brasil) según protocolo del fabricante. Los amplicones purificados fueron secuenciados en un ABI3130XL *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Foster City, USA) en el Servicio de Secuenciación de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, con los cebadores diseñados para tal fin (Tabla 1).

### Análisis Bioinformático

Las secuencias de nucleótidos obtenidas fueron editadas mediante el programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* y se alinearon con el programa *ClustalW Multiple Alignment*.

Para identificar potenciales TFBS, se utilizó el programa *MatInspector*, versión 11.3 (Genomatix GmbH, München, Alemania) con las siguientes restricciones: Grupo de matrices: elementos promotores centrales generales y vertebrados; Similitud de *core*: 0.9, Similitud de matrices: optimizado. Dicho programa utiliza matrices de peso posicional (PWM, *position weight matrix*) construidas a partir de sitios de unión de factores de transcripción experimentalmente determinados.

El análisis de la presencia de islas CpG en las tres regiones promotoras del gen CAST se realizó mediante el programa *Methyl Primer Express*, version 1.0 (Applied Biosystems, Foster City, USA).

**Tabla 1.** Cebadores utilizados en reacciones de amplificación y secuenciación de los promotores I, II y III del gen CAST bovino

| Promotor | PCR                                                            | Secuenciación                                                                                         |
|----------|----------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| I        | Forward: CCACAGGCAGACAATCACTG<br>Reverse: TAGGAGCGCCACTCACCT   | Forward S1: CCACAGGCAGACAATCACTG<br>Reverse-S1: TAGGAGCGCCACTCACCT<br>Reverse-S2: GAGAGGAGGGGCTGGAGA  |
| II       | Forward: GCACCGGCCTCGCCATGT<br>Reverse: CAGGGACGATCACTCCTATTT  | Forward-S1: CCTAAGCAGCTTTGAGCC<br>Reverse-S1: CAGGGACGATCACTCCTATTT<br>Reverse-S2: CCCACCCCTGTCTCATCC |
| III      | Forward: TGGCTTTAGGGAAACTGGCTT<br>Reverse: CACTCTGCGTCCGGCTTCG | Forward-S1: TGGCTTTAGGGAAACTGGCTT<br>Forward-S2: GATTCTCAGGGCGGAGAGG                                  |

## RESULTADOS

Los SNP hallados en las secuencias alineadas de los tres promotores de CAST de los 14 toros analizados se resumen en la Tabla 2. Dicha comparación permitió identificar haplotipos diferentes en los promotores I y II en cada raza analizada, no hallándose diferencias en el promotor III. En la muestra de toros Angus se halló el haplotipo CTCCA en el promotor I y el haplotipo GCTGG en las secuencias aisladas de los toros Brahman. Al promotor II le correspondieron el haplotipo CCG en Angus y el GTC en Brahman (Tabla 2).

El análisis de predicción de los potenciales elementos regulatorios en *cis* o TFBS permitió identificar los factores que interactúan potencialmente con las tres regiones promotoras y establecer que algunos de los ellos podrían ser alterados por los SNP hallados en la comparación de secuencias de Angus y Brahman (Tabla 2 y Fig. 1, 2 y 3).

De los resultados obtenidos del análisis de predicción de TFBS pudo observarse que en el promotor I, los SNP de las posiciones 96.034.491, 96.034.660 y 96.034.661 de BTA7 (posiciones -70, +101, +102 respectivamente con respecto al sitio de inicio de la transcripción) crearían sitios de unión al factor NF- $\kappa$ B (*Nuclear Factor kappa Beta*) cuando se presenta el alelo hallado en las secuencias obtenidas de Brahman (G en las tres posiciones) (Fig. 1). El SNP de la posi-

ción 96.034.610 (+51) modificaría un TFBS que potencialmente podría unirse a dicha secuencia; en el caso del alelo C (hallado en Angus) sería un sitio E2F, mientras que con el alelo T (hallado en Brahman) sería un sitio Sp1.

En la secuencia correspondiente al promotor II se predijo un sitio Sp1 en la región que contiene al SNP 96.034.941 (-637) en presencia del alelo G (hallado en Brahman). También en la secuencia de dicho promotor, los SNP de las posiciones 96.035.456 (-122) y 96.035.504 (-74) se predijeron sitios de unión a E2F cuando están presentes los alelos hallados en Angus (T y C, respectivamente) (Fig. 2A y B). Se pudo determinar también una región rica en sitios Sp1 y E2F alrededor del SNP 96.035.456, particularmente entre las posiciones -139 a -91, donde se identificaron seis sitios Sp1 en ambas razas, dos E2F en Brahman y tres en Angus (Fig 2B).

El análisis realizado para identificar islas CpG en los tres promotores, determinó que las mismas podrían abarcar amplias regiones distales de los promotores I y III (559 pb y 619 pb, respectivamente) y la región completa analizada en el promotor II (Fig. 1, 2 y 3). Alguno de los SNP identificados en los promotores I y II podrían alterar algún dinucleótido CpG, y por lo tanto también el patrón potencial de metilación de la isla CpG determinada (Fig. 1 y 2).

**Tabla 2.** SNP hallados en los promotores I, II y III del gen CAST en Angus y Brahman y los potenciales TFBS que modifican<sup>1</sup> Posición sobre el cromosoma 7 (BTA7) del genoma bovino de referencia ARS UCD 1.2.

| Posición <sup>1</sup> | Promotor | SNP <sup>2</sup> | Alelo hallado en: |         | SNP data base #rs | TFBS      |
|-----------------------|----------|------------------|-------------------|---------|-------------------|-----------|
|                       |          |                  | Angus             | Brahman |                   |           |
| 96034491              | I        | C/G              | C                 | G       | 110033820         | NF-κB     |
| 96034569              |          | T/C              | T                 | C       | 134789056         | .....     |
| 96034610              |          | C/T *            | C                 | T       | 133635365         | E2F o Sp1 |
| 96034660              |          | C/G *            | C                 | G       | 134974904         | NF-κB     |
| 96034661              |          | A/G              | A                 | G       | 136105887         | NF-κB     |
| 96034941              | II       | C/G              | C                 | G       | 137189823         | Sp1       |
| 96035456              |          | C/T *            | C                 | T       | 378973252         | E2F       |
| 96035504              |          | C/G              | G                 | C       | 207766091         | E2F       |
| 96082374              | III      | T/C              | C/T               | T       | 134192228         | .....     |
| 96082543              |          | G/C              | C/G               | C/G     | 137548881         | .....     |
| 96082567              |          | A/G              | A/G               | A       | 133564351         | .....     |
| 96082568              |          | G/T              | G/T               | G       | 137151719         | .....     |
| 96083070              |          | T/C              | C/T               | T       | 134482468         | .....     |

<sup>2</sup> Los polimorfismos que podrían modificar un sitio CpG se indican con asterisco.

-508  
AAGCCGACAAAACACACCCAGGCCCGTGTGTGTACACACACACACACACA  
CACACGCACACACACACAATCACAACACACGGAGTCACACACAGACCAATT  
MyoD  
TGTTTCTGCAATCCGCTTCCTCATCCAGAAGTCCAGGCCCGGGCCATCTGA  
MyoD  
GTTGGTAAATCTCCTCCTAGTTAACTCAGAGCAGATTGCAGAAATGCTGCT  
Ap1 Sp1  
AATTCTTGAGATTCTTAGGGAGTGGGGCTTGAGATGTAGACGGGCCACGCC  
Sp1 NF-κB  
CGGTCCCGCTCTCCTTGCACTGCGAGCCAAGTCTAGGCAAGTCGGGGGA  
NF-κB Sp1  
AAACCCGCGCATCTCCAGCCCTCCTCTCTGCGACCCACTGGGGCACCAGGC  
Sp1 NF-κB Gata1  
GACCTCGGGTGGGGTGTCCCTGGGAGAAGATACGGGACCCAGGGTGTG  
NF-κB  
AGTTGCAACAGGCAAGCCCGGGCTGCTGCCGCCCGGGCGCTGCCAACTGCAG  
-70 Sp1  
GCAGGAAGGGAGGGCCCTGCCCGCGAAggggagcGctcggggtcggggtggg  
+1 +8  
Sp1 E2F/Sp1  
tcggaaaagctgcctccagggcGctccgcagccctccgcgcctccctcccca  
+51  
NF-κB  
gcgctccccggtcGctccctccctccaggtccgcgcgccccggaggcagcgt  
+101/+102  
cgacacggcctcgccatgtccagcgggccccgaagcccg  
+183

**Figura 1.** Potenciales TFBS en el promotor I del gen CAST predichos por análisis bioinformático y SNP identificados por secuenciación en Angus y Brahman.

Ref.: Las posiciones con respecto al sitio de inicio de la transcripción de los SNP detallados en la Tabla 2 (en la figura, señalados con recuadros) son respectivamente: -70: S=C/G; +8: y=T/C; +51: y=C/T y +101/+102: sr=CA/GG. Los TFBS que pueden variar entre razas se indican con línea punteada. Con línea entera se indica la isla CpG. El extremo 5' del exón 1xa se indica con letras minúsculas.



## DISCUSIÓN

La expresión de CAST se regula a partir de la combinación integrada de la actividad del promotor, el *splicing* y la poliadenilación alternativa<sup>2,23,24</sup>, generando de ese modo, distintas isoformas de mensajeros. Lejos de ser una excepción, la regulación de la expresión génica mediante la generación de numerosas isoformas es un proceso usual, acoplado y regulado en forma conjunta<sup>11,14</sup>.

Las regiones promotoras del gen CAST son ricas en islas CpG, carecen de caja TATA y secuencias regulatorias proximales del tipo CAAT, características propias de genes *housekeeping*, los cuales suelen presentar múltiples sitios Sp1<sup>23</sup>.

Los TFBS más abundantes y comunes identificados en los tres promotores son Sp1 y NF-κB. Sp1 es un factor de transcripción del tipo “dedos de zinc” (*Zinc-fingers*) que se une a motivos ricos en GC de muchos promotores, y es un factor de transcripción que puede activar la transcripción en ausencia de caja TATA<sup>23</sup>. Sp1 y NF-κB participan en muchos procesos celulares, incluida la diferenciación y crecimiento celular, respuestas inmunitaria e inflamatoria y la remodelación de la cromatina<sup>21</sup>.

Los SNP hallados en el promotor I en las secuencias aisladas en Brahman, revelaron que podrían crear dos sitios NF-κB y un sitio Sp1. Estos SNP están ubicados en la región más importante para la activación de la expresión de la isoforma I de CAST<sup>23</sup>, pudiendo ser una de las posibles causas en las diferencias de actividad de calpastatina halladas entre razas bovinas<sup>22</sup>.

La secuencia del promotor II posee una alta concentración de guaninas lo que resulta en múltiples sitios Sp1. El alelo G del SNP presente en Brahman en la posición -637 crearía un sitio Sp1. Por otra parte, los SNP -122 y -74 modifican sitios de unión para E2F (Fig. 2), el cual entre otras funciones, es un regulador del metabolismo en condiciones no proliferativas<sup>6</sup>. Estudios de regulación realizados sobre muestras de músculo cardíaco bovino mostraron un aumento en la transcripción de calpastatina en respuesta a β-agonistas por la vía de señalización dependiente de la proteína quinasa A (PKA), indicando dos posibles sitios de respuesta a AMPc en la región -76 (GGTCA) y -20 (TGAC) del promotor II, los cuales han sido denomina-

dos sitio “CRE (*cAMP response element*) like” o “CRE like half” (porque estos sitios no presentan la secuencia palindrómica conservada típica de los sitios CRE, que es: TGACGTCA)<sup>2</sup>. El hallazgo de una C en el SNP de la posición -74 del promotor II, en toros Brahman, sugiere que en dicha región se podría originar un TFBS del tipo “CRE like”. Los β-agonistas son utilizados como promotores del crecimiento y la eficiencia alimentaria, pero también afectan la calidad de la carne, principalmente reduciendo la terneza<sup>4</sup>, efecto que está relacionado con el aumento de la actividad de calpastatina<sup>27</sup>.

En la comparación de expresión de CAST entre Angus y Brahman, Nattrass et al<sup>17</sup> hallaron interacciones significativas entre raza y administración de β-agonistas, y entre raza y sexo, lo que señala que los promotores del crecimiento y las hormonas sexuales tienen efecto sobre la expresión de dicho gen y que ese efecto podría estar explicado por cambios en el nivel de la transcripción de CAST dependiente de TFBS o de mecanismos epigenéticos.

En el promotor II también se identificaron numerosos sitios MyoD, un factor clave en la diferenciación del tejido muscular esquelético y el mantenimiento de la capacidad metabólica oxidativa<sup>26</sup>, que también puede interactuar con proteínas involucradas en la remodelación de la cromatina promoviendo la acetilación de histonas, y en consecuencia la activación génica. Estudios de expresión realizados en el músculo *Longissimus dorsi* de bovinos de raza Nelore, demostraron una menor expresión de MyoD en muestras de carne más tierna<sup>28</sup>. La presencia de estos sitios en el promotor hace posible su unión y por lo tanto la activación podría depender de la concentración del factor MyoD.

En cada uno de los promotores analizados se hallaron sitios GATA1, un factor de transcripción que contiene dos dedos de zinc altamente conservados, y aunque solo tres subtipos de factores de transcripción GATA (GATA 4, 5 y 6) se expresarían en tejido de origen mesodérmico y endodérmico, se ha reportado que GATA1 podría estar regulando la transcripción de CAST<sup>23</sup>.

Además de la diversidad de promotores, el control de la expresión génica de CAST incluye también el *splicing* y la poliadenilación alternativa, mecanismos que podrían estar regulados conjuntamente con la transcripción. Se ha demos-

trado que el reclutamiento específico de ciertos factores de la transcripción, la arquitectura del promotor<sup>3</sup>, así como también la fosforilación de la ARN polimerasa<sup>7</sup> influyen en los procesos de *splicing*. La poliadenilación alternativa influye en la vida media de los ARNm, porque aquellos que poseen 3'UTR más cortos son generalmente más estables debido a que en esa región presentan menos sitios de unión a proteínas o microARN que promueven su degradación, dicho proceso de poliadenilación alternativa también podría estar regulado, entre otros factores, por secuencias presentes en el promotor<sup>19</sup>.

Se han hallado diferencias en la expresión de CAST entre razas bovinas<sup>18</sup>, entre distintos músculos bovinos<sup>15,16,17</sup>, como así también se han identificado mensajeros alternativamente poliadenilados en distintos músculos bovinos<sup>1,17</sup>.

Motter *et al*<sup>15</sup>, hallaron que las isoformas de CAST que más se expresan en tres músculos (*infraspinatus*, *triceps brachii* y *semitendinosus*) de novillos Angus son la II y la III, y además que la isoforma III tiene una variante que excluye al exón 3, siendo la isoforma III con exón 3 la más abundante en el músculo *semitendinosus*. En cambio, al realizar el mismo análisis en músculos de novillos Brahman, se halló un resultado inverso con relación a la expresión de la isoforma III en *semitendinosus*, donde la isoforma más abundante fue la isoforma III sin exón 3 (resultados inéditos).

Con relación a mensajeros de CAST alternativamente poliadenilados, Casale *et al*<sup>1</sup> han descrito tres tipos de ARNm: cortos, medianos y largos, al analizar tres músculos bovinos (*infraspinatus*, *triceps brachii* y *semitendinosus*) de dos razas (Angus y Brahman).

Todos estos resultados sugieren que la existencia de polimorfismos afectando TFBS en los promotores de CAST no serían la única causa probable de diferencias de expresión entre razas. Deben considerarse también los cambios a nivel del control epigenético de la expresión, como podrían ser los cambios en los patrones de metilación de las extensas islas CpG identificadas en cada uno de los promotores analizados, las cuales podrían ser blanco de metilación y por lo tanto, disminuir la expresión de dicho gen. Parr *et al*<sup>20</sup> han demostrado que en los promotores del gen CAST porcino existen polimorfismos que modificarían el pa-

trón de metilación de los promotores I y II, lo cual daría origen a diferencias entre razas en la expresión de dicho gen.

En síntesis, este trabajo aporta información sobre las potenciales causas que podrían explicar diferencias en la expresión del gen de la calpastatina entre dos razas bovinas que han sido siempre un ejemplo paradigmático de las diferencias en calidad de la carne. Estudios funcionales (*Mobility shift assay*, estudios de expresión *in vitro*, por ejemplo) permitirían confirmar la interacción los TFBS descritos, la existencia de diferencias en los patrones de metilación de las islas CpG delimitadas y la potencial influencia de los SNP identificados sobre la actividad de los tres promotores de CAST.

## CONCLUSIÓN

El análisis de las secuencias de los tres promotores de CAST activos en músculo esquelético en toros Angus y Brahman permitió identificar trece polimorfismos del tipo SNP y también confirmar la existencia de una extensa isla CpG en cada uno de ellos. Los SNP identificados podrían alterar potenciales TFBS identificados en cada promotor o incluso alterar el patrón de metilación en las islas CpG de los promotores I y II. Estos hallazgos contribuyen a la definición de nuevas hipótesis acerca del control de la expresión de un gen sumamente complejo, y que en el caso particular de los animales domésticos tiene un rol clave en la definición de la calidad y valor de la carne.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado con subsidios de la Universidad de Buenos Aires (UBACyT 2010-1012-20020090100072 y 2020-2023-20020190100272). El presente trabajo es parte de la tesis de Mariana M. Motter en cumplimiento parcial de los requisitos para el título de Doctor (Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires).

## BIBLIOGRAFÍA

1. Casale, M. F.; Silvestro, C.; Corva, P.M.; Soria, L.A. Alternatively polyadenylated calpastatin transcripts in bovine muscles. *Journal of Basic and Applied Genetics*. 2020; 31, (1): 45–51.
2. Cong, M.; Thompson, V. F.; Goll, D. E.; Antin, P. B. The bovine calpastatin gene promoter and a new N-terminal region of the protein are targets for cAMP-dependent protein kinase activity. *Journal of Biological Chemistry*. 1998; 273: 660-666.
3. Cramer, P.; Cáceres, J.F.; Cazalla, D.; *et al.* Coupling of transcription with alternative splicing: RNA pol II promoters modulate SF2/ASF and 9G8 effects on an exonic splicing enhancer. *Mol Cell*. 1999; 4 (2): 251-258.
4. Cruz, F.L.; de Carvalho, E.B.; Ramos, E.M.; Pereira, L.J.; Zangeronimo, M.G. Relationship between beta-adrenergic agonists, calpain system activity and beef texture: A systematic review. *J Anim Physiol Anim Nutr*. 2021; 105: 442– 451.
5. Davuluri, R.V.; Suzuki, Y.; Sugano, S.; Plass, C.; Huang, T.H. The functional consequences of alternative promoter use in mammalian genomes. *Trends Genet*. 2008 ;24 (4) :167-177.
6. Denechaud, P.D.; Fajas, L.; Giralt, A. E2F1, a Novel Regulator of Metabolism. *Frontiers in Endocrinology*. 2017; 8. 311.
7. Hirose, Y.; Tacke, R.; Manley, J.L. Phosphorylated RNA polymerase II stimulates pre-mRNA splicing. *Genes Dev*. 1999; 13 (10):1234-1239.
8. Ju, Z.; Jiang, Q.; Wang, J.; *et al.* Genome-wide methylation and transcriptome of blood neutrophils reveal the roles of DNA methylation in affecting transcription of protein-coding genes and miRNAs in E. coli-infected mastitis cows. *BMC Genomics* 2020; 21, 102.
9. Kadonaga, J.T. Perspectives on the RNA polymerase II core promoter. *WIREs Dev Biol*, 2012; 1: 40-51.
10. Kaludov, N.; Wolffe, A. P. MeCP2 driven transcriptional repression *in vitro*: selectivity for methylated DNA, action at a distance and contacts with the basal transcription machinery. *Nucleic Acids Res*. 2000; 1921–1928.
11. Kolathur, K.K. Role of promoters in regulating alternative splicing, *Gene*, 2021; 782.
12. Koohmaraie, M.; Kent, M.P.; Shackelford, S.D.; Veiseth, E.; Wheeler, T.L. Meat tenderness and muscle growth: is there any relationship? *Meat Science*. 2002; 62 (3): 345-352.
13. Levine, M.; Tjian, R. Transcription regulation and animal diversity. *Nature*. 2003; 424: 147-151.
14. Mapendano, C. K.; Lykke-Andersen, S.; Kjems, J.; Bertrand, E.; Jensen, T.H. Crosstalk between mRNA 3' end processing and transcription initiation. *Mol. Cell* 2010; 40:410–422.
15. Motter, M.M.; Corva, P.M.; Soria, L.A. Expression of calpastatin isoforms in three skeletal muscles of Angus steers and their association with fiber type composition and proteolytic potential. *Meat Science*. 2021; 171.
16. Muroya S.; Neath, K.E.; Nakajima, I.; *et al.* Differences in mRNA expression of calpains, calpastatin isoforms and calpain/ calpastatin ratios among bovine skeletal muscles. *Animal Science Journal*. 2012; 83 (3):252-259.
17. Natrass, G.S.; Café, L.M.; McIntyre, B.L.; *et al.* A post-transcriptional mechanism regulates calpastatin expression in bovine skeletal muscle. *Journal of Animal Science*. 2014; 92 (2):443-455.
18. Ordovás, L.; Roy, R.; Pampín, S.; *et al.* The g.763G>C SNP of the bovine FASN gene affects its promoter activity via Sp-mediated regulation: implications for the bovine lactating mammary gland. *Physiol Genomics*. 2008; 15; 34(2):144-148.
19. Oktaba, K.; Zhang, W.; Lotz, T.S.; *et al.* ELAV Links paused Pol II to alternative polyadenylation in the Drosophila Nervous System. *Molecular Cell*. 2015; 57 (2):341-348.
20. Parr, T.; Jewell, K.K.; Sensky, P.L.; Brameld, J.M.; Bardsley, R.G.; Buttery, P.J. Expression of calpastatin isoforms in muscle and functionality of multiple calpastatin promoters. *Arch Biochem Biophys*. 2004; 427(1):8-15.
21. Pires B.R.B.; Binato, R.; Ferreira, G.M.; Cecchini, R.; Panis, C.; Abdelhay, E. NF-kappaB Regulates Redox Status in Breast Cancer Subtypes. *Genes (Basel)*. 2018; 9 (7):320.
22. Pringle, T. D.; Williams, S.E.; Lamb, B.S.; Johnson, D.D.; West, R.L. Carcass characteristics, the calpain proteinase system, and aged tenderness of Angus and Brahman crossbred steers. *J. Anim. Sci*. 1997; 75:2955–2961.

23. Raynaud, P.; Jayat-Vignoles, C.; Laforet, M.P.; and Leveziel, H. Four promoters direct expression of the calpastatin gene. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2005a; 437, 69-77.
24. Raynaud, P.; Gillard, M.; Parr, T.; Bardsley, R.; Amarger, V.; Levéziel, H. Correlation between bovine calpastatin mRNA transcripts and protein isoforms. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2005b; 440: 46-53.
25. Sambrook, J.; Fritsch, E.F and Maniatis, T. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed 1989; Cold Spring Harbor Laboratory, *Cold Spring Harbor*, N.Y.
26. Shintaku, J.; Peterson, J. M.; Talbert, E. .; *et al.* MyoD Regulates Skeletal Muscle Oxidative Metabolism Cooperatively with Alternative NF- $\kappa$ B. 20. *Cell reports*, 2016; 17(2):514–526.
27. Strydom, P. E.; Hope-Jones, M.; Frylinck, L.; Webb, E. C. The effects of a beta-agonist treatment, vitamin D3 supplementation and electrical stimulation on meat quality of feedlot steers. *Meat Science*, 2011; 89: 462–468.
28. Tizioto, P.C.; Coutinho, L.L.; Mourão, G.B, *et al.* Variation in myogenic differentiation 1 mRNA abundance is associated with beef tenderness in Nelore cattle. *Anim Genet*. 2016; 47 (4):491-494.
29. Vohra, M.; Adhikari, P.; Souza, S.C.; Nagri, S.K.; Umakanth, S.; Satyamoorthy, K.; Rai, P.S. CpG-SNP site methylation regulates allele-specific expression of MTHFD1 gene in type 2 diabetes. *Lab Invest*. 2020; 100(8):1090-1101