

Polimorfismos en el extremo 5' del gen WDTC1 y su asociación con el espesor de grasa dorsal en cerdos Landrace

Polymorphisms in the 5' end of WDTC1 gene and its association with backfat thickness in Landrace pigs

FASSA, MB¹; SCHOR, A²; LLOVERAS, MR³; MARRUBE, G¹

¹Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Veterinarias. Cátedra de Genética. ²Universidad de Buenos Aires. Facultad de Agronomía. Cátedra Bovinos de Carnes. ³E. E. A. Pergamino. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.

RESUMEN

El gen WDTC1 (WD tetratricopeptido 1) tiene una función anti-adipogénica, convirtiéndose de esta manera en un gen candidato para explicar la variación fenotípica en caracteres de importancia económica de la producción porcina. El objetivo de este trabajo fue identificar polimorfismos de nucleótidos simples (SNP) en la región 5' no traducida (UTR) del gen WDTC1 y evaluar su asociación con el espesor de grasa dorsal (EGD) en 128 cerdos de raza Landrace. Para la búsqueda de los SNPs se amplificaron y secuenciaron 808 pares de bases (pb) (posición 84.466.928 a 84.467.736 de la secuencia NC010448.4 del GenBank) en 48 cerdos, hallándose siete nuevos SNPs. Los polimorfismos hallados fueron: (i) SNP1 (T/C, posición 84.466.982); (ii) SNP2 (C/T, posición 84.467.066); (iii) SNP3 (T/C posición 84.467.131); (iv) SNP4 (C/T, posición 84.467.201); (v) SNP5 (G/T, posición 84.467.368); (vi) SNP6 (C/A, posición 84.467.402); y (vii) SNP7 (G/A, posición 84.467.413). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA solamente para el SNP1. Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) en 128 cerdos, entre genotipos del SNP1 y EGD. Los resultados obtenidos sugieren que la región 5'UTR de WDTC1 es polimórfica y el SNP1 estaría asociado con la expresión fenotípica del carácter.

Palabras clave: (porcinos), (espesor de grasa dorsal), (gen WDTC1)

Recibido: 11-12-19

Aceptado: 29-06-20

Correspondencia *e-mail*: Valeria Fassa vfassa@fvet.uba.ar

SUMMARY

The WDTC1 (WD and tetratricopeptide repeats 1) gene has an anti-adipogenic function, converting it into a candidate gene to explain the phenotypic variation in traits of economic importance for swine breeding. The objective of this work was to identify and evaluate the effect of single nucleotide polymorphisms (SNPs) located in the 5' UTR region of WDTC1 and its association with backfat thickness (BFT) in 128 Landrace pigs. For the identification of SNPs, 808 bp (from 84,466,928 to 84,467,736 of sequence NC010448.4 of GenBank) were amplified, sequenced and analyzed by multiple alignments. The polymorphisms found were: SNP1 (T / C, 84.466.982), SNP2 (C / T, 84.467.066), SNP3 (T / C 84.467.131), SNP4 (C / T, 84.467.201), SNP5 (G / T, 84.467.368), SNP6 (C / A, 84.467.402) and SNP7 (G / A, 84.467.413). Statistical analysis was performed using ANOVA only for the SNP1. The differences were significant among genotypes of SNP 1 (p-value <0.05) for (BFT). These results indicate that the 5' UTR region of WDTC1 is polymorph and the SNP1 would be associated with the phenotypic expression of the character analyzed.

Keywords: (porcine), (backfat thickness), (WDTC1 gene)

INTRODUCCIÓN

La reducción en la deposición de grasa ha sido uno de los objetivos en el mejoramiento genético porcino. La grasa corporal se encuentra distribuida en diferentes depósitos en el animal, representando la grasa subcutánea el 60 a 70% de la misma. Por su importancia debido a que es el mayor depósito de grasa del organismo y el más sencillo de medir en el animal vivo, ha sido uno de los caracteres más utilizados en los planes de selección.

Las experiencias de mapeo de loci de caracteres cuantitativos (QTL) en familias de referencia (<http://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/SS/index>) y los estudios de asociación de genoma completo (GWAS)^{2,5,7,10,11,12,15} han identificado regiones cromosómicas y polimorfismos de nucleótidos simples (SNPs) asociados a diferentes caracteres de importancia económica que pueden ser incorporados en esquemas de selección asistida por genotipos. En el cromosoma 6 porcino (SSC6) se han hallado numerosas evidencias en relación al contenido de magro^{3, 5, 7, 8}. Debido a su función anti-adipogénica y su posición en 6q21-26, determinado por un panel de células híbridas¹⁶ el gen WDTC1 (WD tetratricopeptide 1) se considera como un gen candidato para explicar los QTL y SNPs hallados en este cromosoma asociados con efecto sobre al carácter EGD.

El gen WDTC1 codifica para la proteína homónima altamente conservada desde *Drosophila melanogaster* hasta humanos¹³. Las proteínas WD40 entre las que se encuentra WDTC1 tienen varias funciones e interactúan como cofactores para regular la transcripción génica. WDTC1 funciona como un nexo en el complejo proteico que participa en el metabolismo adiposo, se encuentra tanto en el citosol como en el núcleo celular. Es en el núcleo donde ejerce su función anti-adipogénica formando un complejo entre las histonas H2A, H4 y la desacetilasa de histona HDAC3, inhibiendo la actividad transcripcional de PPAR γ principal gen responsable de la diferenciación de células precursoras en adipocitos¹³. Groh *et al.*⁶ demostraron que WDTC1 es un componente de la ligasa E3 DDB1-CUL4-ROC1 (CRL4), a través de modelos de adipogénesis en cultivo de células 3T3-L1, comprobaron que la falta de interacción entre WDTC1 y DDB1 conduce a una pérdida de supresión adipogénica por WDTC1, aumento de la acumulación de triglicéridos y expresión de genes relacionados con el metabolismo lipídico. Estos autores concluyeron que el complejo CRL4-WDTC1 promueve la mono-ubiquitinación de la histona H2AK119, lo que sugiere el rol de este complejo en la represión transcripcional durante la adipogénesis.

En porcinos se caracterizó la región 5' UTR del gen WDTC1 y se describieron diferentes secuencias de elementos reguladores en la misma¹⁴. Los SNPs dentro de los elementos reguladores pueden modificar la expresión génica al alterar los sitios de unión de los factores de transcripción.

Debido a que el gen RYR1 (receptor de ryanodina 1) se localiza en el mismo cromosoma presentando un efecto confirmado en la expresión fenotípica del espesor de grasa dorsal, y para no confundir los efectos entre ambos genes, todos los animales que participaron de la experiencia fueron genotipados para el polimorfismo c.1843 C>T de RYR1.

El objetivo de este trabajo fue identificar polimorfismos en la región 5' UTR de WDTC1 y evaluar su asociación en relación con EGD en cerdos de raza Landrace.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron 58 capones y 70 cachorras provenientes de camadas obtenidas a partir de apareamientos dirigidos entre cerdas Landrace y dos padrillos de la misma raza, provistos por el núcleo genético Ceres. El ensayo fue realizado en la EEA Pergamino de INTA en la provincia de Buenos Aires. Todas las cerdas fueron servidas dentro de la misma semana en agosto de 2011. Los nacimientos tuvieron lugar en diciembre del mismo año y los lechones fueron destetados a los 28 días de vida en enero de 2012. Todos los animales fueron criados en iguales condiciones y alimentados con una ración comercial hasta las 8 semanas de edad (25 kg de PV).

Los cerdos fueron alojados en boxes individuales con bebederos tipo chupete y comederos secos de una boca, en los que se ofreció comida fresca a voluntad. La alimentación se llevó a cabo en dos fases: (i) crecimiento, de 30 a 60 kg de PV y (ii) terminación, de 60 a 110 kg de PV con raciones estándares de maíz, soja y concentrados comerciales. Las mismas fueron formuladas para cubrir los requerimientos nutricionales de los cerdos en función del período de

desarrollo: 3300 Kcal de energía metabolizable (EM)/kg, 18% de proteína, 1,05% de lisina, 0,78% de calcio y 0,32% de fósforo en la fase de crecimiento y 3200 kcal de EM/kg, 16,5% de proteína, 1 % de lisina, 0,75% de calcio y 0,3% de fósforo en la fase de terminación.

Una vez alcanzados los 90 kg de PV, se procedió a la toma del EGD con un equipo ultrasonido Lean Meater Renco, definiéndose dos variables: (i) P2, es decir, a la altura de la primera vértebra lumbar desplazada 5 cm de la línea media, y (ii) EG3, que corresponde al promedio de 3 mediciones realizadas a la altura del codo, la última costilla y el glúteo medio, también desplazadas a 5 cm de la línea media.

Extracción de ADN

De cada animal se extrajeron 5 ml de sangre periférica de la vena yugular, con anticoagulante EDTA. La extracción de ADN se realizó mediante el kit comercial Easy-DNA™ gDNA Purification Kit (Inbio-Highway, Tandil, Argentina) a partir de 200 µl de sangre entera. El control de calidad se realizó en geles de agarosa al 0,8% teñidos con Gel Red™ Nucleid Acid Gel Stain (Biotium, USA) y visualizados en Geldoc-it Imaging System UVP. La cuantificación del ADN obtenido se realizó mediante el equipo Nanodrop Lite Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA), midiendo absorbancia a 260 nm.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se amplificaron 808 pb comprendidas entre las posiciones 84.466.928 y 84.467.736 de la secuencia NC_010448.4 del GenBank. El diseño de los cebadores para la reacción se realizó por medio del programa Primer3: forward 5'GCTGGAAGTGCCTCTTCTTT 3' y reverse 5'AGATAAACAGAGGAGGAGGAGG 3'.

La reacción de PCR se llevó a cabo en un equipo Techne TC 412 (Barloworld Scientific, UK). Para cada reacción a 70 ng de ADN se agregaron 5 µl de Buffer 5X, 0.4 M de cada cebador, 5U de MyTaq DNA Polymerase™ (Bio-

line, USA) y agua en cantidad suficiente para un volumen final de 25 µl. El ciclado fue de: 95 °C 1 min, 35 ciclos de 95 °C 15 seg, 58 °C de annealing 15 seg, 10 seg a 72 °C de extensión y una extensión final de 4 min a 72 °C.

Secuenciación del producto de PCR

Para la purificación del producto de PCR se utilizó Wizard® SV Gel and PCR clean-Up system (Promega, USA). La secuenciación se realizó con el equipo ABI3130XL (INTA Unidad de Genómica y Biotecnología). Para la reacción de secuenciación se utilizaron los mismos cebadores que para la reacción de PCR. Las secuencias obtenidas se analizaron mediante un alineamiento múltiple (Clustalw) mediante el programa BioEdit v7.0.9 utilizando la secuencia de referencia NC_010448.4 (GenBank).

Determinación de genotipos

1. *SNP c.1843 C>T del gen RYR1* Los genotipos del SNP c.1843 C>T del gen RYR1 se determinaron por PCR-HRM (Polymerase Chain Reaction-High Resolution Melting). Cada reacción contuvo 10 µl de MeltDoctor® HRM Master Mix (Applied Biosystems®, USA), 5µM de cada oligonucleótido (Forward: 5'GTGCTGGATGTCCTGTGTTCCCT 3' y Reverse: 5'CTGGTGACATAGTTGATGAGGTTTG 3') y 30 ng de ADN en 20 µl de volumen final. Se realizó el ciclado en un equipo StepOne Real Time PCR (Applied Biosystem®, USA) con 40 ciclos de 95 °C 15 seg, 60 °C 1 min, seguido de una curva continua de fusión con incrementos de 0.3 °C desde 65 °C a 95 °C. Las salidas fueron analizadas con el software High Resolution Melting V3.1 (Applied Biosystems®, USA).

2. *SNP1 del gen WDTC1*. Se determinaron genotipos para el SNP1 mediante la técnica de PCR-RFLP. Se utilizó el programa dCAPS-Finder 2.0 para diseñar primers modificados con un sitio de corte para la endonucleasa de restricción XhoI: Forward 5'GAACAGCAGTAACTCCACCAGT 3' y Reverse 5'TACACCGGGTGGCCTGGA 3' para amplificar un producto de 102 pares de bases (pb). Los ge-

notipos se visualizaron por medio de geles de poliacrilamida al 14% teñidos con Gel Red™ Nucleid Acid Gel Stain (Biotium, Fremont, USA), presentando el genotipo TT una banda de 102 pb, el genotipo CT bandas de 102, 84 y 18 pb y el genotipo CC bandas de 84 y 18 pb.

Análisis Estadístico

Los datos fueron analizados por ANOVA con el paquete estadístico InfoStat⁴ de acuerdo al siguiente modelo:

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \gamma_j + \beta_k + e_{ijkl}$$

dónde:

Y_{ijkl} : representa la variable respuesta (valor fenotípico)

μ : media general

α_i : efecto del iésimo SNP1 del gen WDTC1

γ_j : efecto del jtaésimo SNP c.1843C>T del gen RYR1

β_k : efecto del késimo sexo

e_{ijkl} : es el error experimental

El contraste de medias se realizó mediante test de Tukey ($\alpha=0,05$).

RESULTADOS

A partir de la comparación de las secuencias obtenidas de 48 animales se detectaron 7 polimorfismos del tipo SNPs en la región 5'UTR del gen WDTC1, según Tabla 1. Las frecuencias alélicas y genotípicas para cada polimorfismo se indican en la Tabla 2. La frecuencia genotípicas halladas para el SNP C/T del gen RYR1 fueron: CC 0,95 y CT 0,05.

Debido a que se hallaron los tres genotipos presentes en la muestra en estudio para el SNP1 (Tabla 1) y además dicho SNP modifica un potencial sitio de unión al factor de transcripción STAT, el cual está involucrado en el proceso de adipogénesis, se decidió incrementar el número de animales a genotipificar para este polimorfismo y realizar un análisis de asociación con los rasgos de interés. La frecuencia genotípica para los 128 animales analizados para el SNP1 fue: 0,13 (CC); 0,46 (CT) y 0,41 (TT).

Tabla 1. Polimorfismos identificados, sus posiciones en la secuencia de referencia (GenBank) y los potenciales factores de transcripción asociados

	SNP1	SNP2	SNP3	SNP4	SNP5	SNP6	SNP7
Posición en NC_010448.4	84.466.982	84.467.066	84.467.131	84.467.201	84.467.368	84.467.402	84.467.413
SNP	T>C	T>C	T>C	T>C	T>G	C>A	G>A
Factor de transcripción ¹	STAT		KLF15	CREB	NF-kB		

¹Potencial sitio de unión para los factores de transcripción: STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription), KLF (Kruppel Like Factor 15), CREB (cAMP-Responsive Element Binding protein) y NF-kB (Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells).

Tabla 2. Frecuencias alélicas y genotípicas para los SNPs hallados en la región 5'UTR del gen WDTC1

SNP	Frecuencias genotípicas			Frecuencias alélicas	
	CC	CT	TT	C	T
SNP1	0,024	0,452	0,524	0,754	0,254
	CC	CT	TT	C	T
SNP2	0,810	0,190	0,000	0,905	0,095
	CC	CT	TT	C	T
SNP3	0,810	0,190	0,000	0,905	0,095
	TT	TC	CC	T	C
SNP4	0,810	0,190	0,000	0,905	0,095
	CC	CT	TT	C	T
SNP5	0,714	0,286	0,000	0,857	0,143
	GG	GT	TT	G	T
SNP6	0,810	0,190	0,000	0,905	0,095
	CC	CA	CC	C	A
SNP7	0,024	0,048	0,928	0,048	0,952
	AA	AG	GG	A	G

Los resultados del análisis de asociación entre los diferentes genotipos para el SNP1, el SNP C/T del gen RYR 1, sexo y los caracteres productivos se presentan en la Tabla 3. Se encontraron diferencias significativas entre genotipos del SNP1 (p-valor <0,05) para los caracteres P2 y EG3. Se hallaron también diferencias entre medias para ambos caracteres, estando el menor espesor de grasa asociado al genotipo CC. No se hallaron diferencias significativas para genotipos del SNP c.1843 del gen RYR1 (p>0.05) y si como, era de esperar para sexo p<0.05).

DISCUSIÓN

El proceso de adipogénesis es complejo e involucra una cascada de eventos con la actividad de numerosos genes que controlan la determinación y desarrollo del tejido adiposo. El cromosoma 6 porcino se caracteriza por la presencia de numerosos genes relacionados con este proceso, e.g. RYR1, FTO, FABP3, LEP, LEPR y LEPROT entre otros.

El rol del gen WDTC1 en el proceso de adipogénesis ha sido estudiado en diferentes especies^{6, 13}. En porcinos, Wu *et al.*¹⁴, identificaron secuencias para factores de transcripción asociados a la diferenciación del tejido lipídico

en la región 5' UTR de WDTC1. Entre estos factores encontramos aquellos que tienen un rol positivo como reguladores de la adipogénesis (KLF 4, 5, 6, 9 y 15) en especial por la activación de los genes PPAR γ , C/EBP α y β . Otros factores presentan un efecto negativo como KLF 2, 3 y 7 por la inhibición de la transcripción de PPAR γ , FASN, C/EBP α . STAT corresponde a una familia de factores de transcripción que involucra a STAT1, 2, 3, 4, 5A, 5B y 6, los cuales en respuesta a la estimulación de varios receptores son fosforilados en sus residuos de tirosina produciendo su translocación al núcleo celular para actuar como factores de transcripción de numerosos genes. En especial STAT 5 tiene un rol destacado en el proceso de adipogénesis ya que modula la expresión de PPAR γ al inducir su expresión y la posterior diferenciación de células mesenquimatosas en adipocitos⁹.

Las diferencias significativas entre genotipos del SNP1 (p <0,05) para EGD medida en P2 y EG3 (Tabla 2) pueden ser explicadas debido a que dicho polimorfismo se localiza en la secuencia consenso para el factor de transcripción STAT. Con respecto al SNP de RYR1 cuyo efecto sobre contenido de magro y PSE ha sido confirmado en las diferentes poblaciones

Tabla 3: Medias y desvíos estándar de EGD según genotipos del SNP1.

Variable	Efecto	Medias y desvío estándar para genotipos del SNP1 y sexo			F	P-Valor
		TT	TC	CC		
P2	SNP1	13.04 ± 0.69 AB	14.16 ± 0.5 B	12.26 ± 0.72 A	4.85	0.0094
	SEXO	Capones	Cachorras			
		13.80 ± 0.52 B	12.25 ± 0.51 A		13.16	0.0004
EG3	SNP1	TT	TC	CC		
		17.37 ± 0.72 AB	18.51 ± 0.51 B	16.98 ± 0.74 A	5.39	0.0057
	SEXO	capones	cachorras			
		18.47 ± 0.53 A	16.52 ± 0.52 B		19.22	0.0001

porcinas, en nuestro estudio esas diferencias no se han detectado debido a la baja frecuencia de los animales heterocigotas y ausencia de los homocigotas para la mutación. Cherel *et al.*³, propusieron que si bien los animales heterocigotas para el SNP de RYR1 podrían contribuir, no explican por sí solos la disminución del EGD. Estos autores señalaron la presencia de otros polimorfismos segregando en forma conjunta con RYR1. De acuerdo a esta hipótesis, y por su posición en el genoma, los SNPs detectados en WDTC1 podrían estar asociados a la evidencia hallada por Fontanesi *et al.*⁵, en SSC6 en los bloques de 65,1-65,4; 70,6-72,5 y 100.7 a 101.8 Mb para EGD en Italian Large White. Estos autores señalaron como gen candidato a FTO pero no lograron confirmar esta asociación. Lee *et al.*⁸ en un estudio con cerdos cruza entre una raza nativa de Corea y Landrace confirmaron la presencia de SNPs en la región comprendida entre 88.750.779 y 103.764.358 pb entre los marcadores SW2098 y SW1881 en SSC6 para el carácter EGD.

En el presente estudio se han detectado polimorfismos en la región no codificante 5' del gen WDTC1 porcino, hallándose asociación del SNP1 con el carácter EGD, medido en P2 y EG3. Es necesaria la validación de este efecto en otras poblaciones porcinas para ampliar nuestro conocimiento sobre la arquitectura genética de dicho rasgo cuantitativo.

CONCLUSIÓN

El extremo 5' UTR del gen WDTC1 es polimórfico, identificándose en dicha región 7 nuevos SNPs al comparar las secuencias obtenidas en 48 cerdos Landrace. El SNP1 (T/C) presentó una asociación positiva con el carácter EGD.

FINANCIAMIENTO

Proyectos: INTA PNPA 1126033 (2013-2019) y UBACyT 2016-2019 20020150100165BA

BIBLIOGRAFÍA

1. Brenig, B. and Brem, G. Genomic organization and analysis of the 5' end of the porcine ryanodine receptor gene (RYR1). *FEBS Lett.* 1992; 298(2,3):277-279.
2. Chen D.; Wu P.; Yang Q., et al. A genome-wide association study for Backfat thickness to 100 kg and Loin muscle thickness in domestic pigs based on genotyping by sequencing. *Physiol Genomics.* 2019; 51(7): 261-266.
3. Cherel, P.; Pires, J.; Glénisson, J. et al. Joint analysis of quantitative trait loci and mayor effect causative mutations affecting meat quality and carcass composition traits in pigs. *Genetics.* 2011; 12: 76-90.
4. Di Rienzo, J.; Casanoves, F.; Balzarini, M.; Gonzales, L.; Tablada, M.; Robledo, C. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. 2009.
5. Fontanesi, L.; Galimberti, G.; Calò, et al. Identification and association analysis of several hundred single nucleotide polymorphisms within candidate genes for backfat thickness in Italian Large White pigs using a selective genotyping approach. *J. Anim. Sci.* 2012; 90 (8): 2450-2464.
6. Groh, B.S.; Yan, F.; Smith, M.D.; et al. The antiobesity factor WDTC1 suppresses adipogenesis via the CRL4WDTC1 E3 ligase. *EMBO Rep.* 2016; 17(5): 638-647.
7. Guo, Y.; Qiu, H.; Xiao, S. et al. A genome-wide association study identifies genomic loci associated with backfat thickness, carcass weight, and body weight in two commercial pig populations. *J Appl Genet.* 2017; 58(4):499-508.
8. Lee, K.T.; Byun, M.J.; Kang, K.S.; et al. Single nucleotide polymorphism association study for backfat and intramuscular fat content in the region between SW2098 and SW1881 on pig chromosome 6. *J. Anim. Sci.* 2015; 90: 1081-1087.
9. Mota de Sa, P.; Richard, A.J.; Hang, H.; Stephens, J.M. Transcriptional Regulation of Adipogenesis. *Compr Physiol.* 2017; 7(2):635-674.
10. Okumura, N.; Matsumoto, T.; Hayashi, T. et al. Genomic regions affecting backfat thickness and anon bone circumference identified by genome wide association study in a Duroc pig population. *Animal Genetics.* 2012; 44: 454-457.
11. Rothhammer, S.; Kremer, P.V.; Burneau, M. et al. Genome-wide QTL mapping of nine body composition and bone mineral density traits in pigs. *Gen. Select. Evol.* 2014; 46: 68-79.

12. Sanchez, M.P.; Tribout, T.; Iannuccelli, N. et al. A genome-wide association study of production traits in a commercial population of Large White pigs: evidence of haplotypes affecting meat quality. *Gen. Select. Evol.* 2014; 46:12-24.
13. Suh, J.M., Zeve, D., McKay, R., et al. Adipose is a conserved dosage-sensitive anti-obesity gene. *Cell Metab.* 2007; 6(3): 195–207.
14. Wu, Y., Long, Q., Feng, B., et al. Molecular cloning and characterization of anti-obesity gene adipose in pig. *Gene.* 2012; 509: 110-119.
15. Yang, Q.; Wu, P.; Wang, K. et al. SNPs associated with body weight and backfat thickness in two pig breeds identified by a genome-wide association study. *Genomics.* 2018; doi: 10.1016/j.ygeno.2018.11.002. [Epub ahead of print]
16. Yerle, M.; Pinton, P.; Robic, A.; et.al Construction of whole genome radiation hybrid panel for high resolution gene mapping in pigs. *Cytogenet. Cell. Genet.* 1998; 82: 182- 188.