DESCRIPCION DE SECUENCIAS DEL GEN DRB1.2 DEL MHC EN OVINOS CORRIEDALE DEL URUGUAY

Nicolini, M.P; Rincón, G; Castells, D; Kelly, L & Postiglioni, A.

Laboratorio de Análisis Genéticos de Animales Domésticos. Área Genética. Facultad de Veterinaria.

Lasplaces 1550. CP 11600. Montevideo, Uruguay.

Tel. :(598 2) 628 58 02. Email: paulanicolini2@hotmail.com

RESUMEN

El Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) codifica glicoproteínas de membrana que unen y presentan péptidos antigénicos a los linfocitos T. El gen DRB presenta un extenso polimorfismo en el exón 2, que codifica la región de reconocimiento del antígeno (ABS). El objetivo del presente trabajo es estudiar las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas del exón 2 del gen DRB1 del MHC ovino (Ovar-DRB1.2) en una muestra de ovinos Corriedale del Uruguay, en búsqueda de polimorfismos involucrados en los sitios ABS. El exón 2 se amplificó mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa semianidada (heminested-PCR), y el producto amplificado (286pb) fue secuenciado. Se describen dos secuencias (DRB1.2a y DRB1.2b), cuya homología nucleotídica con otras secuencias ovinas del mismo exón varía entre 81% (AY248695) y 91% (Z11520). La secuencia DRB1.2a se diferencia de Z11520 en 12 residuos (16, 18, 26, 28, 47, 66, 67, 70, 71, 74, 86 y 90), mientras que DRB1.2b lo hace en 10 aminoácidos (11,13, 18, 28, 66, 67, 71, 73, 74 y 90). DRB1.2a y DRB1.2b divergen en 10 posiciones (11, 13, 16, 26, 47, 70, 71, 73, 74 y 86). Se describe un nuevo reemplazo en la posición 13 (Arg). Se discute la aplicación de estos resultados en estudios de identificación de alelos marcadores de resistencia o susceptibilidad a parásitos gastrointestinales en ovinos Corriedale del Uruguay.

SUMMARY

Major Histocompatibility Complex (MHC) encodes membrane glycoproteins that function to present peptides to T cells. Its high degree of polymorphism allows vertebrates to respond to an extense variety of antigens. DRB gene is characterized by high polymorphism predominantly at exon 2, which encodes te peptide binding region (PBR). Here we report the study of nucleotide and aminoacids sequences of the exon 2 ovine MHC DRB1 gene (Ovar-DRB1.2) in Uruguayan Corriedale sheep in order to describe polymorphisms at positions involved in antigen binding. Ovar-DRB1.2 was amplified by Heminested Polymerase Chain Reaction (heminested-PCR), and the product (286bp) was sequenced. At the nucleotide level identity between sequences here reported (DRB1.2a y DRB1.2b) and other ovine DRB sequences ranged from 81% (AY248695) to 91% (Z11520). DRB1.2a and Z11520 diverged in 12 residues (16, 18, 26, 28, 47, 66, 67, 70, 71, 74, 86 and 90), while . DRB1.2b and Z11520 differed in 10 aminoacids (11,13, 18, 28, 66, 67, 71, 73, 74 and 90). DRB1.2a y DRB1.2b diverged in 10 posicions (11, 13, 16, 26, 47, 70, 71, 73, 74 and 86). A new replacement is described in position 13 (Arg) for DRB1.2b. The application of this results in the analysis of resistance or susceptibility marker alleles for gastrointestinal parasites in uruguayan Corriedales sheep is discussed.

INTRODUCCION

El Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) consiste en un grupo de genes estrechamente ligados involucrados en el inicio y desarrollo de la respuesta inmune en vertebrados. Los genes de Clase II del MHC (DQ y DR) codifican glicoproteínas de membrana que unen péptidos antigénicos y los presentan a los linfocitos T CD4+ (Abbas et al., 1999). Algunos de estos genes, en particular DQB y DRB, se caracterizan por presentar, un extenso polimorfismo (Imanishi et al., 1991; Schwaiger et al., 1993; Seddon & Ellegren, 2002), principalmente en el exón 2, que codifican los dominios de unión al antígeno α^1 y β^1 . En ovinos, el gen DRB que se expresa se denomina DRB1 y presenta 84 alelos secuenciados para el exón 2 (Schwaiger et al., 1996; Nagaoka et al., 1999). La importancia de los residuos polimórficos en esta región radica en que se generan moléculas con distintas especificidades por los péptidos antigénicos (Wu et al., 1997). La identificación de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de las variantes de los genes de Clase II, así como el análisis de sus distintos patrones aminoacídicos, resulta muy útil para lograr un mayor entendimiento de los mecanismos moleculares involucrados en la resistencia o susceptibilidad.a enfermedades (Zerva et al., 1996, Nagaoka et al. 1999,), así como desde el punto de vista evolutivo, ya que permite caracterizar, diferenciar y reconstruir distancias genéticas entre distintas poblaciones, razas o especies (Kelly et al., 2003; Takeshima et al., 2003). Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo es estudiar las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas del exón 2 del gen DRB1 del MHC ovino (Ovar-DRB1.2) en una muestra de ovinos Corriedale del Uruguay, en búsqueda de polimorfismos que involucren los sitios de unión al antígeno, para en un futuro relacionarlos a la resistencia y susceptibilidad de los ovinos Corriedale del Uruguay a parásitos gastrointesinales.

MATERIALES Y METODOS

Se trabajó con 2 carneros Corriedale uruguayo pertenecientes al Centro de Investigación y Experimentación Dr. A. Gallinal (CIEDAG) del Secretariado Uruguayo de la Lana (SUL),Cerro Colorado-Florida. Estos corderos, nacidos en setiembre-octubre de 2001, están siendo evaluados a través de Pruebas de Progenie para determinar su valor de cría en relación a la resistencia genética a parásitos gastrointestinales, estimada a través del recuento de HPG.

Se extrajo ADN genómico a partir de muestras de sangre de estos animales utilizando un kit de extracción (ATGen). La amplificación del exón 2 del DRB1 se realizó mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa semianidada (PCR-semianidado), desarrollada por van Eijk et al. (1992). La amplificación se realizó en dos etapas, con los cebadores HLA030 (5´-ATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCC-3´) y HLA031 (5´-TTTAAATTCGCGCTCACCTCGCCGCT-3´)(1a etapa) y

HLA30 y HLA32 (5´-TCGCCGCTGCACAGTGAAA CTCTC-3´)(2a etapa), en termociclador (Thermolyne).

El producto de amplificación de la 2° ronda de PCR para cada muestra fue sometido a electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con Bromuro de Etidio. La banda correspondiente al amplificado (286 pb) fue escindida del gel y enviada a secuenciar en ambos sentidos en el secuenciador autmático ABI-PRISM™ 377 GeneticAnalyzer (Applied Biosystems, Foster City, Ca.) del Centro Técnico de Análisis Genéticos de la Facultad de Ciencias (Montevideo, Uruguay).

El análisis general de las secuencias obtenidas (nombradas arbitrariamente DRB1.2a y DRB1.2b) fue realizado usando los Programas SeqMan, EdiSeq y MegAlign del paquete DNASTAR (Madison, Wi.). Las secuencias nucleotídicas fueron comparadas con otras secuencias ovinas del gen DRB de la base de datos Gene Bank-NCBI, utilizando el algoritmo BLAST.

RESULTADOS Y DISCUSION

Se describen dos secuencias nucleotídicas para el Ovar-DRB1.2: DRB1.2a y DRB1.2b, cuyo rango de homología con otras secuencias ovinas para el mismo exón se encuentra entre el 81% (accesion number AY248695) y el 91 % (accesion number Z11520). La Figura 1 muestra la alineación nucleotídica de las 2 secuencias. Se observan 17 Polimorfismos de un Solo Nucleótido (SNPs) en las posiciones: 31, 37, 47, 78, 140, 144, 198, 208, 210, 212, 214, 217, 220, 221, 222, 256 y 257, de los cuales 15 determinan sustituciones no sinónimas de aminoácidos, mientras que 2 (144 y 198) corresponden a sustituciones aminoacídicas sinónimas (Figura 2).

En la Figura 2 se realiza la comparación de los aminoácidos deducidos a partir de las secuencias de ADN. La secuencia DRB1.2a se diferencia de la secuencia Z11520 en 12 residuos (16, 18, 26, 28, 47, 66, 67, 70, 71, 74, 86 y 90), mientras que DRB1.2b lo hace en 10 aminoácidos (11,13, 18, 28, 66, 67, 71, 73, 74 y 90), entre los que se encuentran los sitios involucrados en el reconocimiento del antígeno (11, 13, 28, 67, 70, 71, 74 y 86), Las secuencias DRB1.2a y DRB1.2b divergen en 10 posiciones (11, 13, 16, 26, 47, 70, 71, 73, 74 y 86), En 5 posiciones (18, 28, 66, 67 y 90) ambas secuencias comparten los mismos residuos (F, E, D, F y T) que se diferencian de Z11520 (S, D, E, I y S). Los lugares de variación en los residuos aminoacídicos observados en este trabajo han sido descritos como muy polimórficos en ovinos, identificándose 6 aminoácidos en la posición 11 (Y, S, T, H, A y R), 2 en la 13 (K y S), 3 en la 16 (H, R y S), 2 en la 18 (F y S), 3 en la 26 (L, F e Y), 2 en la 28 (D y E), 2 en la 47 (F e Y), 3 en la 66 (D, E y N) 3 en la 67 (I,F y L), 3 en la 70 (Q, S y R), 4 en la 71 (K, R, T y A), 2 en la 73 (T y A), 3 en la 74 (E, A y N), 4 en la 86 (I, F, G y D) y 2 en la 90 (S y T) (Schwaiger et al., 1993; Nagaoka et al., 1999).. Al comparar las secuencias DRB1.2a y DRB1.2b con otras secuencias ovinas (Schwaiger et al., 1993; Nagaoka et al., 1999), se observa un nuevo reemplazo en la posición 13 (Arg) de la secuencia DRB1.2b, no descrito anteriormente en ovinos, lo que aumenta a 3 el número de sustituciones identificadas para este sitio en esta especie. La presencia de este aminoácido positivamente cargado en esta posición o en las posiciones 70/71 se ha asociado, en humanos, con la susceptibilidad a la lepra tuberculoidea (Zerva et al, 1996). Fu et al (1995) propuso que los sitios 13, 70, 71, 74 y 78, localizados en el «bolsillo «4 del sitio de unión del antígeno, son los que más influyen en una correcta presentación del péptido a las células T y en el desarrollo de una adecuada respuesta inmunitaria. Por lo tanto, el estudio de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas, específicamente del gen DRB1.2 en nuestras majadas Corriedale, tendría implicaciones muy importantes en relación a la identificación de alelos de resistencia o susceptibilidad a enfermedades como las parasitosis gastrointestinales, que constituyen una de las principales limitantes sanitario-económicas de la producción ovina en el Uruguay.

BIBLIOGRAFIA

Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS (1999) The major histocompatibility complex. In: Cellular and molecular immunology. Ed. Interamericana-Mc Graw-Hill. 3a Edición, pp 104-123.

Brown JH, Jardetzjy TS, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Strominger JL, Wiley DC.1993. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR. Nature (Lond),364: 33-39.

Fu XT, Bono CP, Woulfe SL, Swearingen C, Summers NL, Sinigaglia F, Sett A, Schwartz BD, Karr RW. 1995. Pocket 4 of the HLA-DR((,(1*0401)molecule is a major determinantof Tcell recognition of peptide. J.Exp.Med, 118: 915-926.

Imanishi T, Akaza T, Kimura A, Tokunaga K, Gojobori T.1992. Allele and haplotype frequencies for HLA and complement loci in various ethnic groups. In: Tsuji K, Aizawa M, Sasazuki T. (Eds), HLA 1991, vol.1. Oxford Univ. Press, New York, pp.1065-1220.

Kelly L, Nicolini P, D´Angelo M, Nimo A, Rincón G, Piaggio AJ, Postiglioni A. 2003. Polimorfismo del gen DRB3.2 en Bovinos Criollos del Uruguay. Archivos de Zootecnia, 52: 77-80

Nagaoka Y, Kabeya H, Onmuma M, Kasai N, Okada K, Aida Y (1999) Ovine MCH class II DRB1 alleles associated with resistance or susceptibility to development of bovine leukemia virus-induced ovine lymphoma. Cancer Research, 59, 975-981.

Schwaiger F. W, Weyers E, Epplen C, Brun J, Ruff G, Crawford A, Epplen J.T. 1993. The paradox on MHC-DRB exon/intron evolution: (-helix and (- sheet encoding regions diverge while hypervariable intonic simple repeats coevolve with (- sheet codons. J.Mol.Evol, 37: 260-272.

Schwaiger FW, Maddox J, Ballingall K, Buitkamp J, Crawford AM, Dutia BM, Epplen JT, Ferguson ED, Groth D, Hopkins J, Rhind SM, Sargan D, Wetherall J, Wright H. (1996) The ovine major histocompatibility complex. In: Schook LB, Lamont SJ (eds) The major histocompatibility complex region of domestic animal species. CRC Series in Comparative Immunology. CRC Press, Boca Ratón, Florida, pp 121-176.

Seddon J.M, Ellegren H. 2002.MHC clas II genes in European wolves: a comparison with dogs. Immunogenetics, 54, 490-500.

TakeshimaS, Saitou N, Morita M, Inoko, Aida Y. 2003. The diverity of bovine MHC class II DRB3 genes in Japanese Black, lapanese Shorhorn, Jersey and Holstein cattle in Japan. Gene, 316: 111-118.

van Eijk MJ, Stewart-Haynes JA, Lewin HA (1992) Extensive polymorphism of BoLA-DRB3 gene distinguished by PCR-RFLP. Animal Genetics, 23: 483-496.

Wu S, Gorski J. 1997. Polymorphism at beta 85 and not beta 86 of HLA-DR1 is predominantly responsible for

f the anchor side chain: implication
f class II MHC polymorphism. Int.
2.
J, Park C, Lewin H A. 1993.
A.DRB3 exon 2 correlates with
t lymphocytosis caused by bovine
leukemia virus. J. Immunol., 151: 6977-6985
Zerva L, Cizman B, Mehra NK, Alahari S K, Murali R, Zmijewski C M, Kamoun M, Monos D S.1996. Arginine positions at positions 13 or 70-71 in pocket 4os HLA-DRB1 alleles is associated with susceptibility to tuberculoid leprosy. J.Exp. Med., 183: 829-836.

```
                   10        20        30        40        50        60        70        80        90
DRB1.2a   CCT CTC TCT GCA GCA CAT TTC CTG GAG TAT ACT AAG AAA GAG TGT CAT TTC TTC AAC GGG ACG GAG CGG GTG CGG TTG CTG GAA AGA TAC TTC TAT AAT

DRB1.2b   CCT CTC TCT GCA GCA CAT TTC CTG GAG TAT GCT AAG AGA GAG TGT CGT TTC TTC AAC GGG ACG GAG CGG GTG CGG TTC CTG GAA AGA TAC TTC TAT AAT

          100       110       120       130       140       150       160       170       180       190
DRB1.2a   GGA GAA GAG TAC GTG CGC TTC GAC AGC GAC TGG GGC GAG TTC CGG GCG GTG GCC GAG CTG GGG CGG CCG GAC GCC AAG TAC TGG AAC AGC CAG

DRB1.2b   GGA GAA GAG TAC GTG CGC TTC GAC AGC GAC TGG GGC GAG TAC CGA GCG GTG GCC GAG CTG GGG CGG CCG GAC GCC AAG TAC TGG AAC AGC CAG

                   200       210       220       230       240       250       260       270
DRB1.2a   AAG GAT TTC CTG GAG AGC AGG AGG ACC GCG GTG GAC ACG TAC TGC AGA CAC AAC TAC GGG GTC GGT GAG AGT TTC ACT GTG CA

DRB1.2b   AAG GAC TTC CTG GAG CGG AAG CGG GCC AAT GTG GAC ACG TAC TGC AGA CAC AAC TAC GGG GTC ATT GAG AGT TTC ACT GTG CA
```

Figura 1.- Alineación nucleotídica de las secuencias reportadas en este trabajo. Negrita: SNPs que determinan una sustitución aminoacídica no sinónima. Subrayado: SNPs que determinan una sustitución aminoacídica sinónima.

```
                  *  * *          *  *     * *                 *   *       *  * *  *  *     *     *
                  10        20        30        40        50        60        70        80        90
HLA Consenso      EQ SKSECH FFNG TERVRFLDRY FYNQEEYVRF DSDVGEYRAV TELGRPDAEY WNSQK DLLEQ RRAAVDTYCR HNYGVGESFT V

Z11520            -Y T-K--R-S-- ---------- ---G------ ---W------ A-------KY ----KEI--R --TE------ ------I---S V

DRB1.2 a          -Y T-K------ -----L-E-- ---G------ ---W--F--- A-------KY ----K-F--S --T-------- ---------- V

DRB1.2 b          -Y A-R--R---- -----F-E-- ---G------ ---W------ A-------KY ----K-F--R K--N------- ------I---- V
```