

Estudio de expresión diferencial de genes y distribución de la vinculina en ovario de cerdas

M. Martínez-Giner*, R.N. Pena*, J. Casellas*, I. Balcells**, A. Fernández***, J.L. Noguera*

* Genètica i Millora Animal. IRTA. Lleida. Spain

** Departament de Ciència Animal i dels Aliments. Facultat de Veterinària. UAB. Bellaterra. Spain

*** Departamento de Mejora Genética Animal. SGIT-INIA. Madrid. Spain

E-mail: maria.martinez@irta.cat

Resumen

El objetivo de este estudio es analizar las diferencias en la expresión de genes y proteínas en tres estadios reproductivos en cerdas. Con el fin de caracterizar los cambios en los perfiles de expresión, se hibridó RNA de ovario de cerdas en celo, 15 y 45 días de gestación en microchips porcinos. Se detectaron diferencias de expresión en 281 genes (probabilidad posterior $<10^{-11}$) entre los tres momentos reproductivos analizados en ovario. Uno de estos genes, la vinculina, mostró una expresión 100 veces mayor en celo comparado con 45 días de gestación. Por ello, fue escogido para realizar un análisis de expresión proteica mediante inmunohistoquímica y análisis *western blot*. Los resultados obtenidos mediante inmunohistoquímica muestran mayor cantidad de vinculina en celo que a 30 días de gestación. Para esta misma proteína, los resultados sugieren la existencia de diferencias significativas entre ovarios de cerdas en celo y a 45 días de gestación mediante la técnica *western blot*.

Palabras clave: Vinculina, Inmunohistoquímica, *Western blot*, *Microarrays*

Summary

Study on the differential gene expression and distribution of the vinculin in the ovary of sows

The objective of this experiment is to study genes and proteins differing across reproductive stages in swine. RNA from ovary, from sows on heat, 15 and 45 days of pregnancy have been hybridised in porcine oligonucleotide microchips to characterize changes in gene expression profile between different reproductive stages. Expression differences in 281 genes (posterior probability $<10^{-11}$) have been found between expression at different stages in ovary. One of these genes, vinculin, showed 100 times more expression on heat than at 45 days of pregnancy, so we chose that gene for immunohistochemistry and *western blot* analysis. On immunohistochemistry we found that ovaries of sows on heat showed stronger vinculin staining than ovaries stroma of sows at 30 days of pregnancy. On *western blot*, significant differences appeared only between heat and 45 days of pregnancy.

Key words: Vinculin, Immunohistochemistry, *Western blot*, *Microarrays*

Introducción

El tamaño de camada es un carácter de gran importancia económica en porcino. Por ello, conocer la arquitectura genética del tamaño de camada, así como de sus componentes principales, como la tasa de ovulación, puede resultar de gran ayuda en la selección de la prolificidad. Además, el análisis proteómico de aquellos genes diferencialmente expresados permite comprobar si la expresión diferencial de los genes se corresponde con una expresión diferencial a nivel proteico. Con el objetivo de caracterizar dichas diferencias, se realizaron experimentos de *microarrays*, inmunohistoquímica y *western blot* con tejido ovárico de cerdas.

Material y métodos

Microarrays

Se recogieron muestras de ovario de un total de 22 hembras F₂ provenientes de un cruce de una población de raza *Ibérica* con una de raza china *Meishan*. Las hembras se encontraban en distintos momentos del ciclo reproductivo (celo, 15 y 45 días de gestación, tabla 1). Se extrajeron muestras de ARN que fueron hibridadas en *microchips* de porcino

(*GeneChip® Porcine Genome Array*, Affymetrix). El control de calidad fue realizado con los paquetes *Affy* y *Simpleaffy* del programa Bioconductor (R, www.bioconductor.org). Todos los *arrays* pasaron con éxito el control de calidad y fueron utilizados en los análisis posteriores, que consistieron en un procesamiento previo de los datos con el algoritmo RMA (Bolstad *et al.*, 2003) y un análisis estadístico utilizando estadística Bayesiana (GEAMM; Casellas *et al.*, 2008). Las diferencias se testaron mediante el modelo mixto siguiente, $y = XA + Z_1G + Z_2TE + e$, donde y era el vector de registros de expresión génica, X , Z_1 y Z_2 eran las matrices de incidencias para los efectos de *array* (A), gen (G) e interacción entre tejido y estado fisiológico dentro de gen (TE), (para este trabajo sólo se tuvieron en cuenta los niveles de TE correspondientes al ovario), y e era el vector de residuos.

Inmunohistoquímica

Utilizamos muestras de ovario de 4 cerdas comerciales, dos en celo y dos a los 30 días de gestación (tabla 1). El anticuerpo primario utilizado fue anti-vinculina monoclonal de ratón (clon 7F9, Chemicon) en una dilución 1:800, y como anticuerpo secundario anti-IgG de ratón biotinilado (Vectastain ABC kit, Vector).

Tabla 1. Número y tipo de cerdas usadas en cada experimento
Table 1. Number and type of sows used in each experiment

Tipo de cerdas Estadio reproductivo	Microarray Cruce F2	Western blot Cruce F2	Inmunohistoquímica Comercial
Celo	8	8*	2
15 días de gestación	8	8*	
30 días de gestación		8*	2
45 días de gestación	6	6*	
60 días de gestación		6*	

* Las muestras para el análisis western blot no están totalmente analizadas.

Western blot

Utilizamos muestras de ovario proveniente de los animales F₂ utilizados en el experimento de *microarrays* (celo, 15 y 45 días de gestación), además de otras hembras F₂ a 30 y 60 días de gestación (tabla 1). La extracción de proteína se realizó según el protocolo descrito en Lonergan *et al.* (2001). El anticuerpo primario utilizado fue anti-vinculina monoclonal de ratón (clon 7F9, Chemicon) en una dilución 1:1000 y como control utilizamos anti-β-actina monoclonal de ratón (ab8226, abcam) en una dilución 1:2000. El anticuerpo secundario fue anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa (A2554, Sigma) en una dilución 1:400. El análisis de los datos se realizó mediante el modelo siguiente, $y = XG + Z_1E + e$ donde y era el vector de registros de intensidad de banda, X y Z_1 eran las matrices de incidencias para los efectos de gen (G) y estadio reproductivo (E) y e era el vector de residuos.

Resultados y discusión

Microarrays

Los resultados de *microarrays* mostraron una gran cantidad de genes diferencialmente expresados en ovario a lo largo del ciclo reproductivo de la cerda (figura 1). Se observaron 2.829 genes con una probabilidad posterior de semejanza menor a 0,01 y 1,5 veces mayor/menor expresión. Siendo más restrictivos y tomando una probabilidad posterior menor a 10⁻¹¹ y un ratio de 10 veces mayor o menor expresión, aún observamos 281 genes diferencialmente expresados. Uno de estos genes fue el de la vinculina, que mostró una expresión más de 100 veces mayor en celo comparada con 45 días de gestación. Por esta razón fue escogida para realizar un análisis de expresión proteica mediante inmunohistoquímica y *western blot*. La vinculina es una proteína importante en la unión entre células y está presente sobre todo en los tejidos epiteliales.

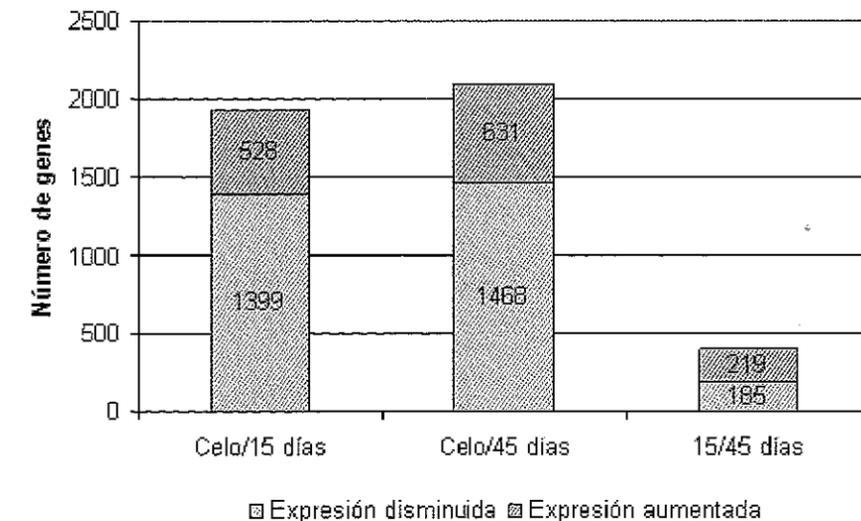


Figura 1. Número de genes diferencialmente expresados al comparar distintos estadios reproductivos con una probabilidad posterior <0,01 y un ratio >1,5 ó <0,66.
Figure 1. Number of genes differentially expressed by comparison between reproductive stages with posterior probability $p < 0.01$ and ratio > 1.5 or < 0.66 .

Inmunohistoquímica

Observamos una mayor cantidad de vinculina en las células de la teca y la granulosa en todos los estadios de desarrollo folicular y en epitelio, comparado con el estroma ovárico. Al ser la vinculina una proteína importante en la formación de las uniones entre células, resulta esperable encontrar niveles más altos en células con mayor adhesión, como es el epitelio. También observamos una mayor cantidad de vinculina en ovarios de hembras en celo (figura 2) comparado con los ovarios de hembras a 30 días de gestación, lo que corrobora los resultados obtenidos en el experimento de *microarrays*,

relacionándose así el nivel de expresión génica con la expresión de proteínas.

Western blot

Los resultados preliminares obtenidos con la técnica del *western blot* sugieren la existencia de diferencias entre el ovario de animales en celo y a 45 días de gestación ($P < 0,05$), mientras que no aparecen diferencias entre hembras gestantes a 15, 30 y 45 días de gestación (figura 3). Sin embargo, el número de muestras es por ahora insuficiente, y los errores estándar son elevados. Actualmente, estamos realizando el análisis de más muestras del experimento.

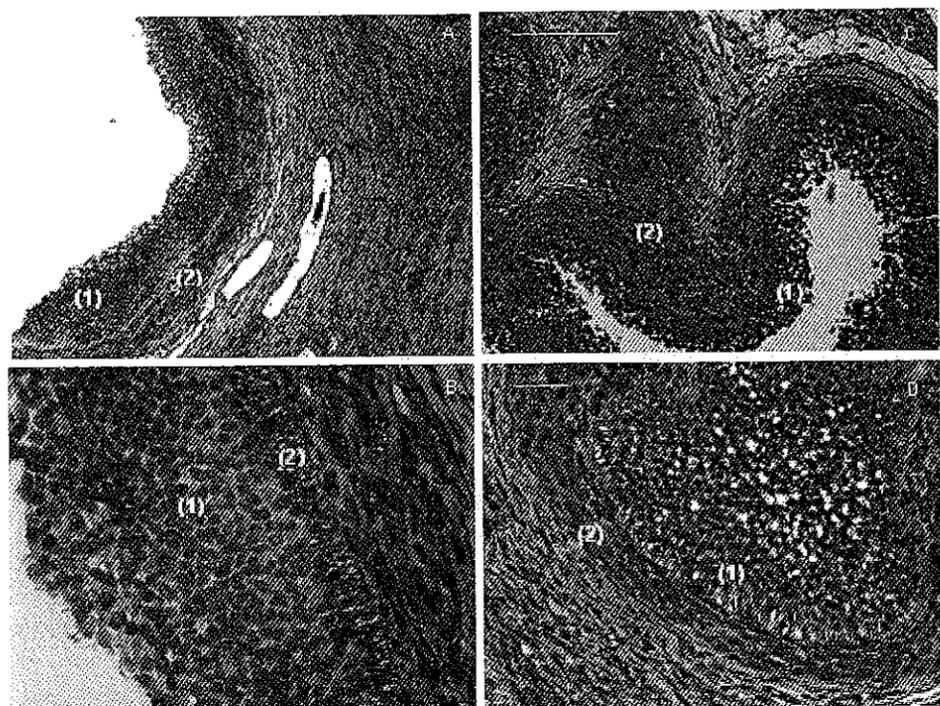


Figura 2. Inmunohistoquímica de la granulosa (1) y la teca (2) de ovario usando anticuerpo anti-vinculina. A y B a 30 días de gestación (A: 10x; B: 40x). C y D en celo (C: 10x; D: 20x).
Figure 2. Immunohistochemistry of granulosa (1) and theca cells (2) of ovary using anti-vinculin antibody. A and B at 30 days of pregnancy (A: 10x; B: 40x). C and D at heat (C: 10x; D: 20x).

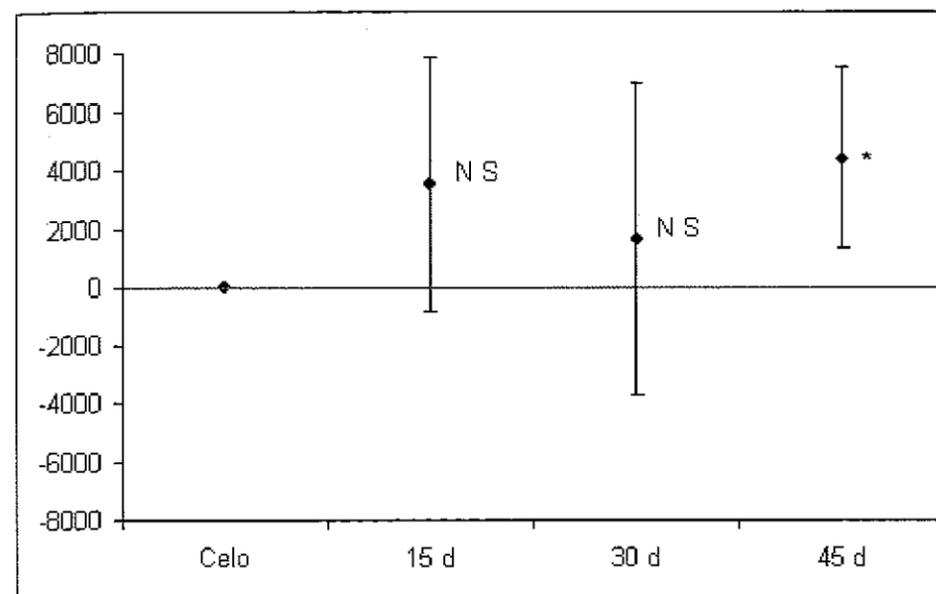


Figura 3. Representación gráfica de la intensidad de bandas por estadio reproductivo. N.S.: no significativo; *: diferencias significativas con $P < 0,05$.

Figure 3. Graphic representation of intensity of bands by reproductive stages. N.S.: non-significant; *: significant differences with $P < 0.05$.

Agradecimientos

Este trabajo se enmarca en el proyecto AGL2004-08368-C03, financiado con fondos del Ministerio de Educación y Ciencia. María Martínez Giner disfruta de una beca FPI del MEC. Así mismo, agradecemos la colaboración de Luis Varona, Ángela Cánovas y de todo el personal del Laboratorio de Medicina de la Reproducción y el Desarrollo de la Universidad de Sheffield.

Bibliografía

- Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP, 2003. A Comparison of Normalization Methods for High Density Oligonucleotide Array Data Based on Bias and Variance. *Bioinformatics*, 19(2), 185-193.
- Casellas J, Ibáñez-Escriche N, Martínez-Giner M, Varona L, 2008. GEAMM v1.4: a versatile program for mixed model analysis of gene expression data. *Animal Genetics*, 39, 89-90.
- Lonergan SM, Huff-Lonergan E, Rowe LJ, Kuhlers DL, Jungst SB, 2001. Selection for lean growth efficiency in Duroc pigs influences pork quality. *J. Anim. Sci.*, 79, 2075-2085.

(Aceptado para publicación el 28 de abril de 2008)