

## **Treball Fi de Grau**

**Identificació de gens candidats i variants genètiques  
associades a caràcters d'eficiència alimentaria en conills**

Pere Puigdomènech Sanchis

### **Grau en Biologia**

Tutora: Maria Ballester Devis

Co-tutor: Josep Maria Serrat Jurado

Vic, Juny de 2020

## **Agraïments**

Després de mesos de treball ha arribat el dia de finalitzar el projecte de final de grau i amb ell la carrera de Biologia. No obstant no vull acabar sense agrair els coneixements rebuts pel camí.

Primer de tot, agrair a la meva tutora Maria Ballester Devis l'oportunitat de treballar al grup de Genètica i Millora Animal del l'IRTA i l'ensenyament que m'ha donat en el camp de la genètica. Ha estat un plaer poder aprendre nous conceptes i tècniques de la seva mà. Agrair també el suport i ensenyaments al laboratori de l'Olga Gonzalez durant el transcurs del TFG i les pràctiques.

Agrair també al meu tutor d'universitat Josep Maria Serrat Jurado el seu acompanyament i ajuda durant la confecció del Treball Final de Grau.

Per últim, no vull deixar de donar les gràcies a la resta de professors que he tingut durant el transcurs de la meva estada a la universitat, els quals han estat una peça clau durant l'aprenentatge acadèmic i personal.

Moltes gràcies !

Pere Puigdomènech i Sanchis

Canovelles, 24 de Maig 2020

# Resum Treball Final de Grau

## Grau en Biologia

**Títol:** Identificació de gens candidats i variants genètiques associades amb caràcters d'eficiència alimentària en conills

**Paraules Clau:** *eficiència alimentària, conill, marcador genètic, GWAS*

**Autor:** Pere Puigdomènech Sanchis

**Tutors:** Dra. Maria Ballester Devis (IRTA) i Dr. Josep Maria Serrat Jurado (UVIC-UCC)

**Data:** Juny de 2020

El conill és un animal idoni per a la producció de carn degut a les seves capacitats productives i les característiques de la seva carn. Tot i això, la cria i consum de conill ha patit una davallada en les últimes dècades. La selecció genètica enfocada a millorar el seu creixement i eficiència alimentària tindria grans beneficis, ja que reduiria els costos econòmics en alimentació i l'impacte ambiental resultant de la producció de conill.

L'IRTA ha realitzat el primer estudi d'associació del genoma complet (GWAS) per caràcters d'eficiència alimentària i creixement individual. En aquest treball s'han estudiat gens candidats anotats en les regions genòmiques associades a aquests caràcters, amb l'objectiu d'identificar variants genètiques que puguin ser incloses en futurs programes de selecció genòmica. S'han seleccionat un total de nou gens candidats, dels quals s'ha seqüenciat la regió promotora proximal dels gens *FTO*, *TP53INP1* i *FEZF2* en 10 conills de la línia Caldes. S'ha identificat un total de 15 polimorfismes, set en el gen *FTO*, set en el gen *TP53INP1* i un en el gen *FEZF2*. Finalment, el estudi *in-silico* de les regions promotores ha permès identificar la presència d'alguns d'aquests polimorfismes en llocs d'unió de factors de transcripció, modificant-ne la unió dependent del genotip de l'animal. La identificació d'aquests polimorfismes permetrà una futura validació funcional i la inclusió en futurs programes de selecció destinats a millorar el creixement i l'eficiència alimentària dels conills.

# Degree Final Project Summary

## Degree in Biology

**Title:** Identification of candidate genes and genetic variants associated with feed efficiency in rabbits

**Key words:** *feed efficiency, rabbit, genetic marker, GWAS*

**Author:** Pere Puigdomènech Sanchis

**Tutor/s:** Dra. Maria Ballester Devis (IRTA) i Dr. Josep Maria Serrat Jurado (UVIC-UCC)

**Date:** June, 2020

Rabbit is an ideal animal for meat production due to its productive capacities and meat characteristics. However, rabbit production and consumption have decreased during the last decades. Genetic selection for feed efficiency and growth in rabbits would have great benefits because it would reduce economic costs and environmental footprints due to rabbit production.

Researchers at IRTA have performed the first genome-wide association study (GWAS) for feed efficiency and individual growth traits. In this final degree project, we have selected nine candidate genes annotated in the genomic regions associated with these traits, with the aim to identify genetic variants that could be included in future genomic selection programs. The proximal promoter region of *FTO*, *TP53INP1*, and *FEZF2* genes was amplified and sequenced. A total of fifteen polymorphisms were detected, seven in *FTO* gene, seven in *TP53INP1* gene, and one in *FEZF2* gene. Finally, an *in-silico* study of the promoter regions of *FTO* and *TP53INP1* allowed the identification of some polymorphisms in transcription factors binding sites. The identification of these polymorphisms will allow future functional validation experiments and their inclusion in future genetic selection programs to improve growth and feed efficiency in rabbits.

# Índex

1.	Introducció .....	5
1.1.	Producció Cunícola .....	5
1.1.1	Producció a nivell mundial .....	5
1.1.2	Producció a Europa.....	6
1.1.3	Producció a Catalunya .....	6
1.2.	Selecció genètica .....	7
1.2.1	Variants genètiques utilitzades com a marcadors moleculars .....	8
1.2.2	GWAS i gens candidats .....	10
1.2.2.1	GWAS per eficiència alimentaria .....	10
2.	Objectius.....	13
3.	Metodologia.....	14
3.1.	Material Animal.....	14
3.2.	Extracció de DNA .....	14
3.3.	Extracció de RNA .....	15
3.4.	Disseny de primers .....	15
3.5.	Quantificació del DNA i RNA amb espectrofotòmetre .....	18
3.6.	PCR .....	18
3.6.1.	RT-PCR.....	20
3.7.	Electroforesis amb Gel d'Agarosa .....	21
3.8.	Placa de seqüenciació.....	21
3.9.	Anotació funcional i anàlisi de dades .....	22
4.	Resultats .....	23
4.1.	Recerca bibliogràfica dels Gens candidats anotats en les regions associades amb els caràcters de creixement i eficiència alimentaria .....	23
4.2	Identificació de polimorfismes en les regions promotores dels gens <i>FTO</i> i <i>TP53INP1</i> .....	31
4.3	Caracterització <i>in-silico</i> de llocs d'unió de factors de transcripció en els promotors dels gens candidats .....	33
5.	Discussió .....	36
6.	Conclusions.....	41
7.	Bibliografia .....	42
8.	Annex.....	49

## 1. Introducció

El conill (*Oryctolagus cuniculus*) és un animal excel·lent per a la producció de carn degut al cicle de vida curt, un període de gestació curt, la seva prolificitat i la capacitat de conversió d'aliment (Lebas *et al*, 1997). Com a conseqüència de la seva fisiologia, pot convertir aliments rics en cel·lulosa en proteïnes, aconseguint que la producció cunícola sigui més sostenible, ja que no entra en competència amb els humans per l'aliment. A més cal tenir en compte la bona qualitat de la seva carn. Aquesta és rica en proteïnes i aminoàcids essencials, vitamines i minerals, i conté un baix contingut en greix i colesterol (Dalle Zotte i Szendro, 2011; Cullere i Dalle Zotte, 2018). Aquests aspectes fan que pel consumidor estigui percebuda com una carn sostenible i saludable. Tot i això, hi ha hagut un declivi en el seu consum, ja sigui pel canvi d'hàbits alimentaris, la percepció com animal de companyia i/o els preus de la carn.

### 1.1. Producció Cunícola

#### 1.1.1 Producció a nivell mundial

La producció de carn de conill es situa en 1,39 milions de tones a nivell mundial cada any. El principal productor és el continent asiàtic amb un 73%, seguit d'Europa amb un 19% (Figura 1). La Xina és el primer país productor amb 865.477 tones/any, a més és el principal exportador a la Unió Europea (UE) (FAOSTAT, 2018).

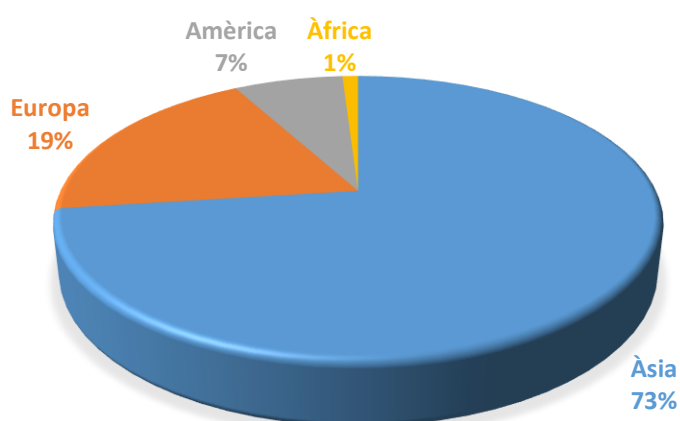


Figura 1: Producció de carn de conill per continents, 2018 (% de la producció)  
Font: FAOSTAT, 2018.

### **1.1.2 Producció a Europa**

A Europa la carn de conill és la sisena en nombre de sacrificis, i la vuitena en volum de carn. El principal volum de producció de la Unió Europea, el 83%, es concentra en tres països. El major productor és l'Estat Espanyol amb 48,5 milions de conills sacrificats el 2016, seguit de França amb 29 milions i Itàlia amb 24,5 milions (European Union, 2017).

A Europa el 66% dels conills (119 milions) són criats en granges comercials i sacrificats en escorxadors oficials, l'altre 34% (61 milions) és criat en explotacions domèstiques i comercialitzat amb venda directa i local (Trocino *et al*, 2019). Aquesta és una pràctica amb un volum significatiu comparat amb altres espècies de bestiar criat a la UE. Segons dades d'Eurostat es calcula que hi ha vora 161.000 granges no comercials i aquestes comporten una font de proteïna per a països membres menys desenvolupats i comunitats rurals. En 16 països de la Unió Europea aquesta és la via de consum de la carn de conill.

### **1.1.3 Producció a Catalunya**

Catalunya és la comunitat autònoma que presenta més explotacions cunícoles de l'Estat Espanyol. Representa el 24,8% de la producció (13,167 tones), segons dades del ministeri d'agricultura, pesca i alimentació (2018). Tot i presentar un major nombre d'explotacions aquestes es caracteritzen per ser explotacions més petites, amb un menor nombre de mares reproductores, amb comparació amb les de l'Estat Espanyol. A més Catalunya lidera el nombre d'explotacions per selecció amb un total de sis. Tot i això, Catalunya segueix la tendència Europea. Com es pot veure a la Figura 2, en els últims 12 anys presenta una clara davallada en els cens total de conills i el nombre d'explotacions, l'any 2010 el departament no va publicar dades.

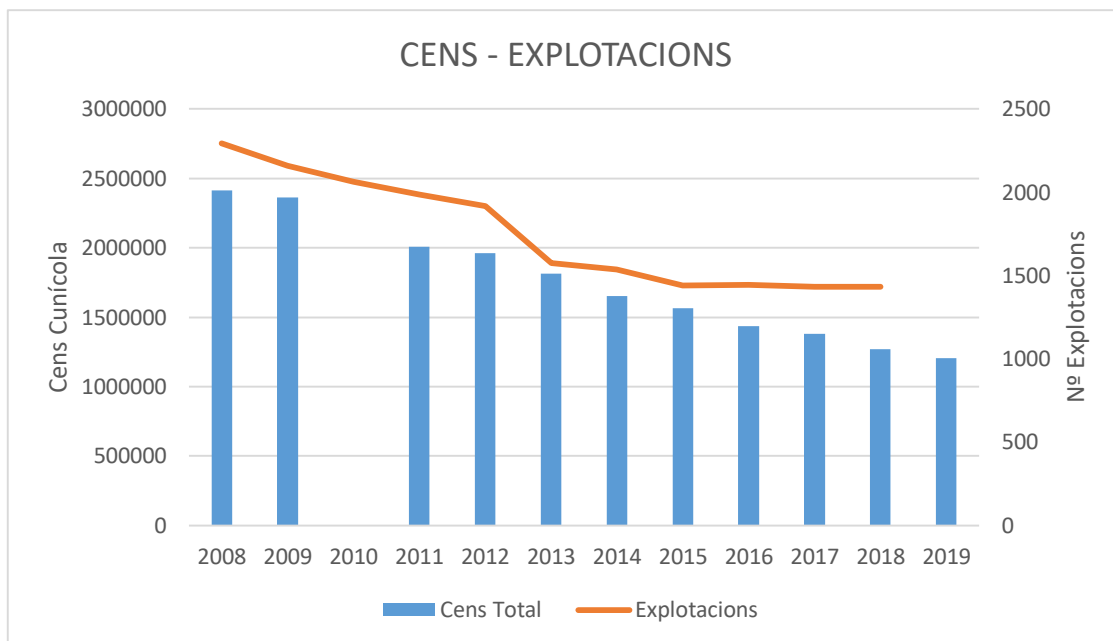


Figura 2: Gràfics de cens total cunícola i nombre d'explotacions a Catalunya 2008-2019. Dades extretes del Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca i Alimentació.

## 1.2. Selecció genètica

Els conills criats de manera intensiva per a la producció de carn són animals producte de creuaments i selecció per augmentar el rendiment i/o eficiència (Estany *et al*, 1992; Larzul i DeRochembeau, 2004). Aquesta selecció busca un major creixement postdeslletament i una millora de l'eficiència alimentària (EA) (Feki *et al*, 1996).

L'EA es pot definir de forma general com la capacitat que té l'individu per convertir els recursos alimentaris en rendiment. Es pot mesurar principalment de dues maneres. La primera correspon a la quantitat d'aliment (i molt important quantitat de nutrients) consumits per el guany de pes de l'animal en un període de temps, també es coneix com l'índex de conversió de l'aliment (ICA). La segona es basa en el residual feed intake (RFI) (en anglès), que es refereix a la diferència de l'aliment consumit per l'animal i l'aliment que teòricament hauria de ser consumit basat en les seves necessitats de creixement i de manteniment (Hill, 2012). La predicció del consum esperat es fa mitjançant una regressió múltiple sobre el creixement diari, representant les necessitats pel creixement, i sobre el pes metabòlic, que representa les necessitats pel manteniment.

La selecció enfocada en millorar l'EA és molt important, tant a nivell econòmic com a nivell ambiental. Des del punt de vista de la producció, el nivell més alt de



despesa se'l emporta l'alimentació de l'animal, que pot arribar a representar el 70% dels costos de l'explotació (Gidenne *et al*, 2017). Alhora, la reducció d'aquestes despeses en la producció de carn de conill és de gran importància per poder competir amb altres carns, com poden ser la del porc o la del pollastre (Maertens, 2009).

En conills el ICA durant el període d'engreix és més alt que el dels pollastres, el que redueix la seva EA. A més com a herbívor monogàstric requereix dietes amb nivells de fibra alts, fet que contribueix a que l'ICA sigui més alt (Cesari *et al*, 2018). Tot i això, fent canvis en la composició de l'aliment, s'ha aconseguit millorar el rendiment, reduint l'ICA en els últims anys, provocant una davallada en la producció de fòsfor i nitrogen, i per tant reduint l'impacte en el medi que té la seva producció (Gidenne *et al*, 2017). Per tant la selecció enfocada en la millora de l'EA és capaç de reduir la petjada ecològica, reduint els inputs i outputs de les explotacions.

L'IRTA (Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries), té dues línies de selecció (Línia Prat i Línia Caldes) enfocades en aquest sentit.

La línia Prat, fundada l'any 1992, ha estat seleccionada pel nombre de conills al deslletament. Per altra banda la línia Caldes, fundada l'any 1983, és va començar a seleccionar pel pes de la conillada als 60 dies, es tenia en compte tant la mida de la conillada com la velocitat de creixement. Actualment es selecciona pel creixement entre els 32 i 60 dies de vida, amb l'objectiu de millorar l'EA i l'ICA (Gómez *et al*, 1999).

La selecció per millorar l'EA presenta complexitats, donada la dificultat i costos de mesurar aquests fenotips. El poder identificar gens i marcadors genètics associats amb aquests caràcters pot permetre millorar la precisió de les prediccions genètiques fent més fàcil la posterior selecció (Petrović *et al*, 2018).

### **1.2.1 Variants genètiques utilitzades com a marcadors moleculars**

Un marcador molecular o marcador genètic és una seqüència de DNA, del que es coneix la seva localització física (locus) en el genoma, i l'herència del qual es pot traçar. Solen ser variacions en la seqüència de DNA que permeten la

diferenciació entre els individus d'una població. Marcadors pròxims en un cromosoma tendeixen a heretar-se conjuntament, sent útil per traçar diferències fenotípiques entre individus. Per aquests motius els marcadors moleculars són fonamentals per construir mapes genètics, detectar els locus dels quantitative trait loci (QTLs) i portar a terme estudis d'associació dels caràcters fenotípics (Nadeem et al, 2018). Els SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms), la substitució d'una base nucleotídica per un altra en el genoma, són els marcadors genètics més utilitzats i els més estudiats. Els SNPs en regions codificants que no produeixen cap alteració en la seqüència d'aminoàcids són substitucions sinònimes, en canvi els que produeixen un canvi d'aminoàcid s'anomenen no sinònimes (Figura 3). Els SNPs que es troben en regions reguladores (regions promotores, regions 5'UTR o 3'UTR) poden alterar l'expressió del gen, ja que poden afectar els motius d'unió dels factors de transcripció o els llocs d'unió de microRNAs (miRNA).

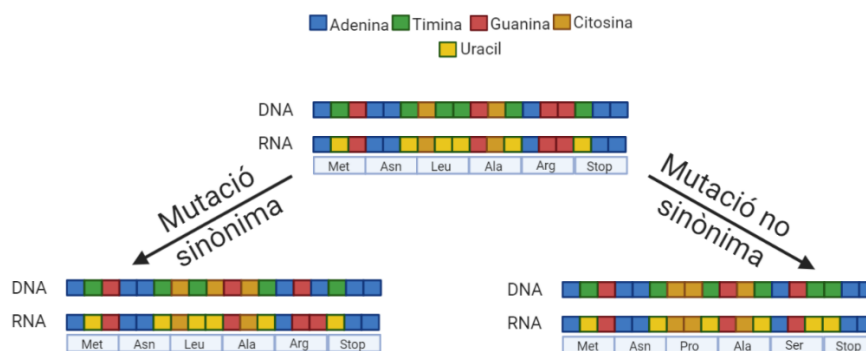


Figura 3: Mutacions sinònimes vs. Mutacions no sinònimes

Per poder genotipar els SNPs, s'han desenvolupat chips d'alta densitat que permeten fer-ho. En el cas del Conill el Axiom Rabbit Genotyping Array de Affymetrix, permet la identificació de fins a 200.000 variants. Aquest procés permet genotipar els SNPs en cada animal donant lloc a múltiples aplicacions. Permet realitzar estudis d'associació dels caràcters amb marcadors, avaluació de línies pures, realitzar matrius de parentiu (probabilitat que un gen sigui idèntic per descendència), estudis d'associació del genoma (Genome-Wide Association Study o GWAS) i de *selective sweeps* (increment de freqüència d'un al·lel). Els chips de SNPs permeten estimar el valor genètic dels animals quant són joves,

fent que augmenti la taxa de millora genètica al reduir-se l'interval generacional (Crespo, 2018).

### **1.2.2 GWAS i gens candidats**

El GWAS és una tècnica que permet identificar regions del genoma associades amb els caràcters d'interès.

El GWAS permet estudiar l'associació de cada marcador per separat amb el caràcter d'interès a la població. Es solen utilitzar marcadors tipus SNPs, els quals es troben distribuïts pel genoma, per tal d'identificar marcadors al·lèlics en lligament o desequilibri de lligament amb la mutació causal que provoca el caràcter. Si un al·lel es més freqüent en animals mostrant un fenotip concret es defineix com un SNP associat a aquest fenotip i es considera com un marcador. Això serveix com a font d'informació per predir els valors de millora genètica i és utilitzat per aplicar selecció genètica.

A partir de la identificació d'aquestes regions es poden cercar gens anotats en aquestes regions i que les seves funcions estan relacionades amb el fenotip que s'està estudiant. Quan el nom d'un gen no està assignat es busquen gens ortòlegs en humans. És a dir, una seqüència homologa amb funció similar en l'espècie humana, separada pel procés d'especiació.

En conill s'han descrit pocs GWAS a diferència d'altres espècies. S'han fet estudis per a la identificació de regions cromosòmiques que poden influenciar el greix intramuscular (Sosa-Madrid *et al*, 2019) i caràcters reproductius (Sosa-Madrid *et al*, 2017), entre d'altres. L'estudi fet pel grup de l'IRTA és el primer GWAS per creixement i eficiència alimentària en conill.

#### **1.2.2.1 GWAS per eficiència alimentària**

El GWAS per a creixement i eficiència alimentària es va fer sobre dos grups d'animals amb règims d'alimentació diferent: *ad libitum* (F) i sota restricció (R). Aquest últim grup rebia el 75% de la ingesta del grup F. La restricció alimentària posterior al deslletament és una pràctica habitual a les granges per reduir els problemes digestius. També redueix la mortalitat postdeslletament i millora l'eficiència alimentària durant el període de restricció i en especial quant els

animals tornen a una alimentació *ad libitum* (knudsen *et al*,2014; Sánchez *et al*, 2019; Tůmová *et al*, 2016; Sánchez *et al*,2020).

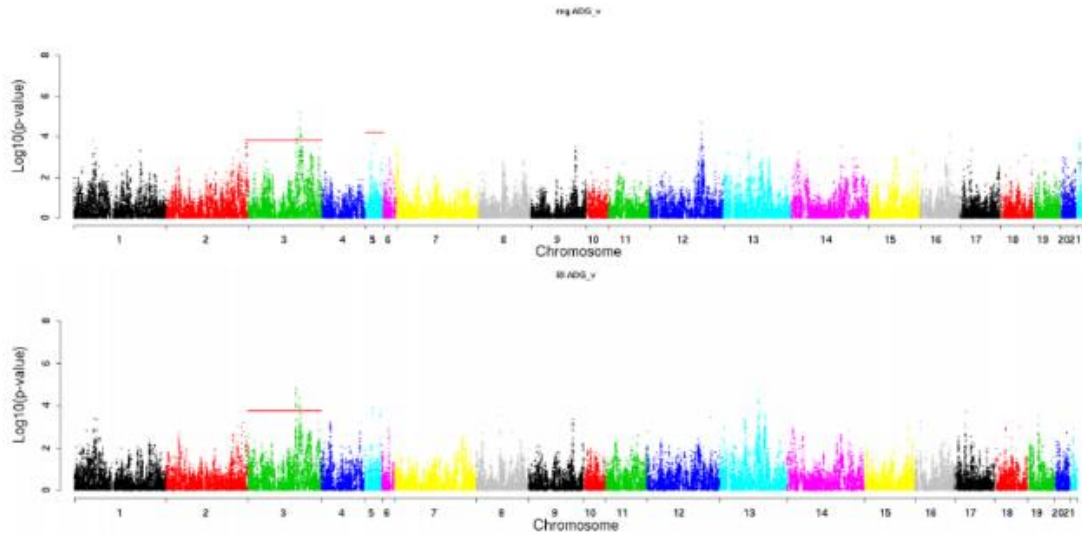


Figura 4: Manhattan plot per guany diari mitjà en animals sota règim d'alimentació F i R. Font: IRTA, Grup de Genètica i Millora Animal.

Els caràcters analitzats van ésser els següents:

- Guany de pes diari mitjà en alimentació *ad libitum* ( $ADG_F$ ).
- Guany de pes diari mitjà en alimentació en restricció d'aliment ( $ADG_R$ ).
- Mitjana individual diària d'ingesta d'aliment ( $ADFI_F$ ).
- Proporció mitjana diària de conversió de l'aliment ( $ADFRC_F$ ).
- Mitjana diària de la ingesta d'aliment residual ( $ADRFI_F$ ).

El GWAS va permetre trobar associats 189 SNPs en 9 cromosomes del conill per caràcters d'EA (Figura 4). S'han proposat fins a 20 gens candidats (Taula 1), associats amb creixement i eficiència alimentària.

Taula1:Taula resum dels gens candidats. Font IRTA, Grup de Genètica i Millora Animal

METHOD	OCC <sup>a</sup>	TRAIT	INITIAL Mb	FINAL Mb	GENE	FUNCTION
BI	3	ADG <sub>F</sub>	100.99	101.11	CA2	Respiration and transport of CO <sub>2</sub> /bicarbonate
QXPAK, BI	3	ADG <sub>F</sub>	102.22	102.37	--	--
QXPAK	3	ADG <sub>F</sub>	107.99	107.99	--	--
QXPAK, BI	3	ADG <sub>F</sub>	109.07	110.88	NDUFAF6,TP53INP1	Mitochondrial Respiration, Oxidative Stress Response
QXPAK	3	ADG <sub>F</sub>	113.46	113.46	--	--
QXPAK	5	ADG <sub>F</sub>	9.07	9.07	FTO,AKTIP	Growth
QXPAK	5	ADG <sub>F</sub>	18.95	18.97	--	--
QXPAK, BI	21	ADG <sub>F</sub> ,ADRFI <sub>F</sub>	7.16	9.21	ATXN2,ACAD10,TRAFD1,PTPN11	Energy Homeostasis, Immunity
BI	9	ADG <sub>R</sub>	29.66	31	FEZF2,PTPRG	Behaviour
BI	12	ADG <sub>R</sub>	99.88	99.88	--	--
QXPAK	13	ADG <sub>R</sub>	0.4	2.09	RC3H1,TNFSF18	Immunity
BI	17	ADG <sub>R</sub>	73.57	74.16	LGALS3,TMEM260	Circadian Rhythm, Immunity, Lipid Metabolism
BI	5	ADFI <sub>F</sub>	3.7	3.85	CEBPA,KCTD15	Energy Homeostasis, Adipogenesis, Feed Behaviour/Food Intake
BI	6	ADFCR <sub>F</sub>	26.28	26.44	SIK1B	Hormone Signalling
BI	16	ADFCR <sub>F</sub>	82.86	83.26	PLA2G4A	Lipid Metabolism, Inflammatory Response
BI	21	ADRFI <sub>F</sub>	3.89	4.33	SELENOM	Energy Metabolism

<sup>a</sup> *Oryctolagus cuniculus* chromosome

## 2. Objectius

El treball té com objectiu estudiar el determinisme genètic de caràcters d'eficiència alimentària en conill sota dos règims alimentaris: *ad libitum* i en restricció per: (1) identificar variants genètiques que puguin ser incloses en futurs programes de selecció genètica/genòmica per aquests caràcters, (2) incrementar el coneixement sobre els processos biològics implicats en l'eficiència alimentària.

Els objectius específics són:

1. Caracteritzar gens candidats e identificar variants genètiques associades a aquests caràcters.
2. Estudi funcional *in-silico* de les variants genètiques identificades en les regions promotores proximals dels gens candidats.

### 3. Metodologia

#### 3.1. Material Animal

Els animals utilitzats (n=438) per aquest estudi pertanyen a l'IRTA, són conills de la línia Caldes seleccionats per al creixement postdeslletament (Figura 6). D'ells s'han extret mostres de sang, fetge, múscul i greix que han sigut congelades a -20°C (sang) i -80°C (teixits) per als anàlisis posteriors.



Figura 6: Mascle línia Caldes Font: Gómez *et al* (2002)

#### 3.2. Extracció de DNA

Per obtenir DNA, s'ha fet servir el protocol del Fenol-Cloroform isoamil alcohol. Aquest protocol permet extreure DNA íntegre, de bona qualitat i quantitat.

El procés d'extracció es separa en tres fases:

- Lisi cel·lular
- Desproteïnitació o purificació del DNA
- Precipitació del DNA

Pel primer pas s'ha d'utilitzar un tampó de lisi, el qual es prepara a partir de Tris-HCl, EDTA i SDS. També s'hi afegeix proteïnasa k fent que es digereixin les nucleases, evitant així la degradació, i fent el trencament de les proteïnes. Les mostres es deixen overnight a 56°C, d'aquesta manera s'allibera el DNA del nucli de les cèl·lules.

El segon pas s'inicia afegint el fenol-cloroform, un cop s'ha centrifugat s'observen tres fases. A la part superior s'observa un fase aquosa on hi troben el DNA. Per

sota trobem la interfase, aquesta conté proteïnes i a baix de tot trobem la fase orgànica, que conté lípids i altres impureses com el fenol.

La fase aquosa es recupera per poder fer la precipitació del DNA, aquesta es fa afegint Clorur de Sodi (NaCl) 2M i etanol 100%. Els ions del NaCl i l'etanol s'uneixen als grups fosfats, permetent que el DNA es plegui tornant-lo insoluble, fent aparèixer un "pellet" de DNA. Aquest es centrifugat per poder treure les restes d'etanol, i netejat amb etanol 70%, decantant i deixant assecar posteriorment.

Finalment es dissolt el pellet de DNA en aigua Milli-Q, amb l'ajuda d'un bloc a 56°C. Un cop dissolt es pot guardar al congelador a -20°C per anàlisis posteriors. Les mostres van ser marcades numèricament (Annex: Taula 1 i 2).

### **3.3. Extracció de RNA**

Per poder seqüenciar les regions codificants dels gens *LGALS3* i *KCTD15*, vam fer extraccions de RNA a partir de mostres de fetge; posteriorment vam fer un transcripció inversa (explicat a l'apartat de RT-PCR) per obtenir el cDNA. Per fer l'extracció de RNA vam utilitzar el kit Ribopure (Life Technologies).

El primer pas correspon a la homogeneïtzació de 20 mg de cada mostra amb Tri reagent, aquesta es va dur a terme en tubs amb boles de ceràmica utilitzant l'aparell fastPrep per desfer la mostra ràpidament. Després de centrifugar, el sobrenedant es traspasat a un tub eppendorf on s'hi afegeix bromocloropropà (BCP). Es centrifuga i es recupera la fase aquosa. Seguidament aquesta fase aquosa es traspasada a un altre tub eppendorf on és tractada amb etanol 100% i Wash solution per purificar el RNA extret. Finalment el RNA era diluït amb elution buffer i guardat a -80°C. Les mostres van ser marcades numèricament (Annex: Taula 2).

### **3.4. Disseny de primers**

Durant l'estudi s'ha portat a terme el disseny de primers per poder amplificar regions dels gens d'interès (Annex: Taula 3). Els primers han estat



dissenyats per les regions reguladores (regió promotora i 3' UTR) i per la regió codificant.

Les seqüències dels gens a amplificar s'han obtingut del ensembl (<https://www.ensembl.org/index.html>), on hi trobem gran quantitat de genomes de vertebrats. En aquest portal s'han buscat les seqüències del genoma del conill amb l'homòleg humà, per tal de poder comparar les dues anotacions. D'aquesta manera es pot detectar una mala o incompleta anotació dels gens del conill donat que el seu genoma al no estar gaire estudiat està pitjor anotat que el genoma humà.

Per alinear les dues seqüències s'ha utilitzat el multalin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>). Un cop comparades les seqüències, es realitzava un repeatmasker (<http://www.repeatmasker.org/cgi-bin/WEBRepeatMasker>). Això ens permet trobar regions repetitives a la nostra seqüència. Un cop comprovada la presència de regions repetitives, es realitzava el disseny de primers utilitzant el programa Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer30.4.0/>). Aquesta web ens permet dissenyar el primers del tros de seqüència que l'hi introduïm.

En aquest portal triem les següent característiques per als nostres primers:

- Mida del producte: 700-750 pb, tot i que a vegades era una mica superior.
- Mida dels primers: Mínima: 20; Optima 21., Màxima 24

La resta de paràmetres eren per defecte.

Per cada regió promotora es van dissenyar dues parelles de primers solapants. A l'hora de fer el disseny dels primers teníem en compte la separació d'aproximadament 50 pb entre els primers solapants per evitar perdre seqüència durant la seqüenciació.

Per últim, un cop dissenyada la parella de primers, es portava a terme un Primer-Blast. El Primer-Blast ens permet veure si els primers dissenyats són específics per la regió a amplificar.

Aquest passos descrits eren els mateixos tant pel disseny de primers de les regions reguladores com de les regions codificants. La Figura 7 mostra un

exemple del disseny de primers pel gen *CA2* de les regions promotores i la regi6 codificant.

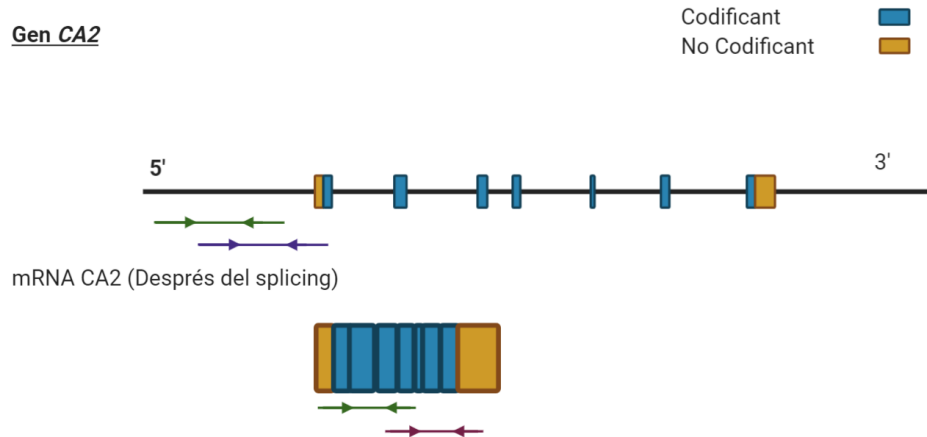


Figura 7: Disseny de primers per al gen *CA2*

Per poder identificar zones riques en GCs en la nostra seqüència, que poguessin interferir en l'amplificaci6 posterior del gen, vam utilitzar el programa EMBOS CpG PLOT ([https://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/emboss\\_cpgplot/](https://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/emboss_cpgplot/)). Els gràfics ens indiquen les zones de la seqüència que presenten un percentatge elevat de CpG (Figura 8). Aquests resultats també podien indicar quin tipus de Taq calia utilitzar per a la PCR (explicat a l'apartat 3.6).

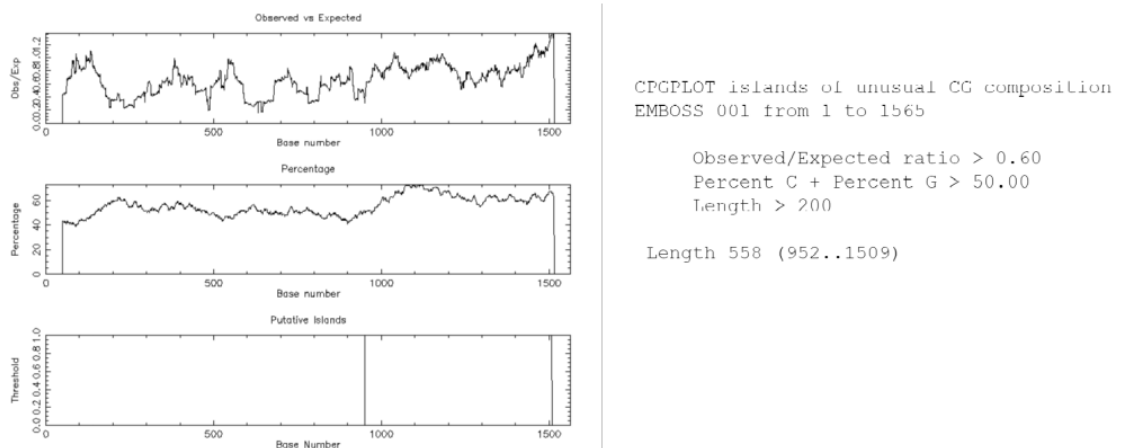


Figura 8: CG plot de la seqüència del promotor del gen *FTO*

### 3.5. Quantificació del DNA i RNA amb espectrofotòmetre

Per poder fer la quantificació de DNA i RNA es va utilitzar el Nanodrop. Aquest, és un espectrofotòmetre de microvolums que permet obtenir una quantificació del DNA i RNA a partir de 2 µl. Després de la quantificació amb el Nanodrop vam diluir les mostres per les anàlisis posteriors.

### 3.6. PCR

Per l'amplificació dels diferents fragments dels gens candidats es va utilitzar la tècnica de PCR (Reacció en cadena de la polimerasa). Aquesta tècnica en permet fer gran quantitat de còpies del fragment d'interès a partir de reaccions en cadena de la DNA polimerasa amb cicles a diferents temperatures (desnaturalització, annealing i extensió).

En el nostre estudi vam utilitzar diferents Taq depenent de les regions a amplificar.

- HotStarTaq Master Mix (Qiagen).

Amb aquesta taq utilitzaven els següents reactius:

- o Master mix (2x)\*: 12,5 µl
- o Primer F (10 µM): 1,25 µl (Cf=0,5 mM)
- o Primer R (10 µM): 1,25 µl (Cf=0,5 mM)
- o H<sub>2</sub>O: 8,5 µl
- o DNA: 1,5 µl (20 ng/ml)

\*La Master mix contenia la HotStarTaq polimerasa, PCR buffer amb 3mM MgCl<sub>2</sub> i 400 µM de cada dNTP.

Aquests reactius (excepte el DNA i l'aigua per al control negatiu, eren multiplicats per el nombre de mostres a les que se'ls volia fer la PCR). El volum final per a cada PCR era de 25 µl.

Abans de procedir amb l'amplificació es feia un PCR de gradient (Figura 9) de prova per tal de optimitzar les temperatures d'annealing dels primers. Aquesta prova es feia a partir d'un pool de 5 mostres triades a l'atzar. Un cop s'optimitzava la temperatura es continuava amb la PCR per a cada mostra.

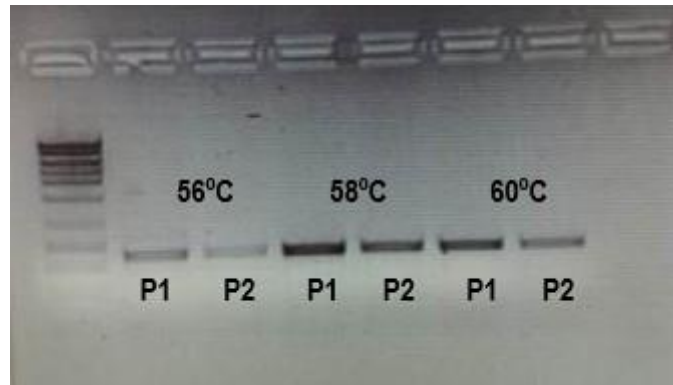


Figura 9: Gel d'agarosa amb els productes de PCR de gradient (56°C – 58°C – 60°C) del gen *KCTD15* amb les dues parelles de primers (P1 i P2).

Per calcular la  $T_m$  dels primers, es va utilitzar la següent fórmula:

$$T_m = (2 \times (A+T) + 4 \times (G+C)) - 4^\circ\text{C}$$

Les condicions de la PCR van ser les següents:

15 min	-	95°C	} 35 cicles
1 min	-	94°C	
1 min	-	52-63°C	
1 min	-	72°C	
10 min	-	72°C	

Aquesta taq ha estat usada per l'amplificació dels gens *FTO*, *FEZF2* i *KCTD15*.

- GxL

Alguns gens presentaven regions riques en GCs, aquests no s'amplificaven bé amb la Taq anterior. Per aquests gens vam utilitzar la GxL DNA polimerasa (TaKaRa). S'ha utilitzat per amplificar els gens *CA2* i *TP53INP1*.

Amb aquesta Taq vam utilitzar els següents reactius:

o 5x Primerstar GxL buffer: 4  $\mu$ l

- o dNTP mixture (2,5 mM each): 1,6 µl
- o Primer forward (10 µM) : 0,6 µl
- o Primer reverse (10 µM): 0,6 µl
- o Primestar GxL polymerase: 0,4 µl
- o Aigua RNAasa free: 10,8 µl
- o DNA: 2 µl

Per calcular la Tm dels primers, es va utilitzar la següent formula:

$$T_m = (2 \times (A+T) + 4 \times (G+C)) - 5^\circ\text{C}$$

Condicions PCR:

Per productes ≤ 10 k

98°C	-	10 seg	} 30-35 cicles (3-steps PCR)
55-60°C	-	15 seg	
68°C	-	15 seg	
O bé			
98°C	-	10 seg	} 30-35 cicles (2-steps PCR)
68°C	-	1 min/kb	

### 3.6.1. RT-PCR

Aquesta tècnica de transcripció reversa, també anomenada retrotranscripció (RT), ens permet passar mostres de RNA a cDNA,. D'aquesta manera vam obtenir còpies de cDNA del gen d'interès, *KCTD15*. Vam utilitzar la Primescript transcriptasa inversa de TaKaRa, seguint el protocol de SYBR Green. Vam utilitzar els següents reactius:

- 5x Primescript Reverse: 2 µl
- Primescript RT enzyme mix I: 0,5 µl
- Oligo dTPrimer (50 µM): 0,5 µl
- Random 6 mers (100 µM): 0,5 µl
- Total RNA (500 ng): 2,5 µl

- H<sub>2</sub>O RNAasa free: 4 µl

Condicions RT:

- 37°C – 15 min
- 85°C – 5 seg

### **3.7. Electroforesis amb Gel d'Agarosa**

Els fragments amplificats de les PCRs van ser comprovats mitjançant gels d'agarosa. Aquests gels ens permeten veure que els productes amplificats tenien la mida esperada i són específics.

Característiques del gel per productes de PCR (1,5% d'agarosa):

Gels petits:

- 60 ml TAE 1x
- 0,9 gr Agarosa
- 3 µl Pronasafe (agent intercalant de la doble cadena de DNA)

Gels grans:

- 100 ml TAE 1x
- 1,5 gr Agarosa
- 5 µl Pronasafe

Com a ladder per aquests gels vam fer servir el Midranger de 1Kb (10 µl), a cada pou i carregàvem 8 µl de mostra, 2 µl d'aigua i 2 µl de loading buffer. Aquest gels els fèiem córrer a 100V durant 20 minuts.

### **3.8. Placa de seqüenciació**

Després de l'amplificació i comprovació en gel dels diferents fragments dels gens d'interès en tots els animals a analitzar, es va procedir a preparar un placa de seqüenciació. D'aquesta placa cada pou corresponia a un animal, amb la PCR del fragment de cada gen amplificat i el primer que li corresponia.

A cada pou s'hi ficaven:

- 6 µl de mostra a un concentració de 50 ng/µl.
- 5 µl de primer, després de fer una dilució a 5 µM.

### **3.9. Anotació funcional i anàlisi de dades**

Per trobar la funció de cada gen candidat s'han utilitzat diferents bases de dades i webs. Una d'elles és Genecards (<https://www.genecards.org/>), aquesta base de dades conté informació sobre gens humans. L'Ensembl (<https://www.ensembl.org/index.html>) és un altre portal que recull genomes de vertebrats que permet la recerca en genòmica, evolució, la variació en les seqüències i la regulació transcripcional. Alhora aquest portal permet realitzar anàlisi de seqüències, amb eines com el BLAST. Aquesta eina ha estat utilitzada per cerca fragments d'una seqüència en diferents parts del genoma.

Un altre portal per trobar les diferents funcions dels gens ha estat el Mouse Genome Informatics (<http://www.informatics.jax.org/>). Aquesta base de dades conté informació genètica, genòmica i biològica a través d'informació generada en ratolins de laboratori.

A part de webs i bases de dades especialitzades, també s'ha fet recerca bibliogràfica d'articles científics i tesis online.

Per analitzar les seqüències que vam amplificar i genotipar es va utilitzar el programa DNASTAR (Seqman Ultra™ <https://www.dnastar.com/workflows/sanger-sequence-assembly/>). Vàrem determinar el diferents polimorfismes que presentaven els animals estudiats (Figura 10).

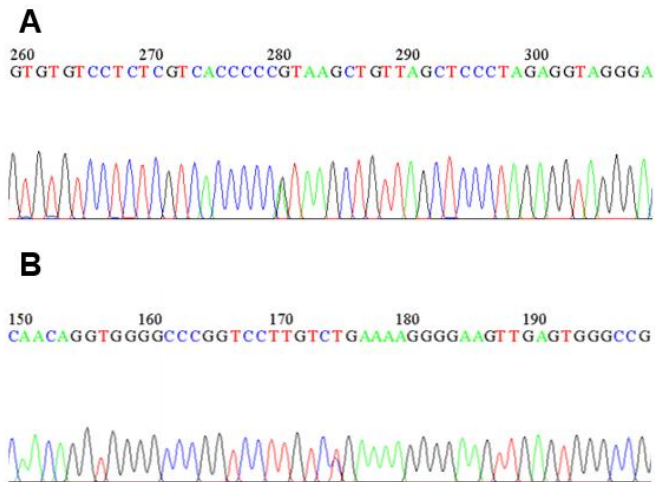


Figura 10: (A) Electroferograma del gen *FTO* s'observa un polimorfisme a la posició 280  
 (B) Electroferograma del gen *TP53/INP1* s'observa un polimorfisme a la posició 174

Per estudiar com es podíem veure afectats el llocs d'unió de factors de transcripció a conseqüència dels SNPs identificats en les regions promotores és va utilitzar el Lasagna-Search 2.0 ([https://biogrid-lasagna.engr.uconn.edu/lasagna\\_search/index.php](https://biogrid-lasagna.engr.uconn.edu/lasagna_search/index.php)). Aquest programa identifica els llocs d'unió de diferents FT, en un fragment específic de la teva seqüència. També t'indica la posició, en quina cadena es troba (Forward o Reverse) i el p-valor entre d'altres.

## 4. Resultats

### 4.1. Recerca bibliogràfica dels Gens candidats anotats en les regions associades amb els caràcters de creixement i eficiència alimentaria

Per iniciar la recerca bibliogràfica dels gens candidats, és van seleccionar nou gens de la taula 1. A l'hora de seleccionar els gens s'ha intentant que es trobessin en regions associades a tots els caràcters prèviament estudiats ( $ADG_F$ ,  $ADG_R$ ,  $ADFI_F$ ,  $ADRFI_F$ ).

#### CA2

El gen Carbonic anhydrase 2 (*CA2*) es troba anotat en la regió genòmica OCC3: 100.99-101.11 Mb associada amb el caràcter  $ADG_F$ . El gen està involucrat en el transport de  $CO_2$  i bicarbonat, tenint un paper important en la



regulació del pH i el transport de ions. Una expressió anormal del gen pot provocar malalties autoimmunes (Zhang C *et al*, 2018). Els ratolins knockout per al gen CA2 tenen un retard en el creixement, presentant una mida menor des de les primeres setmanes d'edat (Lewis *et al*, 1988; Margolis *et al*, 2008). La deficiència en humans està associada a osteoporosis i problemes renals (Venta *et al*, 1985).

EL CA2 presenta 7 exons ben conservats entre conills i humans, l'exó 1 i l'exó 7 presenten una fragment de seqüència no codificant. Tot i així el gen CA2 humà presenta un últim exó amb una part no codificant més llarga que el conill (Figura 11). La regió promotora d'aquest gen també es troba ben conservada entre les dues espècies.

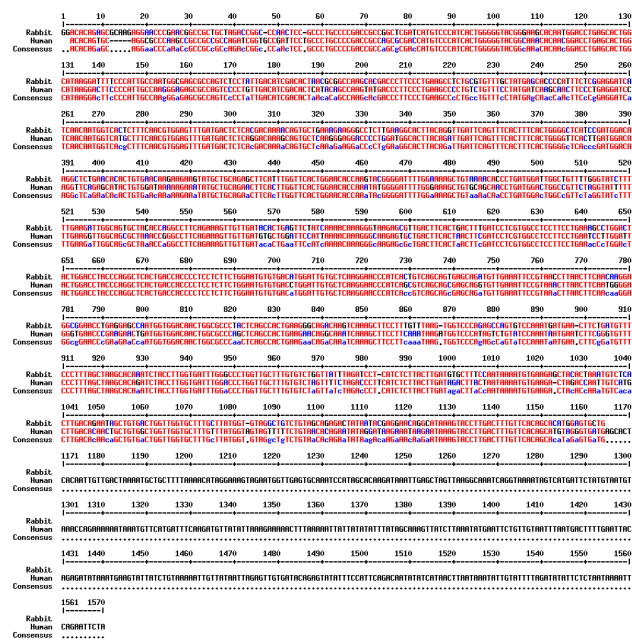


Figura 11: Multialin del cDNA de gen CA2 de Conill vs. Humà

En conill, el gen es troba en el cromosoma 3: 101,101,607-101,118,201 (ID ensembl: ENSOCUG00000011742). En mamífers el CA2 el trobem expressat àmpliament, podem trobar valors alts en sang, fetge, al sistema nerviós, etcètera (Database, 2020: Venta *et al*, 1985)

## TP53INP1

El gen Tumor protein p53 inducible nuclear protein 1 (*TP53INP1*) es troba anotat en la regió genòmica OCC3: 109.07-110.88 Mb associada amb el ADG<sub>F</sub>. Està involucrat en la resposta a l'estrès oxidatiu i en la respiració mitocondrial. S'ha vist que juga un paper important en l'aturada del creixement cel·lular, l'apoptosi, la migració cel·lular i l'autofàgia (Seux *et al*, 2011; Tomasini *et al*, 2005; Seillier *et al*, 2012). *TP53INP1* també regula l'activitat transcripcional de p53 i p73 e intercedeix en l'activitat antioxidant de p53 (Warnez-Soulie *et al*, 2019).

En ratolins, una deficiència en *TP53INP1* produeix una resistència a la insulina i un increment del greix corporal, canviant la morfologia de l'animal (Saadi *et al*, 2015; Warnez-Soulie *et al*, 2019). A més a més, s'ha comprovat que són més susceptibles a desenvolupar tumors i a presentar una major producció de ROS (Reactive Oxygen Species), fet que produeix danys a les cèl·lules (Cano *et al*, 2009).

El gen presenta un promotor ben conservat entre ambdues espècies. No obstant, el primer exó d'humà no es troba anotat en conills. Al fer un BLASTN en la seqüència de l'exó 1 humà al genoma del conill, vam localitzar un fragment homòleg de seqüència en la posició 3:110556533 – 110556294 del genoma del conill. L'alineament entre humà i conill mostra un alt grau de semblança (Figura 12) el que indicaria que l'exó 1 es troba mal anotat en el genoma del conill.

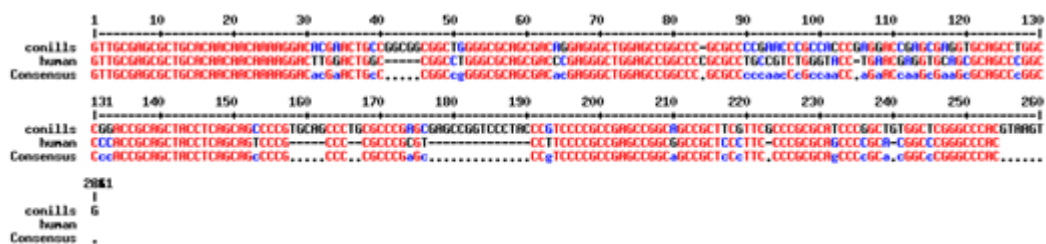


Figura 12: Multalin del Exó 1 Humà vs. Fragment de seqüència de conill trobat al fer el BLASTN

En conill el gen *TP53INP1* es troba al cromosoma 3: 110,541,562-110,555,252 (ID ensembl: ENSOCUG00000016241). El trobem expressat amb valors alts a fetge i pàncrees (GeneCards: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TP53INP1&keywords=TP53INp1>)

## FTO

El gen *FTO* (fat mass and obesity-associated gene) es troba anotat en la regió genòmica OCC5: 9.07-9.07 Mb associada amb ADG<sub>F</sub>. Està relacionat amb el creixement, involucrat amb l'índex de massa corporal (IMC) i el risc de patir obesitat en humans (Yeo G,S,H, 2014). També està associat en el pes corporal, el contingut de greix i el creixement en pollastres porcs i vedells (Gan *et al*, 2015; Xing *et al*, 2013). S'ha demostrat que el gen *FTO* actua en el creixement postpart en ratolins. Quan aquest no s'expressa, els animals presenten una mida més petita i un pes menor (Gao *et al*, 2010; McMurray *et al*,2013).

Diferents estudis han identificat SNPs en el gen *FTO* en conills associats amb el greix intramuscular, el pes corporal i la mitjana de guany diari (Zhang G-W *et al*, 2013; Zhang G-W *et al*, 2014). En aquesta espècie l'expressió de *FTO* presenta valors més alts en la melsa, fetge i pulmons. Depenent de l'estadi del desenvolupament en el que es troba l'animal l'expressió varia. En el fetge l'expressió augmenta durant el desenvolupament, arribant al seu màxim en la lactació, però disminueix en adults. En altres teixits, com el múscul, presenta un valors d'expressió semblants, en animals joves l'expressió és més elevada que no pas en animals adults (Xing *et al*, 2013).

EL gen *FTO* presenta un promotor ben conservat entre humans i conills. Les dues espècies presenten 9 exons, amb una llargada igual en quasi tots el exons, a més mostren un bon alineament al fer el multalin. El primer i últim exó presenten regions no codificants.

En conill el *FTO* es troba al cromosoma 5: 10,027,822-10,444,669 (ID ensembl: ENSOCUG00000001741). Aquest gen es troba conservat en els organismes, des de algues fins a humans (Xing *et al*, 2013).

## **FEZF2**

FEZ Family zinc Finger 2 (*FEZF2*) es troba anotat en la regió genòmica OCC9: 29.66-31 Mb associada amb ADG<sub>R</sub>. Codifica per factors de transcripció essencials per la diferenciació neuronal en el desenvolupament del còrtex cerebral (Zhang S *et al*, 2014). Aquest gen també està associat amb patrons de comportament, com l'activitat locomotora, les interaccions socials, aprenentatge associatiu i hiperactivitat (Clare *et al*, 2017).

S'ha demostrat que ratolins amb deficiència del gen *FEZF2* desenvolupen un comportament hiperactiu, presentant una conducta d'alimentació anormal, provocant un retard en el seu creixement postdeslletament (Hirata *et al*, 2004; Mouse Genome Informatics).

Aquest gen sembla mal anotat en el genoma del conill, presentant el gen *FEZF2* humà un exó més que el del conill. De fet, l'exó 1 de conill es homòleg a l'exó 2 en humans i l'exó 1 humà no apareix anotat en conills. Al fer el BLASTN (Annex: Figura 1) per aquest primer exó humà en el genoma del conill, hem trobat un hit al cromosoma 9, a la posició 29293984 – 29294213, mostrant un 100% d'alineament i e-value de 4e-130. Aquest primer exó humà està anotat com a regió promotora en conill, s'ha comprovat fent un multalin per veure l'alineament (Figura 13).

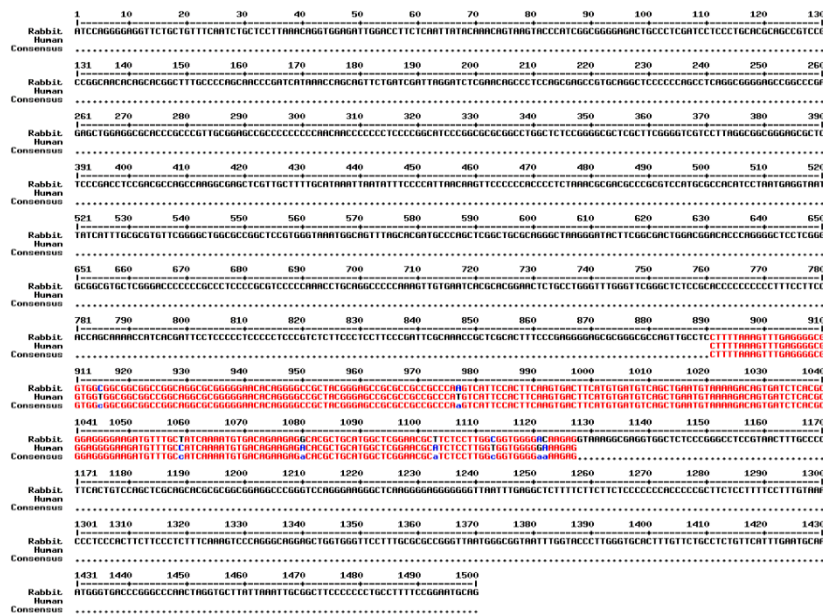


Figura 13: Multalin de la regió promotora del gen *FEZF2* de Conill vs Exó 1 del gen *FEZF2* humà

En conill el gen *FEZF2* es troba al cromosoma 9: 29,290,244-29,294,091 (ID ensembl: ENSOCUG00000002823). Aquest gen el trobem sobre-expressat a diferents zones del cervell com, l'hipocamp, còrtex, amígdala, entre d'altres. També el trobem expressat en el fetge i el sistema biliar (Database, 2020; Fezf2 MGI Mouse Gene Detail - MGI:1859823 - Fez family zinc finger 2, 2020)

## PTPRG

El gen Protein tyrosine phosphate receptor type G (*PTPRG*), es troba anotat en la regió genòmica OCC9: 29.66-31 Mb associada amb el ADG<sub>R</sub>. Està associat amb patrons de comportament i amb trastorns psiquiàtrics. En ratolins, la deficiència del gen *PTPRG* provoca un canvi de comportament, augmentant l'activitat locomotora (Cressant *et al.* 2017). En humans, aquest gen s'ha associat amb esquizofrènia (Andreassen *et al.*, 2013).

Aquest gen presenta 29 exons en humans i conill, trobant-se ben conservats entre les dues espècies. L'últim exó de conill presenta una fragment més de seqüència que en humans, aquest fragment és no codificant. En canvi en humans el primer exó té anotat un fragment no codificant. Tot i aquestes diferències les parts codificants es troben ben conservades entre ambdues espècies. El promotor també es troba ben conservat, presenta un bon alineament amb el promotor humà.

En conill el gen es troba al cromosoma 9: 28,410,476-29,189,284 (ID ensembl: ENSOCUG00000002809). Es troba expressat en el sistema nerviós i en altres teixits com fetge, múscul i teixit adipós (Zhang W *et al.*, 2012; Brenachot *et al.*, 2017).

### **LGALS3**

El gen *LGALS3*, també conegut com Galectin-3, es troba anotat en la regió genòmica OCC17: 73.57-74.16 Mb associada amb el ADG<sub>R</sub>. Codifica per proteïnes que tenen un rol en un gran nombre de funcions cel·lulars com apoptosi, immunitat innata, cèl·lules T, creixement i supervivència cel·lular, i processos inflamatoris (Arsenijevic *et al.*, 2019; Stojanovic *et al.*, 2019).

Els promotors entre les dues espècies no es troben ben conservats. A fer el BLASTN del promotor del humà en el genoma del conill no es troba cap resultat significatiu en la regió del gen *LGALS3*. En conill aquest gen presenta 5 exons a diferència dels humans que en presenten 6.

En conill el gen *LGALS3* el trobem al cromosoma 17: 73,821,777-73,827,521 (ID ensemble: ENSOCUG00000002924). S'expressa en un gran ventall de teixits i òrgans, com ara fetge, múscul i teixit adipós (Lgals3 MGI Mouse Gene Detail - MGI:96778 - lectin, galactose binding, soluble 3, 2020).

## CEBPA

El gen CCAAT/enhancer binding protein alpha (*CEBPA*), es troba anotat en la regió genòmica OCC5: 3.7-3.85 MB associada amb el ADFI<sub>F</sub>. Té un paper important en la regulació de processos metabòlics com la adipogènesis i la lipogènesis, també és vital per mantenir l'homeòstasi energètica i per moderar el creixement de les cèl·lules hepàtiques ( Madeira *et al.* 2017; Horodyska *et al.* 2019; Tan *et al.*, 2005).

En el cas del *CEBPA* els promotors de les dues espècies no s'alineen correctament al fer el multalin (Figura 14). El gen en conill i humà estan anotats de forma diferent. En conill el gen presenta 2 exons i en humà tant sols 1. El primer exó del conill anotat té una llargada molt petita i presenta un intró molt llarg (38227 pb), aquest podria estar mal anotat o poc conservat en el gen humà.

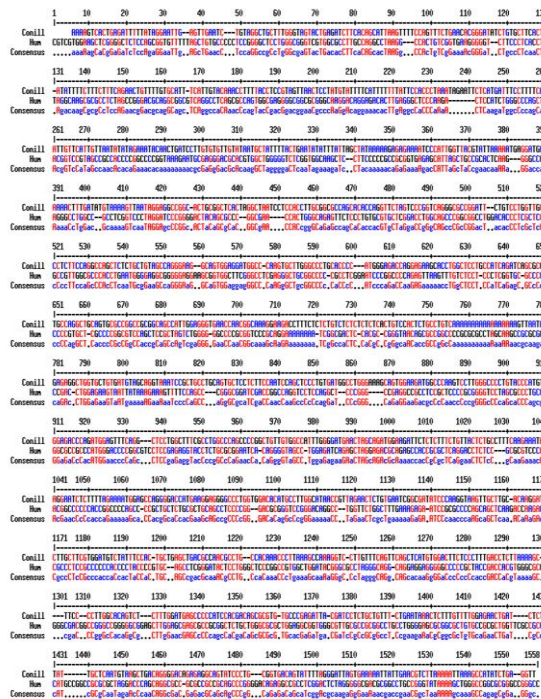


Figura 14: Multalin Promotor del gens *CEBPA* de Conill vs. Humà

En conill el gen es troba al cromosoma 5: 3,189,242.3,256,494 (ID ensembl: ENSOCUG00000022985). El gen es troba altament expressat en fetge, pell i teixit adipós entre d'altres. (Wang G *et al.* 2010; Database, 2020).

## KCTD15

El gen Potassium Channel tetramerization domain containing 15 (*KCTD15*), es troba anotat en la regió genòmica OCC5: 3.7-3.85 Mb associada amb el ADFI<sub>F</sub>. Té un paper important en el desenvolupament dels vertebrats i la diferenciació cel·lular (Liang S *et al.* 2015).

Està expressat en regions del cervell on hi juga un paper important en el balanç d'energia i la regulació de la ingesta d'aliment (Bauer *et al.* 2009; Smaldone *et al.*, 2018). Altres canals de potassi participen en vies que regulen el pes corporal, la sensibilitat a la insulina, i canvis en aquests poden provocar un increment en la taxa metabòlica. És possible que *KCTD15* tingui funcions similars a aquests (Xu *et al.*, 2003). Estudis en pollastres suggereixen que està relacionat en el metabolisme lipídic (Liang S *et al.* 2015).

En aquest gen el exons es troben ben conservats entre els gens humà i del conill. Tots dos presenten 7 exons. La diferència la troben en el promotor, on en el genoma del conill trobem una ampla zona que presenta un gap al genoma de referència, és a dir, falta seqüència (Figura 15).

```

>5 dna:chromosome chromosome:OryCun2.0:5:3639427:3653764:1
CCGGGTGCAGGGAGGCGCCCGCCGCCACGCCGCCCGCCCGTCCCGACGTTGG
CTTTAGACACGAGTTGGGATGATCCCTATGTGGGTACATTTGTACACTTTCTGTG
AGGGCAAACTCATCTAGCTTACAGGGGATTAAGAGACCATGCCCTTCCAAATTTGTGA
GTGTAATCGCCCGCCAGGCTCGACCGATTTCAAGCGCATTCTCTCGACTGTCAC
TCATGTCCGAAATAAATGGCTTCTGTGTTTCCATCCGTGTGGATCAAAGTATGTGTC
TCCTTTGCATTAATTTGCAATTTAAAGATATTGTGATCCTCAAACATGCATCTGTG
AAACTGTTGACTAGTATCCTCAGTCTTCTACTAGCTTAATGGGCAATTTCTATTCTAA
AAAGTCTTATTTGAATAGTGCCTAGTCTGATGATACGTTGGCAAACGGTTATGGTCTT
TTTTAATTCCTAATTTAGTAGTCTNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
CCAGGACGAGACCGAGCGCCCGCCGCGAGCAGCGGCGCAGGCTGAGCGCGGCG
CCGAGACCGCGGCTGCGGGGGGCGGGGGCTCGCTCCGAGCCCGATCCGCGCTCCGCT
CCGAGGTAAGCCAGCGCGGGCGGCGCGGCTCAGCGGCGCGCACCCAGTCCCAAAAG
TGCCCGGATGGCAGAAAGTGGCCCGCGGGTCCGACCTGGCGGGGGCGGCTGCT
TTGTCTCTGCTGAGCGCGGGGGCGCCGGCAGAAAGGCTGGCGGAGGTGGGGGG
TACCACGTGGGCTGTCTGGCGCGGGTGGACCCTCCCGACGCGGACGGCCGCGAGC
TTCTGCGCGCGGGCTGTGCGCTGAGTGTATGAGGCTCCCTGCATCTGGCCCGCGCA
CGGGCCGGCGGCGCCCGCGCTGGAGCAGCGAGTTTCCGGGGTCAGAAACCGGTTGC
GCAAGCTGGGGTTTGGGGGCGCACAGGGCCCGTGTGGCGCCAAATCAGAGAAAGAAA
AAGTCTTAAAGGAGCAGATCAGTCCGCTGAAAGCCACCGCGGAGTCCGCGGCGAG
CGCTGGCGGGGTCCTGGCGCGGCGGGTCCGGGGCACAGCGCACCGGGAGCTGGAGC
CGCGAGCGGGCACGACCGCGCACACCCCGCCCTGGCGCGCGCGCTCTGTGTC
CTCCCGAGCCCGCGGTCAGAAAGATAAAGGCTGCAAGTTTCACTCGTGTCTCAAA
TGTGCATGAAGAAATTAAGTGCAGAGTGAATAACAGCATTAGTTCAATTAATTTTT

```

Figura 15: Fragment de promotor del gen *KCTD15*, on s'observa el gap.

En conill el gen es troba al cromosoma 5: 3,640,927-3,653,764 (ID ensembl: ENSOCUG00000010531). EL *KCTD15* el trobem expressat en l'hipotàlam, en teixit adipós, fetge i sistema biliar (Liang S *et al.* 2015; Kctd15 MGI Mouse Gene Detail - MGI:2385276 - potassium channel tetramerisation domain containing 15, 2020).

## **SELENOM**

El gen Selenoprotein M (*SELENOM*), es troba anotat en la regió genòmica OCC21: 3.89-4.33 Mb associada amb el ADRFI<sub>F</sub>. Té un rol important en la protecció contra el dany oxidatiu. En ratolins knock-down decreix la viabilitat de les cèl·lules i augmenten les ROS, fet que demostra la seva importància prevenint l'estrès oxidatiu (Guerriero *et al*, 2014). També té un paper important en la regulació del metabolisme i el pes corporal. Ratolins knock-out per aquest gens mostren un major pes i mes quantitat de teixit adipós blanc (Pitts *et al*, 2013; Liu *et al*, 2018).

Aquest gen presenta grans diferències en les seqüències promotores de humans i conills, el multalin no presenta un bon alineament.

En els exons també trobem diferències entre les dues espècies. En conill trobem 4 exons, 3 menys que en humans. El genoma del conill mostra un primer exó molt llarg que podria estar mal anotat, degut a les grans diferències entre les espècies esmentades i a la mida dels introns presents en humà. Part d'aquest primer exó de conill s'alinea amb els exons 2 i 3 d'humà.

En conill el gen el trobem al cromosoma 21: 3,561,832-3,565,455 (ID ensembl: ENSOCUG00000033676). Aquest gen s'expressa en teixits com múscul, fetge, ronyó, pulmons, entre d'altres, però els nivell d'expressió més alts es troben en el cervell (Huang J *et al*, 2016; Korotkov *et al* 2002).

### **4.2 Identificació de polimorfismes en les regions promotores dels gens *FTO* i *TP53INP1***

Per al gen *FTO* es van amplificar dos fragments solapants de 769 pb i 703 pb de la regió promotora proximal en 10 animals (Annex: Taula 1).

Després de la seva seqüenciació i anàlisi, es van identificar un total de set polimorfismes (*FTO*c.-1090C>T, *FTO*c.-888 A>G, *FTO*c.-857C>G, *FTO*c.-738T>C, *FTO*c.-580A>G, *FTO*c.-350C>T, *FTO*c.-302T>G) (Taula 2). Per aquest gen l'únic SNP que presenta el tres genotips és el *FTO*c.-857C>G. En el qual tenim animals homozigots CC i GG, i animals heterozigots GC.



Taula 2: Polimorfismes de la regió promotora del gen *FTO*

<b>FTO</b>	Parella 1					Parella 2	
SEQ REF	C	G	C	T	A	C	T
POSICIÓ	-1090	-888	-857	-738	-580	-350	-302
ANIMAL							
113238	C/T	A/G	G/C	T	A/G	C/T	G/T
116167	C	G	C	T	A	C	T
113146	C/T	A/G	G	C/T	A/G	C/T	G/T
114760	-	-	-	-	-	C	T
115277	C/T	A/G	G/C	T	A/G	C/T	G/T
113165	C	G	G/C	C/T	A	C	T
115259	C/T	A/G	G/C	T	A/G	C/T	G/T
113058	C/T	A/G	G/C	T	A/G	C/T	G/T
113063	C/T	A/G	G	C/T	A/G	C/T	G/T
116206	C/T	A/G	G/C	T	A/G	C/T	G/T

\*Per fer l'anotació s'ha pres com a punt 0 la primera base del exó 1

Per al gen *TP53INP1* es va amplificar un fragment de 780 pb de la regió promotora proximal en 10 animals (Annex: Taula 1).

Posteriorment es van enviar a seqüenciar i es van identificar els polimorfismes representats a la Taula 3. Al *TP53INP1* hem pogut identificar fins a sis SNP i un indel per a la regió promotora d'aquest gen. Els SNPs i indel són el següents: *TP53INP1c.-492C>T*, *TP53INP1c.-334C>T*, *TP53INP1c.-317A>G*, *TP53INP1c.-297A>G*, *TP53INP1c.-199delC*, *TP53INP1c.-90C>T*, *TP53INP1c.-69C>T*.

Els SNPs *TP53INP1c.-90C>T*, *TP53INP1c.-297A>G*, i *TP53INP1c.-334C>T* presenten els tres genotips.

Taula 3: Polimorfismes de la regió promotora del gen *TP53INP1*

<b>TP53INP1</b>	Parella 2						
Seq Ref	C	C	A	G	INDEL C/-	C	C
POSICIÓ	-492	-334	-317	-297	-199	-90	-69
ANIMAL							
113238	C	T	A	A	CC/CC	T	C
116167	C/T	C/T	A	A	CCC/CCC	C	C/T
113146	C/T	T	A	A	CC/CC		
114760	C	T	A	A	CC/CC	C/T	C
115277	C/T	C/T	A	A/G	CCC/CCC	C	C/T
113165	C	T	A	A	CC/CC	T	C
115259	C/T	C/T	A	A/G	CCC/CCC	C	C/T
113058	C	C/T	A	A	CC/CC		
113063	C	C	A	G	CCC/CCC	C	C
116206	C	C/T	A/G	A/G	CC/CC		

\*Per fer l'anotació s'ha pres com a 0 la primera base del exó 1

Al *FEZF2* hem trobat un indel a la posició *FEZF2*c.1440delC.

#### **4.3 Caracterització *in-silico* de llocs d'unió de factors de transcripció en els promotors dels gens candidats**

Per identificar com poden afectar els polimorfismes trobats en les regions promotores, es va realitzar un estudi *in-silico* dels llocs d'unió dels factor de transcripció (FT). Aquest procés es va realitzar a través de la identificació de seqüències motiu de DNA Cis-acting amb programes informàtics (Corominas *et al*, 2013). Els factors de transcripció són unes proteïnes funcionals, les quals s'enganxen a seqüències específiques de les regions reguladores dels gens i controlen la seva transcripció (Latchman, 1993).

Inicialment es va fer una recerca bibliogràfica de factors de transcripció involucrats amb els gens d'interès, observant alhora que s'expressin en el mateix teixit on s'expressa el gen. Posteriorment es va analitzar la presència de polimorfismes en els llocs d'unió dels FT amb el programa Lasagna. Aquestes variacions poden fer canviar el lloc d'unió i conseqüentment l'expressió del nostre gen.

Pel gen *FTO* vam trobar SNPs en llocs d'unió de factors de transcripció (Figura 15). El primer SNP interessant és el *FTO*c.-1090C>T. Els animals amb una citosina (C) presenten un lloc d'unió per al FT ATF-2, mentre que en els animals amb una Timina (T) aquest lloc d'unió no està present (Figura 15 i Annex: Taula 4).

Per el SNP *FTO*c.-888 A>G, els animals amb una Guanina (G) presenten un lloc d'unió per al FT FOXA1. Per al SNP *FTO*c.-738T>C, els animals amb una C presenten un lloc d'unió per al FT FOXA2 (Figura 16 i Annex: Taula 4).

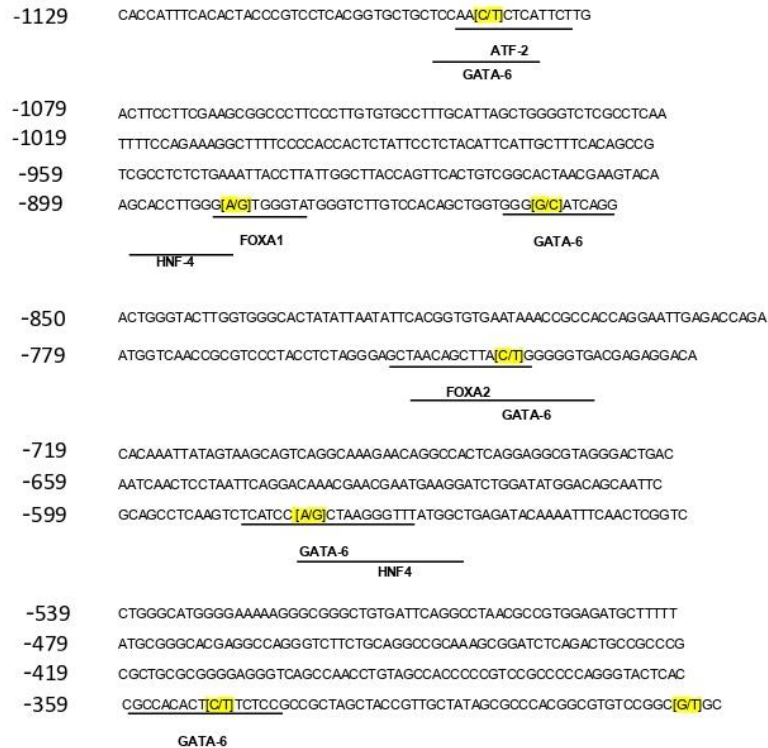


Figura 16: Representació dels llocs d'unió, depenent del polimorfisme, dels FT a la regió amplificada del gen *FTO*

Al gen *TP53INP1* també troben SNPs interessants que afecten de manera diferent als FT (Figura 17). Pel SNP *TP53INP1c.-334C>T* els animals amb una Timina (T) presenten un lloc d'unió per al FT FOXA1/FOXA2, no obstant, aquest lloc d'unió no està present amb els animals que tenen una C (Annex: Taula 5). El SNP *TP53INP1 c.-317A>G* també presenta aquest casuística. Els animals que presentin una G tenen un lloc d'unió per al FT GATA-1, no obstant els que tenen una Adenina (A) no. Pel que fa al polimorfisme *TP53INP1c.-199delC*, el animals que presenten la deleció no presenten cap lloc d'unió de FT, no obstant, els que no presenten aquest canvi tenen un lloc d'unió per al FT GATA-1 (Figura 16 i Annex: Taula 5).

Per últim el SNP *TP53INP1c.-69C>T* també provoca que els animals que presentin una C s'hi podrà unir el FT FOXA2 i en els que presentin la T no ho podrà fer (Annex: Taula5).

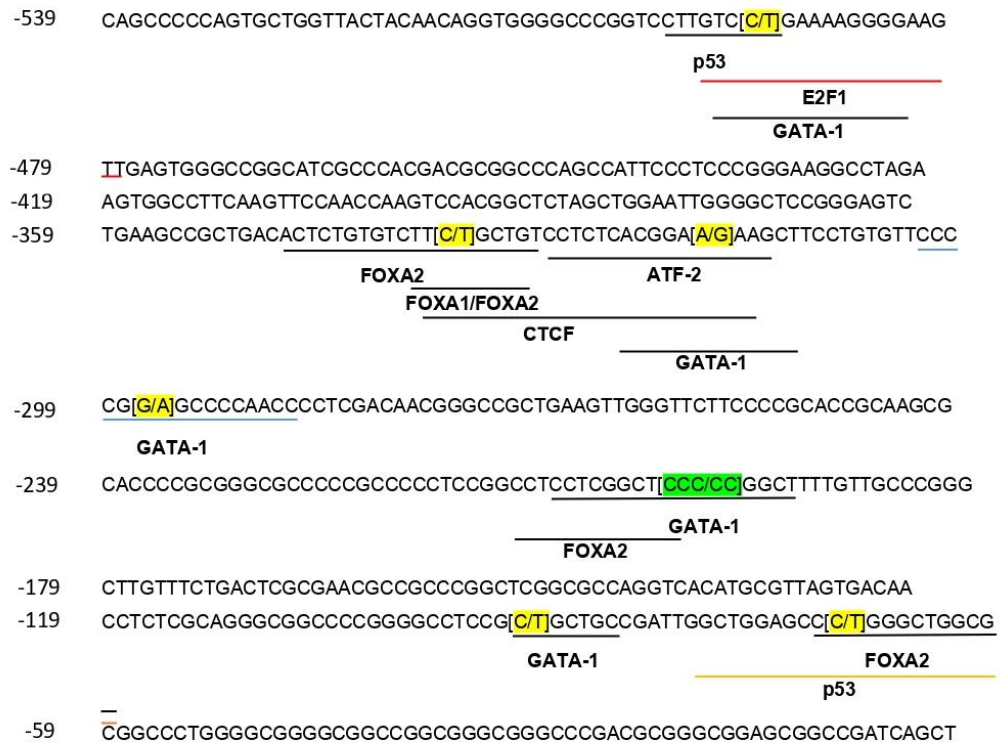


Figura 17: Representació dels llocs d'unió, dependent del polimorfisme, dels FT de la regió amplificada del gen *TP53INP1*

## 5. Discussió

Estudis previs en altres espècies animals han identificat i caracteritzat polimorfismes i gens candidats relacionats amb eficiència alimentària (Sherman *et al*, 2010 ;Do *et al*, 2014). Aquest treball representa el primer estudi on s'identifiquen polimorfismes en gens candidats posicionals per caràcters d'eficiència alimentaria en conills.

Els resultats en la recerca bibliogràfica dels gens candidats reforça la possible implicació dels mateixos en la determinació dels caràcter analitzats. El gen *CA2* s'ha relacionat en problemes de creixement en ratolins *knockout*, fet que suporta la seva possible implicació en el caràcter de  $ADG_F$ . L'absència d'expressió del gen *TP53INP1* en ratolins *knockout* s'ha relacionat amb l'aparició d'obesitat i per tant la funció d'aquest gen podria estar determinant el caràcter de  $ADG_F$ . Pel que fa al gen *FTO* està associat amb el  $ADG_F$ . Estudis en ratolins han demostrat que aquest gen està relacionat amb el creixement post-part. Alhora estudis previs en altres línies de conills l'han associat amb el greix intramuscular, el pes, i el guany de pes diari, fet que fa del gen *FTO* un fort candidat a explicar la variació en el caràcter  $ADG_F$ . Pel que fa als gens *FEZF2*, *PTPRG*, i *LGALS3*, aquests gens s'han associat a patrons en el comportament, fet que podria explicar les diferències observades en el caràcter  $ADG_R$  quant els animals son sotmesos a un règim alimentari en restricció. El gen *FEZF2* ha estat relacionat amb patrons de comportament que afecten a la conducta alimentaria de l'animal i en conseqüència al seu creixement (Clare *et al*, 2017; Lamprianou *et al*, 2006; Orr *et al*, 2013). Estudis amb ratolins knockouts per al gen *LGALS3* van determinar perturbacions en els ritmes circadians dels animals, els quals presentaven un increment en el pes corporal , així com en els nivells de teixit adipós visceral (Chaudoin & Bonasera, 2018). També augmentaven els nivells d'insulina i glucosa en sang (Pejnovic *et al*, 2013). EL gen *CEBPA* també es un fort candidat ha explicar el caràcter de  $ADFI_F$ , ja que ha estat prèviament relacionat en caràcters d'eficiència alimentaria en porcs. Aquest gen ha estat relacionat amb l'adipogènesi i l'homeòstasi de la glucosa. Experiments amb ratolins han demostrat com ratolins knockout per *CEBPA* presentaven alteracions en els teixit adipós, així com una reducció de la ingesta d'aliment (Hipofagia) (Yang *et al*, 2005). Un altre gen candidat a determinar les variacions en el caràcter  $ADFI_F$ , es

el gen *KCTD15*, involucrat en el control de la ingesta d'aliment i el balanç d'energia. S'ha descrit que ratolins amb mutacions per al gen provoquen un comportament alimentari anormal, presentant una disminució de la ingesta alimentària (Mouse Genome Informatics, 2020). Finalment, pel que fa al gen *SELENOM*, es desconeix quina és la funció exacta. Però s'ha comprovat que ratolins transgènics amb una deleció per aquest gen mostren un incrementat de pes, per tant indica que pot estar relacionat amb la regulació del metabolisme i el guany de pes (NCBI, 2020).

En el transcurs del treball s'han pogut identificar un total de 13 SNPs i un indel en les regions promotores proximals dels gens *FTO* i *TP53INP1*. Aquests polimorfismes podrien determinar canvis en l'expressió dels gens candidats al estar situats en regions reguladores podent modificar llocs d'unió de factors de transcripció. Per aquest motiu es va dur a terme una caracterització de les regions promotores dels gens *FTO* i *TP53INP1*.

Pel que fa als polimorfismes identificats per al gen *FTO*, el *FTO*c. 738T>C es troba localitzat en un lloc d'unió per al factor de transcripció FOXA2. Aquest lloc d'unió sols està present en els animals que presenten una C. El FOXA2 és un FT que està relacionat amb la regulació del metabolisme i és essencial per la homeòstasis de lípids i la glucosa. Cal remarcar que estudis realitzats en línies cel·lulars humanes han determinat la unió d'aquest FT en el promotor del gen *FTO* regulant negativament la seva expressió (Guo *et al*, 2012). A més estudis demostren que el gen *FTO* s'autoregula fent que la seva proteïna s'enllaci al seu propi promotor (Liu *et al*, 2019). Alhora el gen *FTO* és un coactivador per reguladors transcripcionals de la família C/EBP (Wu *et al*, 2010). En el nostre estudi el gen *CEBPA*, que pertany a aquesta família, es un candidat per al caràcter ADFI<sub>F</sub>. Aquest FT, que intervé en la regulació de la homeòstasis del pes corporal, també s'ha identificat com un regulador de l'expressió del gen *FTO* (Ren *et al*, 2014). Per tant el polimorfisme identificat (*FTO*c.-738T>C) podria estar afectant l'expressió del gen *FTO* i d'altres reguladors com el *CEBPA* en els nostres animals afectant a diferents caràcters d'eficiència alimentària. Caldria però portar a terme una validació funcional per tal de verificar la nostra hipòtesi (veure apartat validació funcional).

Pel que fa al SNP *FTOc.*-888 A>G, als animals que presenten una G se'ls hi pot unir el FT FOXA1. Aquest factor de transcripció és redundat amb el FOXA2 durant el desenvolupament, el FT explicat anteriorment. El FOXA1 és un FT necessari pel desenvolupament del fetge i el metabolisme de lípids. Com passa amb el FOXA2, el FOXA1 té funció cis-reguladora. A més estudis han comprovat que FOXA1 i FOXA2 s'enllacen a diferents regions d'introns del gen *FTO* (Bochkis *et al*, 2012), pel que també es un bon candidat a provocar variacions en l'expressió del gen *FTO*. Per últim, el SNP *FTOc.*-1090C>T, també modificaria la unió d'un factor de transcripció, el ATF-2, depenent del genotip dels nostres animals. Aquest factor de transcripció, tot i que no s'ha demostrat que pugui regular directament l'expressió del gen *FTO*, es sabut que està involucrat en la regulació de gens que intervenen en el creixement. Ratolins mutants per als gens de la família ATF presenten un baix creixement postnatal i poc creixement (Bhoumik *et al*, 2007). Per tant es interessant investigar si aquest polimorfisme afectaria l'expressió del gen *FTO* a través del FT ATF-2.

Pel que fa al gen *TP53INP1*, també s'han identificat polimorfismes en llocs d'unió de FT. El FT FOXA2 podria unir-se als animals que presenten una C per al SNP *TP53INP1c.*-69C>T. En canvi, en els animals que presenten una T per al *TP53INP1c.*-334C>T s'hi podria unir el FT FOXA1/FOXA2 (LASAGNA-Alignes OregnANNO Models). Com s'ha explicat anteriorment el FOXA1 i FOXA2 estan involucrats en la regulació del metabolisme. Pel que fa al *TP53INP1c.*-317A>G, en els animals amb una G s'hi podria unir el FT GATA-1. El mateix passa amb el *TP53INP1c.*-199delC, on en els animals que no presentin la deleció s'hi podria unir aquest FT. El GATA-1 és un factor de transcripció essencial per a la formació normal dels glòbuls vermells, eritropoesi. En ratolins, la pèrdua de GATA-1 comporta que els eritròcits es vegin involucrats en processos d'apoptosi, provocant anèmies (Ferreira *et al*, 2005; Weiss *et al*, 1995). En aquests processos d'apoptosi hi intervenen gran quantitat de gens, entre els quals trobem el *TP53INP1*. El nostre gen d'estudi està involucrat en processos d'apoptosi, regulant alhora l'autofàgia ( Mello *et al*, 2019). No obstant, caldria realitzar validacions funcionals per determinar si aquests FT es poden unir a la regió promotora del gen *TP53INP1* i si els polimorfismes identificats poden afectar la seva unió.

## **Validació funcional de polimorfismes en regions reguladores**

Un cop identificats els polimorfismes en la regió promotora proximal es poden dur a terme experiments de validació funcional per veure si aquests tenen algun efecte sobre el gen i el caràcter estudiat.

Es poden fer estudis per determinar els nivells de mRNA dels gens candidats mitjançant una tècnica que es coneix amb el nom de PCR quantitativa a temps real (RT-qPCR). En aquesta tècnica el material inicial és RNA el qual és transcrit a cDNA i aquest s'utilitzarà com a motlle per una qPCR. La RT-qPCR té moltes aplicacions, entre les quals es troba la anàlisi d'expressió gènica, podent així observar si els nivells d'expressió varien en funció del genotip dels animals de l'estudi (Freeman *et al*, 1999). Una altra tècnica que es pot utilitzar per veure si els SNPs afecten l'expressió del gen, és la tècnica de la luciferasa. Aquesta tècnica consisteix en introduir la regió promotora amb les diferents mutacions a analitzar en diferents plàsmids. Aquests plàsmids contenen un reporter, que es un gen el qual la seva expressió es pot quantificar fàcilment. En aquest cas és el gen que codifica per a la luciferasa. A continuació els plàsmids es transfecten a les cèl·lules que expressaran el gen de la luciferasa donant lloc a l'enzim luciferasa. Posteriorment, mitjançant una sèrie de reaccions i amb l'acció de la luciferasa, es genera llum que es quantificarà mitjançant un luminòmetre, podent determinar si el polimorfisme afecta o no l'expressió del gen (Saiz, 2014). Per últim, també es poden portar a terme experiments de immunoprecipitació de la cromatina (CHIP) que permeten estudiar la interacció de les proteïnes amb el DNA i per tant determinar si la unió de factors de transcripció pot estar afectada per la presència de mutacions (Gade & Kalvakolanu, 2012).

## **Associació dels polimorfismes amb els caràcters d'interès.**

Per poder analitzar l'associació dels polimorfismes dels gens candidats amb els caràcters d'interès cal prèviament genotipar tota la població per aquests polimorfismes. Existeixen diferents tècniques per realitzar aquest genotipat, algunes més tradicionals i tedioses com la PCR-RFLP. Aquesta tècnica utilitza enzims de restricció per poder observar diferències entre individus, veiem si presenten una mutació a través dels fragments de DNA tallats per els enzims de



restricció (Rasmussen, 2012). Altres tècniques més modernes i menys tedioses i que a més permeten el genotipat d'un gran nombre d'animals per a un gran nombre de SNPs són les basades en la tècnica de la PCR quantitativa a temps real. Una tecnologia que ho permet és la OpenArray. Aquest genotipat es basa en la fluorescència que produeix un colorant en el moment de la hibridació. Depenent de la base que s'hibridi el colorant que emetrà la fluorescència serà diferent. Per tant la mesura del dye permetrà saber quin SNP trobem en aquella seqüència (Thermo Fisher Scientific,2020). També podem trobar altres tècniques per poder genotipar la nostra població. Algunes d'aquestes són la PCR-HRM (High Resolution Melting) o la PCR-AD (PCR de discriminació al·lèlica).

Un cop fet el genotipat es pot realitzar un anàlisi d'associació amb els caràcters d'interès. Els efectes dels polimorfismes en els fenotips es poden analitzar amb un model lineal general (GLM, en anglès). Aquest estudi permetrà saber quins polimorfismes (genotip) estaran associats significativament amb els caràcters de l'estudi. Així posteriorment, els polimorfismes que presentin una associació amb els caràcters d'estudi podran ser utilitzats en programes de selecció genètica per aquests caràcters (Zhang, G-W *et al*,2013; Zhang, G-W *et al*, 2014; Sánchez, J.P *et al*, 2020)

## 6. Conclusions

- La recerca bibliogràfica dels gens candidats associats amb caràcters de creixement i eficiència alimentària ha permès profunditzar en els processos biològics en els quals estan implicats i poder entendre d'una manera més ampla com poden afectar als caràcters analitzats.
- S'han identificat un total de 15 polimorfismes a les regions promotores proximals dels gens *FTO*, *TP53INP1*, i *FEZF2*. Set SNPs al gen *FTO*, sis SNPs i un indel al gen *TP53INP1* i un indel al gen *FEZF2*.
- Els polimorfismes *FTO*c.-1090C>T, *FTO*c.-888A>G, *FTO*c.-738T>C del gen *FTO* i els polimorfismes *TP53INP1*c.-334C>T, *TP53INP1*c.-317A>G, *TP53INP1*c.-69C>T i *TP53INP1*c.-199delC es troben localitzats en llocs d'unió de factors de transcripció.
- És necessari dur a terme estudis funcionals per comprendre com afecten els polimorfismes identificats a l'expressió dels gens *FTO* i *TP53INP1*.
- Els polimorfismes identificats en els gens candidats poden ser utilitzats en un futur com a marcadors genètics en programes de selecció genètica per tal de millorar els caràcters de creixement i eficiència alimentària en conills.

## 7. Bibliografia

Andreassen, O, A., Djurovic, S., Thompson, W, K. *et al.* 2013. Improved detection of common variants associated with schizophrenia by leveraging pleiotropy with cardiovascular-disease risk factors. *The American Journal of Human Genetics* 92, 197-209

Arsenijevic, A., Milovanovic, J., Stojanovic, B. *et al.* 2019. Gal-3 deficiency suppresses *Novosphingobium aromaticivorans* inflammasome activation and IL17 driven autoimmune cholangitis in mice. *Front. Immunol.* 10:1309. Doi: 10.3389/fimmu.2019.01309

Bauer, F., Elbers, C.C., Adan, R, A.H., Loos, R, J.F. *et al.* 2009. Obesity genes identified in genome-wide association studies are associated with nutrient-specific food preference. *Am J Clin Nutr*; 90:951-9

Bhoomik, A., Lopez, P., Ronai, Z. 2007. ATF2 on the double – activating transcription factor and DNA damage response protein. *Pigment Cell Res*; 20(6): 498-506

Bochkis, I., Schug, J., Ye, D. *et al.* 2012. Genome-wide location analysis reveals distinct transcriptional circuitry by paralogous regulators Foxa1 and Foxa2. *PLoS Genetics* Vol.8(6): e10022770

Brenachot, X., Ramadori, G., Ioris, R.M. *et al.* 2017. Hepatic protein tyrosine phosphatase receptor gamma links obesity-induced inflammation to insulin resistance. *Nature Communications* 8: 1820

Cano, C.E., Gommeaux, J., Pietri, S. *et al.* 2009. Tumor protein 53-induced nuclear protein 1 is a major mediator of p53 antioxidant function. *Cancer Research* 69(1),219-226.

Cesari, V., Zucali, M., Brava, L. *et al.* 2018. Environmental impact of rabbit meat: The effect of production efficiency. *Meat Science* 145 (2018) 447-454

Chadoin, R., Bonasera, J. 2018. Mice lacking galectin-3 (*Lgals3*) function have decreased home cage movement. *BMC Neuroscience* 19:27

Clare, A., Wicky, H., Empson, R., Hughes, S. 2017. RNA-sequencing analysis reveals a regulatory role for transcription factor *FEZF2* in the mature motor cortex. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 10: 283

Corominas, J., Ramayo-Caldas, Y., Puig-Oliveras, A. *et al.* 2013. Polymorphism in the *ELOVL6* gene is associated with a major QTL effect on fatty acid composition in pigs. *PLoS ONE* 8(1): e53687

Crespo, D. 2018. Genomic analysis of fatty acid composition and gut microbiota in pigs. Tesis Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona, Departament de Ciència Animal i dels Aliments.

Cressant, A., Dubreuil, V., Kong, J., *et al.* 2017. Loss-of-function of PTPR  $\gamma$  and  $\zeta$ , observed in sporadic schizophrenia, causes brain region-specific deregulation of monoamine levels and altered behavior in mice. *Psychopharmacology* 234: 575-587.

Cullere, M., Dalle Zotte, A. 2018. Rabbit meat production and consumption: State of knowledge and future perspectives. *Meat science* 143, 137-146

Dalle Zotte, A., Szendro, Zs. 2011 The role of rabbit meat as functional food. Meat science 88, 319-331

Database, G., 2020. *CA2 Gene - Genecards | CAH2 Protein | CAH2 Antibody*. [online]:Genecards.org.<<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CA2&keywords=CA2#expression>> [Accès 12 Març 2020].

Database, G., 2020. *CEBPA Gene - Genecards | CEBPA Protein | CEBPA Antibody*. [online]:Genecards.org.<<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CEBPA&keywords=CEBPA#summaries>> [Accès 13 Març 2020].

Database, G., 2020. *FEZF2 Gene - Genecards | FEZF2 Protein | FEZF2 Antibody*. [online]Genecards.org.<<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=FEZF2&keywords=fezf2#expression>> [Accès 12 Març 2020].

Do, DN., Strathe, AB., Ostersen, T. *et al.* 2014. Genome-wide association and pathway analysis of feed efficiency in pigs reveal candidate genes and pathways for residual feed intake. *Front. Genet* 5:307

Ensembl.org. 2020. *Ensembl Genome Browser* 99. [online]:<<https://www.ensembl.org/index.html>>

Estany, J., Camacho, J., Baselga, J., Blasco, A. 1992. Selection response of growth rate in rabbits for meat production. *Genet sel Evol* (1992) 24, 527-537 FAOSTAT 2018. [Online]: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QL/visualize>

European Union. 2017. Overview report – Commercial Rabbit Farming in the European Union. [Online] <https://op.europa.eu/es/publication-detail/-/publication/5029d977-387c-11e8-b5fe-01aa75ed71a1>

Feki, S., Baselga, M., Blas, E. *et al.* 1996. Comparasion of growth and feed efficiency among rabbit lines selected for diferent objectives. *Livestock Production Science* 45, 87-92

Ferreira, R., Ohneda, K., Yamamoto, M., Philipsen, S. 2005. GATA1 function, a paradigma for transcription factors in hematopoiesis. *Molecular and cellular biology*, p. 1215-1227

Freeman, W., Walker, S., Vrana, K. 1999. Quantitative RT-qPCR: Pitfalls and potential. *BioTechniques* 26: 112-125

Gade, P., Kalvakolanu, D. 2012. Chromatin immunoprecipitation assay as a tool for analyzing transcription factor activity. *Methods Mol Biol*; 809: 85-104.

Gan, W., Song, Q., Zhang, N, N. *et al.* 2015. Association between *FTO* polymorphism in exo 3 with carcass and meat quality traits in crossbred ducks. *Genetics and Molecular Research* 14 (2): 6699-6714

Gao, X., Shin, Y-H., Li, M. *et al.* (2010) The fat mass and obesity Associated Gene *FTO* Functions in the Brain to Regulate Postnatal Growth in Mice. *PLoS ONE* 5(11): e14005. Doi:10.1371/journal.pone.0014005

Guerriero, E., Accardo, M., Capone, F. 2014. Assesment of the Selenoprotein M (SELM) over-expression on human hepatocellular carcinoma tissues by immunohistochemistry. *European Journal of Histochemistry*; volume 58: 2433

Guo, J., Rem, W., Ding, Y. *et al.* Fat mass and obesity associated gene (*FTO*) expression is regulated negatively by the transcription factor FOXA2. *PLOS ONE* vol7(2): e51082

Gidenne, T., Garreau, H., Drouilhet, L. *et al.* 2017. Improving feed efficiency in rabbit production, a review on nutritional, technico-economical, genètic and environmental aspects. *Animal feed Science and Technology* 225 (2017) 109-122

Gómez E, A., Morón J, L., Rafel O., Ramon J., Perucho O. 1999. Conscuencias de la prolongación del engorde sobre consumo de pienso, peso vivo y rendimineto a la canal Unitat de Cunicultura IRTA, Torre Merimon, Caldes de Montbui, 08140 Barcelona. Escola Superior d'Agricultura de Barcelona. 08036 Barcelona

Gómez E.A., Rafel O., Ramón J. The Caldes Strain (Spain). In : Khalil M.H. (ed.), Baselga M. (ed.). *Rabbit genetic resources in Mediterranean countries*. Zaragoza : CIHEAM, 2002. p. 193-198 (Options Méditerranéennes : Série B. Etudes et Recherches; n. 38

Hill, R. A. (2012). *Feed Efficiency in the Beef Industry*. (R. A. Hill, Ed.), *Feed Efficiency in the Beef Industry* (1st ed). Oxford, UK: Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9781118392331>

Hirata, T., Suda, Y., Nakao, K. *et al.* 2004. Zinc Finger Gene *fez-like* funcions in the formation of subplate neurons and thalamocortical axons. *Developmental Dynamics* 230(3), 546-556

Horodyska, J., Reyer, H., Wimmers, K. *et al.* 2019. Transcriptome analysis of adipose tissue from pigs divergent in feed efficiency reveals alteration in gene networks related to adipose growth, lípid metabolism, extracellullar matrix, and immune response. *Molecular Genetics and Genomics* 294: 395-408

Huang, J-Q., Ren, F-Z., Jiang, Y-Y. *et al.* 2016. Characteritzation of Selenoprotein M and its response to selenium deficiency in chicken brain. *Biol Trace Elem Res* 170: 449-458

Informatics.jax.org. 2020. *Fezf2 MGI Mouse Gene Detail - MGI:1859823 - Fez Family Zinc Finger 2*. Online:

<<http://www.informatics.jax.org/marker/MGI:1859823>> [Accès 12 Març 2020]

Informatics.jax.org. 2020. *Kctd15 MGI Mouse Gene Detail - MGI:2385276 - Potassium Channel Tetramerisation Domain Containing 15*. [online] :

<<http://www.informatics.jax.org/marker/MGI:2385276>> [Accès 12 Març 2020].

Informatics.jax.org. 2020. *Lgals3 MGI Mouse Gene Detail - MGI:96778 - Lectin, Galactose Binding, Soluble 3*. [online]:

<<http://www.informatics.jax.org/marker/MGI:96778>> [Accès 13 Març 2020].

Knudsen, C., Combes, S., Briens, C. *et al.* 2014. Increasing the digestible energy intake under a restriction strategy improves the feed conversion ratio of the growing rabbit without negatively impacting the health status. *Livestock Science* 169 (2014) 96-105

Lamprianou, S., Vacaresse, N., Suzuki, Y. *et al.* 2006. Receptor protein tyrosine phosphatase  $\gamma$  is a marker for pyramidal cells and sensory neurons in the nervous system and is not necessary for normal development. *Molecular and cellular biology*, p. 5106-5119

Larzul, C., De Rochambeau, H. 2004. Comparison of ten rabbit lines of terminal bucks for growth, feed efficiency and carcass traits. *Anim. Res.* 53 (2004) 535-545

Latchman, D. 1993. Transcription factors: an overview. *Int. J. Exp. Pathol.* 74, 417-422

Lebas, F., Coudert, P., De Rochambeau, R., Thébault, R.G. 1997. The rabbit husbandry, Health and production

Lewis, S. E., Erickson, R. P., Barnett, L. B. *et al.* 1988. *N*-Ethyl-*N*-nitrosourea-induced null mutation at the mouse *Car-2* locus: An animal model for human carbonic anhydrase II deficiency syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*. Vol 85, 1962-1966

Liang, S. S., Ouyang, H.J., Liu, J. *et al.* 2015. Expression of variant transcripts of the potassium channel tetramerization domain-containing 15 (*KCTD15*) gene and their association with fatness traits in chickens. *Domestic Animal Endocrinology* 50: 65-71

Liu, J., Chen, Q., Rozovsky, S. 2018. Selenocysteine mediated expressed protein ligation of SELENOM. *Methods Mol Biol.* 1661: 265-283. doi:10.1007/978-1-4939-7258-6\_19

Liu, S., Tang, H-K., He, Q. *et al.* *FTO* is a transcriptional repressor to auto-regulate its own gene and potentially associated with homeostasis of body weight. *Journal of Molecular Cell Biology*, 11(2), 118-132

Madeira, M., Rolo, E., Pires, V. *et al.* 2017. Arginine supplementation modulates pig plasma lipids, but not hepatic fatty acids, depending on dietary protein level with or without leucine. *BMC Veterinary Research* 13:145

Maertens, L. 2009. Possibilities to reduce the feed conversion in rabbit production. *Giornate di Conigliicoltura*. ASIC, Italy, pp.1-9

Margolis, D. S., Szivek, J.A., Lai, L-W., Lien, Y-H, H. 2008. Phenotypic characteristics of bone in carbonic anhydrase II-deficient mice. *Calcif Tissue Int* 82: 66-76

McMurray, F., Church, C.D., Larder, R., Nicholson, G., Wells, S., *et al.* 2013. Adult Onset Global Loss of the *FTO* Gene Alters Body Composition and Metabolism in the Mouse. *PLoS Genet* 9(1): e1003166. doi:10.1371/journal.pgen.1003166

Mello, F., Land, M., Costa, E. *et al.* 2019. Maturation-associated gene expression profiles during normal human bone marrow erythropoiesis. *Cell Death Discovery* 5:69

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. [Online]:

<https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercadosganaderos/sectores-ganaderos/cunicola/>

Nadeem, M.A., Nawaz, M.A., Shahid, M.Q. *et al.* 2018. DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 32:2,261-285

Orr, S., Le, D., Long, J. *et al.* 2013. A phenotype survey of 36 mutant mouse strains with gene-targeted defects in glycosyltransferases or glycan-binding proteins. *Glycobiology* vol. 23 no.3 pp.363-380

Pejnovic, N., Pantic, J., Jovanovic, I. *et al.* 2013. Galtectin-3 is a regulator of metaflammation in adipose tissue and pancreatic islets. *Adipocyte* 2:4, 266-271

Petrović, M, P., Selionova, M, I., Petrović, V, C. *et al.* 2018. The application of modern molecular techniques in animal selection. *Biotechnology in Animal Husbandry* 34 (4), 371-386

Pitts, M, W., Reeves, M, A., Hashimoto, A, C. *et al.* 2013. Deletion of selenoprotein M leads to obesity without cognitive deficits. *The Journal of biological Chemistry* Vol. 288, No. 36, pp. 26121-26134

Rasmussen, H. (2012). Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-Amplified Fragments (PCR-RFLP) and Gel Electrophoresis - Valuable Tool for Genotyping and Genetic Fingerprinting, *Gel Electrophoresis - Principles and Basics*, Dr. Sameh Magdeldin (Ed.), ISBN: 978-953-51-0458-2, InTech,

Ren, W., Guo, J., Jiang, F. *et al.* 2014. CCAAT/Enhancer-binding protein  $\alpha$  is a crucial regulator of human fat mass and obesity associated gene transcription and expression. *BioMed Research International*

Saadi, H., Seillier, M., Carrier, A. 2015. The stress protein *TP53INP1* plays a tumor suppressive role by regulating metabolic homeostasis. *Biochimie* 118, 44-50

Saiz, S. 2014. Desarrollo y aplicación de un sistema integrativa de luciferasa para la cuantificación de la expresión génica *in vivo*. *Trabajo final de grado en biotecnología*. Universitat Politècnica de València.

Sánchez, J.P., Legarra, A., Velasco, M. *et al.* 2019. Análisis de asociación genómico para crecimiento individual y eficiencia alimentaria colectiva en conejos bajo dos regímenes de alimentación. XVII Jornadas sobre producción animal, Campus de Aula Dei, Zaragoza, Spain

Sánchez, J.P., Legarra, A., Velasco, M. *et al.* 2020. Genome-wide association study for feed efficiency in collective cage-raised rabbits under full and restricted feeding. *Animal Genetics* (Not published yet)

Sherman, E., Nkrumah, J., Moore, S. 2010. Whole genome single nucleotide polymorphism associations with feed intake and feed efficiency in beef cattle *J. Anim. Sci.* 88: 16-22

Seillier, M., Peugeot, S., Gayet, O., *et al.* 2012. *TP53INP1*, a tumor suppressor, interacts with LC3 and ATG8-family proteins through the LC3-interacting region (LIR) and

promotes autophagy-dependent cell death. *Cell Death and Differentiation* (2012) 19, 1525-1535; doi:10.1038/cdd.2012.30

Seux, M., Peugeot, S., Montero, M.P. *et al.* 2011. *TP53/INP1* decreases pancreatic cancer cell migration by regulating SPARC expression. *Oncogen*(2011) 30, 3049-3061; doi:10.1038/onc.2011.25

Smaldone, G., Pirone, L., Capolupo, A. *et al.* 2018. The essential Player in adipogenesis GRP78 is a novel KCTD15 interactor. *International Journal of Biological Macromolecules* 115, 469-475

Sosa-Madrid, B.S., Hernandez, P., Blasco, A. *et al.* 2019. Genomic regions influencing intramuscular fat in divergently selected rabbit lines. *Animal Genetics*, 51, 58-69

Sosa-Madrid, B.S., Santacreu, M.A., Ibáñez-Escriche, N., Blasco, A. 2017. Regiones genómicas asociadas con caracteres reproductivos en conejo. AIDA, XVII Jornadas sobre producción Animal, 549-551

Stojanovic, B., Milovanovic, J., Arsenijevic, A. *et al.* 2019. Galectin-3 Deficiency Facilitates TNF- $\alpha$ -dependent hepatocyte death and liver inflammation in MCMV infection. *Front. Microbiol.* 10:185. doi: 10.3389/fmicb.2019.00185

Tan, E. H., Hooi, S. C., Laban, M. *et al.* 2005. CCAAT/Enhancer binding protein  $\alpha$  knock-in exhibit early liver glycogen storage and reduced susceptibility to hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.*, 65: 10330-10337

Thermo Fisher Scientific. PCR en tiempo real OpenArray [Online]: <https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-openarray.html>. [Accès 22 de maig de 2020]

Tomasini, R., Seux, M., Nowak, J. *et al.* 2005. *TP53/INP1* is a novel p73 target gene that induces cell cycle arrest and cell death by modulating p73 transcriptional activity. *Oncogen* 24, 8093-8104 (2005)

Trocino, A., Cotozzolo, E., Zomeño, C. 2019. Rabbit production and science: The world and Italian scenarios from 1998 to 2018. *Italian journal of Animal Science*. 18:1, 1361-1371 doi: 10.1080/1828051X.2019.1662739

Tůmová, E., Volek, Z., Chodová, D. *et al.* 2015. The effect of 1-week feed restriction on performance, digestibility of nutrients and digestive system development in the growing rabbit. *Snimsl* (2016), 10:1, pp 1-9

Venta, P. J., Montgomery, J. C., Hewett-Emmett, D., Wiebauer, K., Tashien, R. E. 1985. Structure and exon to protein domain relationships of the mouse carbonic anhydrase II gene. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol 260(22) 12130-12135

Wang, G., Shi, X., Haefliger, S. *et al.* 2010 Elimination of C/EBP $\alpha$  through the ubiquitin-proteasome system promotes the development of liver cancer in mice. *The Journal of Clinical Investigation*. 120(7): 2549- 2562



Warnez-Soulie, J., Macia, M., Lac, S. *et al.* 2019. Tumor protein 53-induced nuclear protein 1 deficiency alters mouse gastrocnemius muscle function and bioenergetics in vivo. *Physiol Rep*, 7 (10), e14055; doi: 10.14814/phy2.14055

Weiss, M., Orkin, S. 1995. Transcription factor GATA-1 permits survival and maturation of erythroid precursors by preventing apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa* Vol 92, pp. 9623-9627

Wu, Q., Saunders, R., Szkudlarek-Mikho, M. *et al.* 2010. The obesity-associated *FTO* gene is a transcriptional coactivator. *Biochem Biophys Res Commun*; 401(3): 390-395

Xing, J., Jing, W., Jiang, Y. 2013. Molecular characterization and expression analysis of fat mass and obesity-associated gene in rabbit. *Journal of Genetics*, Vol. 92, No. 3

Xu, J., Koni, P, A., Wang, P. *et al.* 2003. The voltage-gated potassium channel Kv1.3 regulates energy homeostasis and body weight. *Human Molecular Genetics*, Vol 12(5) 551-559

Yang, J., Croniger, C., Lekstrom-Himes, J. *et al.* Metabolic response of mice to postnatal ablation of CCAAT/Enhancer-binding protein  $\alpha$ . *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 280, No 46, pp. 38689-38699

Yeo, G.S.H. 2014. The role of the *FTO* (*Fat Mass and Obesity related*) locus in regulating body size and composition. *Molecular and Cellular Endocrinology* 397, 34-41

Zhang, C., Wang, H., Chen, Z. *et al.* 2018. Carbonic anhydrase 2 inhibits epithelial-mesenchymal transition and metastasis in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* Vol 39 (4) 562-570

Zhang, G-W., Gao, L., Chen, S-Y. *et al.* 2013. Single nucleotide polymorphism in the *FTO* gene and their association with growth and meat quality traits in rabbits. *Gene* 527, 553-557

Zhang, G-W., Jia, W., Chen, S-Y., Jia, X-B., Wang, J., Lai, S-J. 2014. Association between the *IRS1* and *FTO* genes regulates body weight in rabbits. *Gene* 548, 75-80

Zhang, S., Li, J., Lea, R., Vleminckx, K., Amaya, E. 2014. *FEZF2* promotes neuronal differentiation through localized activation of Wnt/ $\beta$ -catenin signalling during forebrain development. *Development* 141, 4794-4805 doi:10.1242/dev.115691

Zhang, W., Savelieva, K, V., Tran, D, T. *et al.* 2012. Characterization of *PTPRG* in knockdown and Phosphatase-inactive mutant mice and substrate trapping analysis of *PTPRG* in mammalian cell. *PLoS ONE* 7(9): e45500. Doi:10.1371/journal.pone.0045500

## 8. Annex

Taula 1: Identificador Animal – Mostra per a l'amplificació de la regió promotora

ID Animal	ID Mostra	Gens estudiats
113238	1	<i>FTO, FEZF2,TP53INP,CA2</i>
116167	2	<i>FTO, FEZF2,TP53INP1,CA2</i>
113146	3	<i>FTO, FEZF2,TP53INP1,CA2</i>
114760	4	<i>FTO, FEZF2,TP53INP1,CA2</i>
115277	5	<i>FTO, FEZF2,TP53INP1,CA2</i>
113165	6	<i>FTO, FEZF2,TP53INP1,CA2</i>
115259	7	<i>FTO, FEZF2,TP53INP1,CA2</i>
115069	8	<i>FTO, FEZF2,TP53INP1,CA2</i>
113122	9	<i>FTO, FEZF2,TP53INP1,CA2</i>
113058	10	<i>FTO, FEZF2,TP53INP1,CA2</i>
113063	11	<i>FTO, FEZF2,TP53INP1,CA2</i>
116206	12	<i>FTO, FEZF2,TP53INP1,CA2</i>

Taula 2: Identificador Animal – Mostra per l'amplificació de la regió codificant

ID Animal	ID Mostra	Gens estudiats
155068	1	<i>KCTD15</i>
155139	2	<i>KCTD15</i>
155106	3	<i>KCTD15</i>
755045	4	<i>KCTD15</i>
755063	5	<i>KCTD15</i>
755036	6	<i>KCTD15</i>
355063	7	<i>KCTD15</i>
355088	8	<i>KCTD15</i>
355027	9	<i>KCTD15</i>

Taula 3: Primers dels gens d'interès

<b>GEN</b>	<b>Primer Forward</b>	<b>Primer Reverse</b>	<b>Regió</b>
<i>FTO</i> Parella 1	CACCATTTCACTACCCGTC	CAGTCTGAGATCCGCTTGC	Promotor
<i>FTO</i> Parella 2	CAGCCTCAAGTCTCATCCACT	GGCTTAATACCGTGCATCCTG	Promotor
<i>FEZF2</i>	TTCCCCATTAACAAGTCCCC	CGTGCCTCTTCTGTACATTT	Promotor
<i>TP53INP1</i>	CAAGTGATAACTTCTGGGGC	GTCCTTTTGTGTTGTGCAGC	Promotor
<i>CA2</i>	GCGATCATAAAGTGGACAGGA	GATTCCTCGACAGTGGCTTG	Promotor
<i>PTPRG</i> Parella 1	GGGAATCAAATCCCAACGTAA	ATAGAAACGGCCGGAGGAAA	Promotor
<i>PTPRG</i> Parella 2	TGCTCACATGTTACTTCTGT	AAGCACACGACATAATGGAGC	Promotor
<i>LGALS3</i>	AACGATGCCCTATCTGGGTCT	AGGAAGTCTGTCCCTCCAGA	cDNA
<i>KCTD15</i> Parella 1	GATGCATTTGTCGGAGGGAG	CCACCAGGAGTACACAGG	cDNA
<i>KCTD15</i> Parella 2	TTCTCCCCGATGACTTCAAGG	CCCACCTCAGTCTCATGG	cDNA

## Electroforesis en gels d'agarosa dels productes d'amplificació dels gens candidats

Foto 1: Gel amplificació gen *CA2*

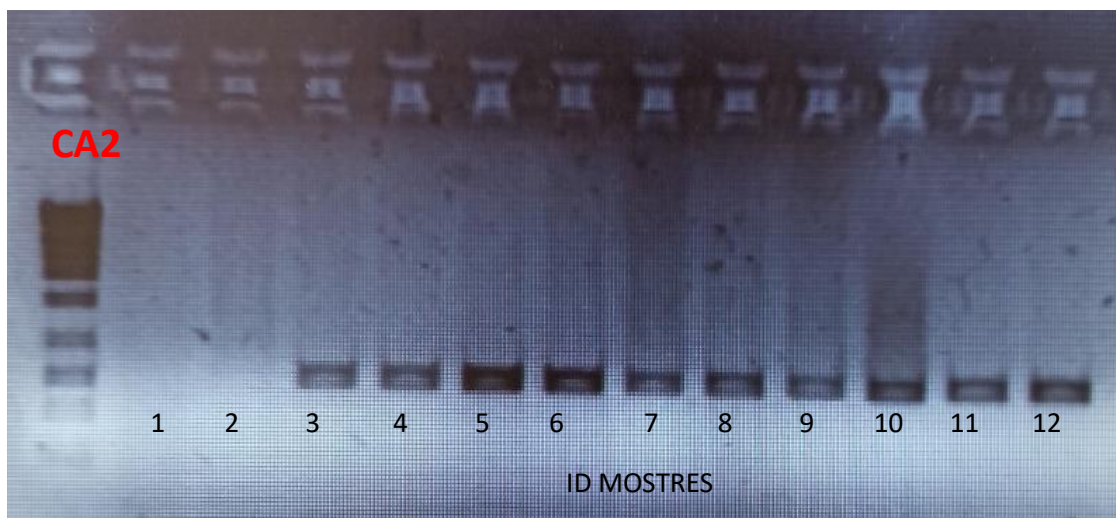


Foto 2: Gel amplificació gen *TP53INP1*

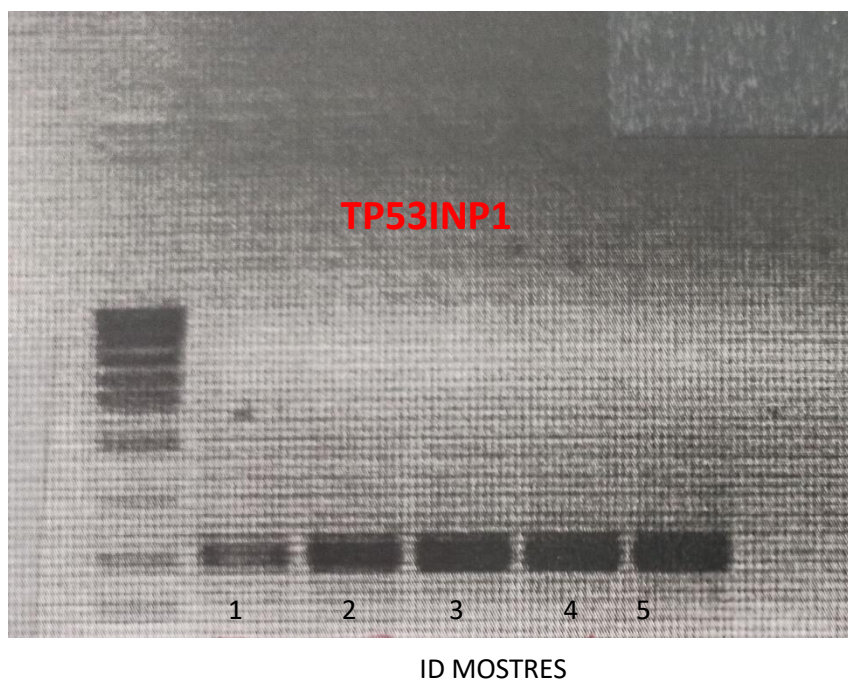


Foto 3: Gel amplificació gen *TP53INP1*

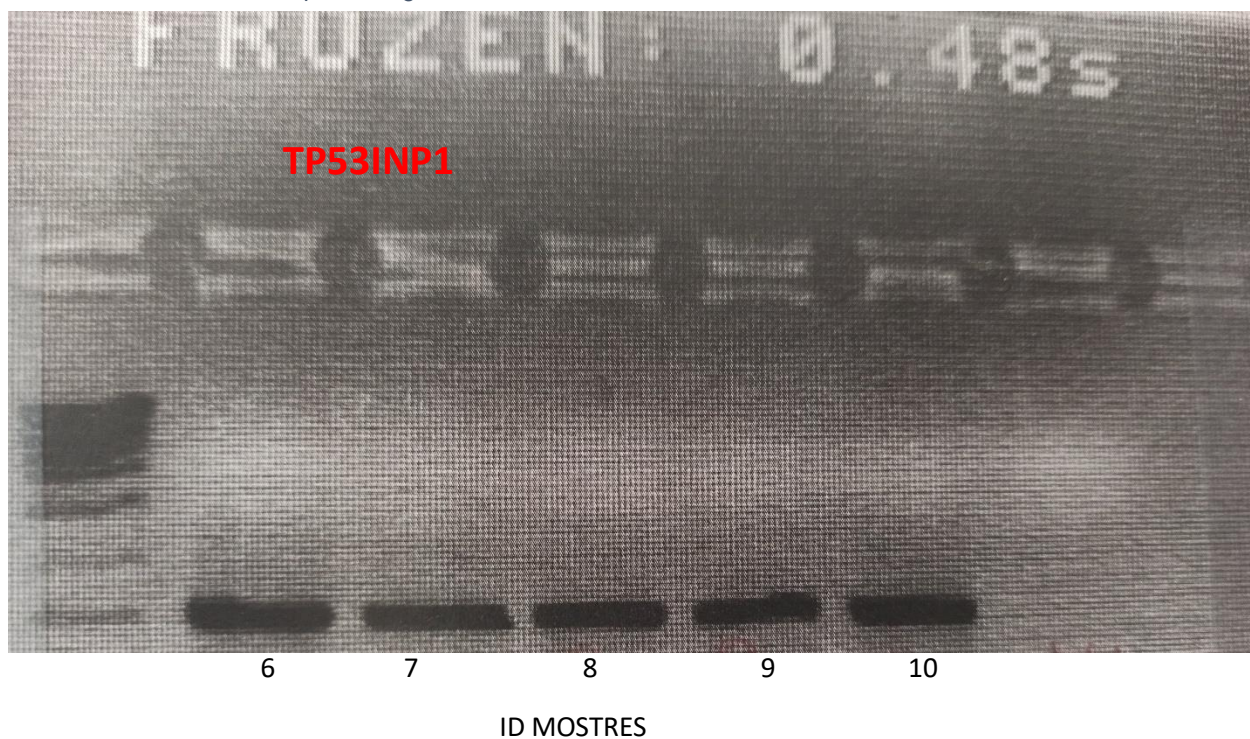


Foto 4: Gel amplificació gen *FTO* i *FEZF2*

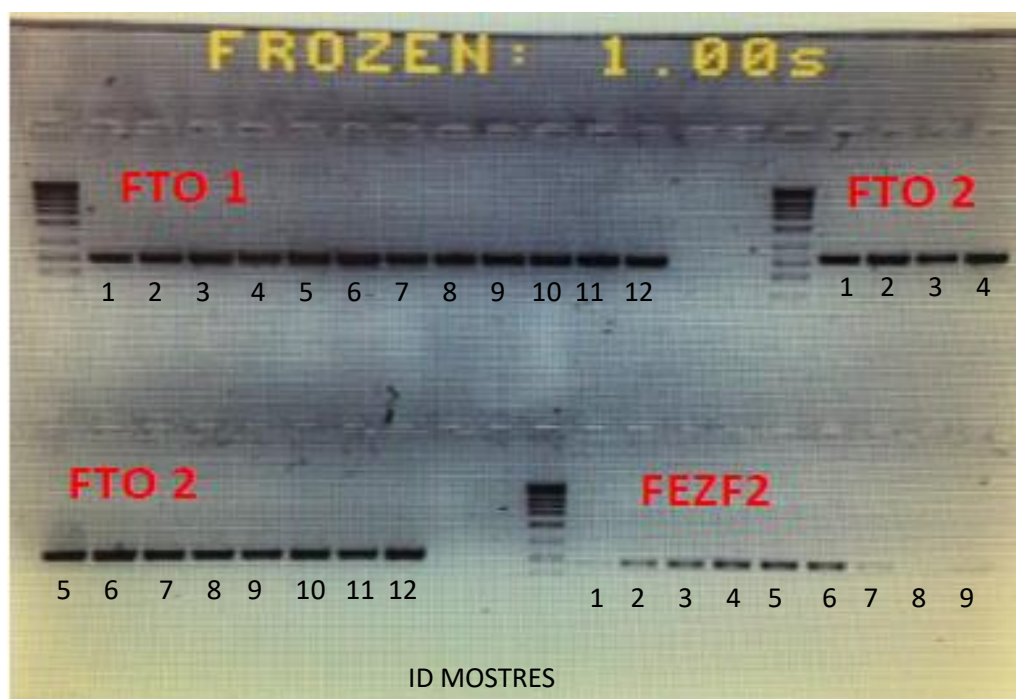


Foto 5: Gel amplificació *FEZF2*



Foto 6: Gel amplificació *KCTD15*



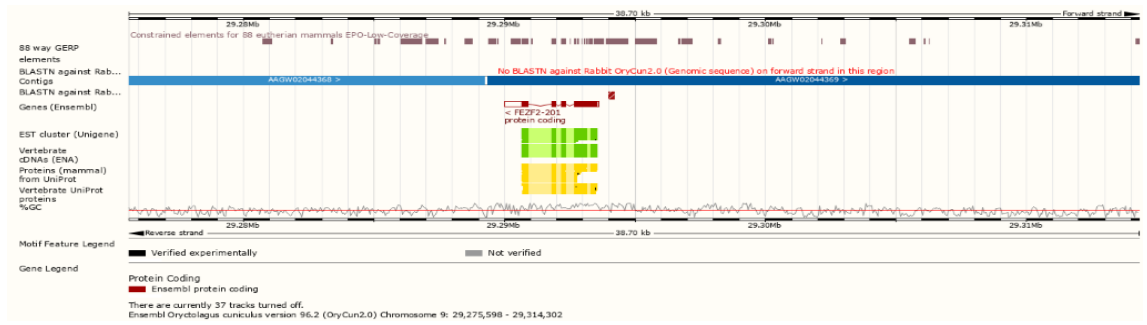


Figura 1: BLASTN del primer exó humà vs. Genoma del conill



Taula 4: Taula SNPs – Factors de Transcripció gen *FTO*

SNPs	1	2	3	4	5	6	7
C-A-G-T-A-C-G	ATF-2	HNF4	GATA6	GATA6	GATA6	GATA6	No s'enganxa cap
T-G-C-T-G-T-T	GATA6 Pos34 GATA6 pos30	FOXA1	GATA-6	GATA6	GATA-6 pos 541 R Gata6 pos 543 F	Gata6	No s'enganxa cap
C-G-C-T-A-C-T	ATF-2	FOXA1	GATA-6	Gata6	Gata-6	Gata6	No s'enganxa cap
C-G-G-C-A-C-T	ATF-2 pos 37 F HNF4 pos 36 R	HNF4 pos 230 R FOXA1 pos 241 R	GATA-6	Foxa2	GATA-6 pos 541 reverse HNF4A pos 549 R	Gata6	No s'enganxa cap
C-A-G-C-A-C-G	ATF-2 Pos 37 F HNF4 pos 36 R	HNF4A	GATA-6	Foxa2	GATA-6 pos 541 R HNF4A pos 549 R	Gata6	No s'enganxa cap
T-G-G-T-G-T-T	GATA-6 pos 34 R Gata6 pos 30 R	HNF4 pos 230 R FOXA1 pos 241 R	GATA-6	Gata6	GATA-6 pos 541 R Gata6 pos 543 F HNF4A pos 549 R	Gata6	No s'enganxa cap

Factors de Transcripció: ATF-2 Gata4 HNF4 FOXA1 FOXA2

Taula 5: Taula SNPs – Factors de transcripció gen *TP53INP1*

SNPs	1	2	3	4	5	6	7
C-T-A-A-CC-T-C	GATA1 b53 E2F1	FOXA1/FOXA2 FOXA2 CTCF	ATF-2 CTCF FOXA2	GATA1	No s'hi uneix cap TF	GATA1	FOXA2 b53
C-C-A-A-CCC-C-C	GATA1 b53 E2F1	FOXA2 CTCF	ATF-2 CTCF FOXA2	GATA1	GATA1	GATA1	FOXA2 b53
T-T-A-A-CCC-C-T	GATA1 b53 E2F1	FOXA1/FOXA2 FOXA2 CTCF	ATF-2 CTCF FOXA2	GATA1	FOXA2 GATA1	GATA1	b53
C-T-A-A-CCC	GATA1 b53 E2F1	FOXA1/FOXA2 FOXA2 CTCF	ATF-2 CTCF FOXA2	GATA1	GATA1	GATA1	FOXA2 b53
T-T-A-A-CC	GATA1 b53 E2F1	FOXA1/FOXA2 FOXA2 CTCF	ATF-2 CTCF FOXA2	GATA1	No s'hi uneix cap TF	GATA1	FOXA2 b53
C-T-A-A-CC-C-C	GATA1 b53 E2F1	FOXA1/FOXA2 FOXA2 CTCF	ATF-2 CTCF FOXA2	GATA1	No s'hi uneix cap TF	GATA1	FOXA2 b53
T-T-A-G-CCC-C-T	GATA1 b53 E2F1	FOXA1/FOXA2 FOXA2 CTCF	ATF-2 CTCF FOXA2	GATA1	GATA1 FOXA2	GATA1	b53
C-C-A-G-CCC-C-C	GATA1 b53 E2F1	FOXA2 CTCF	ATF-2 CTCF FOXA2	GATA1	GATA1	GATA1	FOXA2 b53
C-T-G-G-CC	GATA1 b53 E2F1	FOXA1/FOXA2 FOXA2 CTCF	ATF-2 GATA1 CTCF	GATA1	No s'hi uneix cap TF	GATA1	FOXA2 b53

Factors de Transcripció: GATA1 FOXA1/FOXA2 FOXA2 CTCF ATF-2 b53 E2F1