

EL EXON 2 DEL GEN DRB DEL COMPLEJO DE HISTOCOMPATIBILIDAD CAPRINO COMO MARCADOR PARA DIAGNOSTICO DE PARENTESCO

M. AMILLS, O. FRANCINO, A. SANCHEZ

Unitat de Genètica i Millora, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona.

08903-Bellaterra

INTRODUCCION

El hecho de ignorar las relaciones de parentesco entre los individuos analizados para determinar el efecto de un gen mayor sobre diversos parámetros productivos, puede introducir un sesgo notable en los resultados obtenidos debido a la coexistencia de efectos poligénicos (Kennedy et al., 1992). Con la finalidad de establecer correlaciones fiables entre el genotipo para caseína $\alpha 1$ y caracteres productivos asociados al rendimiento quesero, se ha diseñado un método de diagnóstico de parentesco que incluye la utilización de cuatro microsatélites -INRA5, INRA6, INRA23 (Peppin et al. 1994), OarAE54 (Penty et al. 1993) y DRB (Schwaiger et al. 1993)- y del exón 2 del gen DRB del complejo de histocompatibilidad de clase II caprino. Este último marcador ha demostrado poseer un elevado polimorfismo de restricción para la endonucleasa de restricción *RsaI*, por lo que resulta un candidato ideal para realizar pruebas de diagnóstico de parentesco.

Las moléculas del complejo de histocompatibilidad de clase II (MHCII) son glicoproteínas diméricas (dos cadenas, α y β) que se hallan en la superficie de los macrófagos y los linfocitos B, y que se encargan de presentar péptidos antigénicos a los linfocitos T4, estimulando así la respuesta inmune celular. Existen, fundamentalmente, tres subtipos de moléculas MHCII (DP, DQ y DR) en las diversas especies domésticas, aunque luego hayan otros subtipos de menor relevancia (Tizard, 1987). El exón 2 del gen DRB codifica el dominio $\beta 1$ de la molécula DR, región que forma parte del *lugar de reconocimiento del antígeno*. De forma similar a como sucede con las inmunoglobulinas, esta región presenta una elevada variabilidad con 22 secuencias descritas hasta la fecha en caprino (Schwaiger et al. 1993, Amills et al. 1995), hecho que le permite unirse eficazmente a distintos péptidos antigénicos y presentarlos a los linfocitos T4. En el presente trabajo, se describe la existencia de un elevado polimorfismo de restricción para la endonucleasa *RsaI* en dicha región, y su posible aplicación en pruebas de diagnóstico de parentesco.

MATERIAL Y METODOS

Extracción de ADN genómico: Las extracciones de ADN se realizaron a partir de muestras de sangre utilizando el protocolo de Debomoy et al. (1991) con algunas modificaciones.

Amplificación del segundo exón del gen DRB caprino: Se realizó utilizando una estrategia de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) anidada, con la finalidad de maximizar el rendimiento y especificidad de la reacción de amplificación. En la primera ronda de PCR se amplificó el segundo exón y 200 pares de bases (pb) del segundo intrón del gen DRB utilizando los oligonucleótidos DRB1.1 (5'-TATCCCGTCTCTGCAGCACATTTTC-3), complementario al extremo 5' del exón 2, y G1o (5'-CGTACCCAGAGTGAGTGA GTGAAGTATC-3'), previamente descrito por Schwaiger et al. (1993). Las condiciones fueron las siguientes: 2.5 mM MgCl₂, 100 μM dNTP, 0.1 μM de cada oligonucleótido, 20 ng ADN genómico y 0.5 U de Taq polimerasa. El perfil térmico de la reacción fue: 5 min a 94°C para desnaturalizar completamente el ADN genómico, y a continuación 60 seg a 94°C, 120 seg a 60°C y 60 seg a 72°C durante 10 ciclos.

A continuación, 10 μl de la primera ronda de PCR se utilizaron como ADN molde en la segunda ronda de PCR. En dicha ronda se amplificó únicamente el exón 2 (285 pb) utilizando los oligonucleótidos DRB1.1 y DRB1.2 (5'-TCGCCGCTGCACACTGAAAC TCTC-3'), complementario al extremo 3' del exón 2. Las condiciones fueron las mismas que en la primera ronda. El perfil térmico de la segunda ronda fue: 60 seg a 94°C, 30 seg a 65°C y 30 seg a 72°C durante 25 ciclos.

Identificación del polimorfismo de restricción para RsaI: 15 μl de la segunda ronda de PCR fueron digeridos con 5U de RsaI (Promega) a 37°C/ 12 h. Posteriormente, el producto de dicha digestión fue migrado en un gel de poliacrilamida al 10% (8°C, 120 V/5h).

RESULTADOS Y DISCUSION

Al digerir el producto amplificado correspondiente al exón 2 con la endonucleasa de restricción RsaI, se obtuvieron patrones multialélicos debido a la existencia de 6 dianas de restricción polimórficas en las posiciones 79, 91, 112, 142, 181 y 235 pb de dicho producto. Utilizando el programa RESTRIC del paquete de programas PCgene (Intelligenetic Inc. & Genofit S.A), se compararon los patrones obtenidos con los de las distintas secuencias publicadas (1) (Schwaiger et al., 1993), identificando así cuatro nuevos patrones de restricción (2):

(1) 79/33/30/39/104 pb, 91/21/30/39/54/50 pb, 91/51/39/54/50 pb, 112/30/39/54/50 pb, 112/69/54/50 pb, 112/69/104 pb, 142/39/104 pb, 181/54/50 pb, 181/104 pb

(2) 79/33/30/39/54/50 pb, 79/63/39/54/50 pb, 142/39/54/50 pb, 285 pb

Estos nuevos patrones de restricción se confirmaron mediante el análisis de su segregación en un pedigrí de dos y, en algunos casos, tres generaciones constituido por 40 individuos de raza murciano-granadina. Igualmente, se observó la existencia de una herencia mendeliana codominante para los mismos. La conjunción de estos dos factores, un elevado polimorfismo y una herencia codominante, convierte al exón 2 del gen DRB en un excelente candidato para realizar pruebas de parentesco.

La distribución de las dianas de restricción para *RsaI* (GTAC) en el exón 2 no es aleatoria, sino que coincide con la de los codones codificantes para el aminoácido tirosina (TAC). Así pues, la existencia de dianas de restricción en las posiciones 79, 91, 112, 142, 181 y 235 pb del exón 2 está asociada a la existencia de residuos tirosina en las posiciones 26, 30, 37, 47, 60 y 78 del dominio $\beta 1$ de la molécula DR. A su vez, dichos residuos están implicados en la formación del *lugar de reconocimiento del antígeno* (Brown et al. 1993), por lo que la existencia de diversas sustituciones en las mismas podría afectar de forma muy significativa la presentación de un determinado péptido antigénico a los linfocitos T4. En este sentido, la metodología PCR combinada con análisis de restricción para *RsaI* podría emplearse no sólo como prueba de diagnóstico de parentesco, sino también como una herramienta para dilucidar el sentido biológico del polimorfismo *tirosina versus otras sustituciones* en las posiciones citadas, e incluso su posible asociación con una mayor o menor resistencia a determinadas enfermedades.

BIBLIOGRAFIA

- Amills M. et al. (1995). *Veterinary Immunology and Immunopathology* (aceptado).
Brown et al. (1993). *Nature*, 364:33-39.
Debomoy et al. (1991). *Nucleic Acids Research*, 19:5444.
Kennedy et al. (1992). *Journal of Animal Science*, 70:2000-2012.
Pépin et al. (1994). *Journal of Heredity* (en prensa).
Penty et al. (1993). *Animal Genetics*, 24:219.
Schwaiger et al. (1993). *Journal of Molecular Evolution*, 37: 260-272.
Tizard I.R. (1987). *Veterinary Immunology*. W.B. Saunders Co., pp. 81-97.