

Caracterização dos éxons 2 e 3 do gene JY-1 em bovinos¹

Gregório Miguel Ferreira de Camargo², Fernanda Maria Monsalves Gil³, Larissa Zetoni³, Camila Urbano Braz³, Luciana Correia de Almeida Regitano⁴, Humberto Tonhati⁵

¹Parte da dissertação de mestrado/tese de doutorado do primeiro autor, financiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp)

²Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento Animal – FCAV/Unesp-Jaboticabal. Bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp). e-mail: gregoriocamargo@hotmail.com

³Pós-graduando em Genética e Melhoramento Animal/ FCAV/Unesp-Jaboticabal

⁴Pesquisadora científica do CPPSE/Embrapa - São Carlos

⁵Professor Titular do Departamento de Zootecnia - FCAV/Unesp-Jaboticabal

Resumo: A proteína JY-1 é específica do oócito de espécies uníparas, ela possui papel regulador na camada de células da granulosa e atua no início do desenvolvimento do embrião. Estudaram-se, por sequenciamento dos fragmentos amplificados por dois pares de *primers*, os éxons 2 e 3 do gene JY-1 em vinte novilhas da raça Nelore pouco aparentadas. Foram encontrados treze polimorfismos, sendo 12 do tipo SNP e uma deleção. Três dos SNPs encontravam-se na região codificante do éxon 2 e causam a troca dos aminoácidos 1 (metionina-lisina), 13 (glicina-ácido aspártico) e 15 (leucina-isoleucina), sendo que nos aminoácidos 1 e 13, há mudança dos grupos a que pertencem. Os polimorfismos detectados podem alterar o papel biológico da proteína e, por conseguinte influenciar na expressão de características reprodutivas de bovinos de corte.

Palavras-chave: *Bos taurus indicus*, deleção, sequenciamento, SNP, troca de aminoácido

Characterization of exon 2 and 3 of JY-1 gene in cattle.

Abstract: The JY-1 protein is specific of the oocyte of species with simple ovulation. It has a key role in the regulation of the granulosa cells functions and it also influences the early embryo development. The exons 2 and 3 of JY-1 gene were amplified using two pairs of primers and were studied by sequencing twenty unrelated Nelore heifers. Thirteen polymorphisms were found, being twelve SNPs and one deletion. Three SNPs are in CDS region of exon 2 and cause a change in the aminoacids 1 (metionin - lysine), 13 (glycine – aspartic acid) and 15 (leucin – isoleucin). In aminoacids substitutions 1 and 13, there is a change in the group of aminoacids. The polymorphisms detected may alter the biological paper of the protein and influence the expression of reproductive traits in beef cattle.

Keywords: *Bos taurus indicus*, deletion, sequencing, SNP, aminoacid change

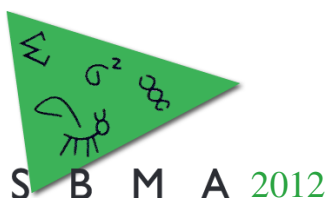
Introdução

A proteína JY-1 foi descrita por BETTEGOWDA et al. (2007) e é específica do oócito, possuindo importante papel regulador na camada de células da granulosa e no início do desenvolvimento do embrião. Foi a primeira vez que uma proteína específica de origem materna para uma espécie de ovulação simples, ou seja, de fêmeas uníparas foi descrita.

Outros genes específicos de proteínas para espécies com ovulação múltipla e que atuam na foliculogênese e no desenvolvimento inicial do embrião já foram descritos em espécies multíparas como ratos de laboratório, mas estudos indicam que esses genes para proteínas que atuam especificamente no oócito sejam diferentes para espécies multíparas e uníparas (MOORE et al., 2004).

Segundo BETTEGOWDA et al., (2007), o gene da proteína JY-1 nos bovinos possui três éxons cujos comprimentos são 25 pb, 92 pb e 1400 pb respectivamente indicando o primeiro, o segundo e o terceiros éxons. Eles são separados por dois íntrons cujos comprimentos são 12,8 kb e 1,5 kb.

Marcadores genético-moleculares aumentam a acurácia de predição do valor genético aditivo de características analisadas e reduzem o intervalo de gerações, aumentando assim o ganho (REGITANO e COUTINHO, 2001).



IX Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

João Pessoa, PB – 20 a 22 de junho de 2012

Assim, objetivou-se verificar a existência de polimorfismos no gene candidato e verificar a variabilidade do *locus* estudado.

Material e Métodos

As extrações de DNA foram feitas a partir de folículo piloso a partir da metodologia de Fenol-Clorofórmio-Álcool Isoamílico. Os *primers* utilizados na amplificação foram 5' CTTATGTGTGGACAGGGAAGC3' e 5'GTTGCTGGGGTTGACTGATT3' que amplificaram uma região de 345pb que compreendia região codificante do éxon 2 e 5'ATCAAACACTGAACAGGGCAGA3' e 5'AAGTATGACAAGAGATACGGTCAGG3' que amplificaram uma região de 373 pb que compreendia uma região 3'UTR do éxon 3.

As reações de amplificação tinham um volume final de 15µL seguindo protocolo da GoTaq Colorless Master Mix (Promega). Os ciclos de amplificação seguiram a programação: 95°C por 5 min, 95°C por 1 min, 57°C (para ambos os pares de *primers*) por 1 min, 72°C por 1 min (35 ciclos) e 72°C por 5 min.

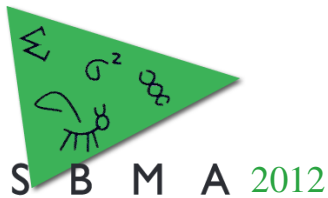
O produto de PCR foi sequenciado a partir de ambos *primers* usando a técnica de terminação de cadeia por dideoxynucleotídeos (ddNTPs). Para a análise e identificação dos polimorfismos, as seqüências obtidas foram analisadas e visualizadas com os programas CodonCode Aligner.

Resultados e Discussão

Ambos pares de primers amplificaram as regiões específicas dos éxons 2 e 3 do gene JY-1. Para os produtos amplificados, foram utilizadas 20 novilhas menos aparentadas entre si na prospecção dos SNPs por sequenciamento. Para o par de *primers* que amplificava o éxon 2, foram identificados nove polimorfismos, sendo oito do tipo SNP e uma deleção. Para o par de *primers* que amplificava o éxon 3, foram identificados quatro polimorfismos do tipo SNP. Segue a Tabela 1 com a descrição e localização dos SNPs.

Tabela 1 Indicação do polimorfismo, região, tipo de substituição, troca de aminoácidos e número de acesso das seqüências depositadas no NCBI.

Polimorfismo	Região	Tipo de substituição	Troca de aminoácido	Número de acesso no NCBI
1	Intron 1	G/A	-	JQ866905
2	Exon 2-codificante	T/A	metionina/lisina	JQ866905
3	Exon 2-codificante	G/A	glicina/ácido aspártico	JQ866905
4	Exon 2-codificante	C/A	leucina/isoleucina	JQ866905
5	Exon 2-codificante	T/C	-	JQ866905
6	Intron 2	T/C	-	JQ866905
7	Intron 2	A/T	-	JQ866905
8	Intron 2	G/-	-	JQ866905
9	Intron 2	A/G	-	JQ866905
10	Exon 3 - 3'UTR	T/C	-	JF262042.2



IX Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

João Pessoa, PB – 20 a 22 de junho de 2012

11	Exon 3- 3'UTR	A/G	-	JF262042.2
12	Exon 3- 3'UTR	T/C	-	JF262042.2
13	Exon - 3'UTR	G/C	-	JF262042.2

Observa-se que os *loci* estudados são altamente polimórficos como previamente analisado por de Camargo et al. (2011) e Tonhati et al. (2011) para outras regiões do mesmo gene. Particularmente interessante, os SNPs 2, 3 e 4 promovem substituições nos aminoácidos 1 (metionina/lisina), 13 (glicina/ácido aspártico) e 15 (leucina/isoleucina). No caso dos aminoácidos 1 e 13, há inclusive mudança na propriedade (grupo) a que pertencem os aminoácidos. Isso pode alterar a função biológica da proteína.

Dado ao papel desempenhado pela proteína e as variações encontradas no presente trabalho, o gene JY-1 pode influenciar características reprodutivas em bovinos de corte. A genotipagem de um número maior de animais e sua associação com essas características é um favor desejado para a validação dessa hipótese, servindo o presente estudo de embasamento para dar continuidade a esse estudo.

Conclusões

Foi feita a caracterização dos éxons 2 e 3 (parcial) do gene JY-1 em bovinos da raça Nelore com descoberta de treze polimorfismos para o gene na espécie. Há três SNPs no éxon 2 que promovem trocas de aminoácidos, podendo influenciar o papel biológico da proteína e influenciar características reprodutivas. Ressalta-se que estudos posteriores com a identificação dos genótipos em um número maior de animais e associação dos polimorfismos encontrados faz-se necessário e é interessante de ser feito.

Literatura citada

- BETTEGOWDA, A. et al JY-1, an oocyte-specific gene, regulates granulosa cell function and early embryonic development in cattle **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.104, p.17602-17607, 2007.
- DE CAMARGO, G. M. F. et al Characterization of exon 1 of JY-1 gene in *Bos taurus indicus*. In: REUNIÓN ALPA, 22, 2011, Montevideo. **Anais...** Reunión ALPA [2011]. (CD-ROM).
- MOORE, R.K.; ERICKSON, G.F.; SHIMASAKI, S. Are BMP-15 and GDF-9 primary determinants of ovulation quota in mammals? **Trends Endocrinology and Metabolism**, v.15, p. 356–361, 2004.
- REGITANO, L.C. de A.; COUTINHO, L.L. (Ed.) **Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 2001. 215p.
- TONHATI, H. et al. Partial characterization of exon 3 of JY-1 gene in *Bos taurus indicus*. In: REUNIÓN ALPA, 22, 2011, Montevideo. **Anais...** Reunión ALPA [2011]. (CD-ROM).