

CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE GENES DEL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD CAPRINO DE CLASE I

Zidi, A., Sànchez, A., Amills, M.

Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra 08193. E-mail: Ali.Zidi@uab.es

INTRODUCCIÓN

Las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I se encargan de presentar péptidos derivados tanto de proteínas endógenas como de patógenos intracelulares en la superficie de la membrana celular (Harty *et al.* 2000). Ello resulta fundamental en el proceso de reconocimiento antigénico y activación de los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos. El polimorfismo de los genes MHC de clase I se ha asociado al desarrollo de una mayor resistencia/susceptibilidad a diversas enfermedades infecciosas y parasitarias como por ejemplo la mastitis, la tricostrongilosis, la artritis-encefalitis caprina y la leucosis bovina (revisado en Amills *et al.* 1998).

La organización genómica del MHC de clase I en rumiantes es muy compleja. En ovino, se ha descrito la existencia de al menos cuatro genes de clase I mientras que en bovino dicho número podría elevarse a seis (Ellis *et al.* 2004, Miltiadou *et al.* 2005). Dichos genes presentan una elevada variabilidad genética, con 12 y 64 secuencias MHC de clase I ovinas y bovinas almacenadas en la Immuno Polymorphism Database (<http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/ipd>), respectivamente. En caprino aun no se ha procedido a caracterizar estructuralmente los genes MHC de clase I, habiéndose descrito únicamente la existencia de distintas variantes mediante la técnica de isoelectroenfoque (Joosten *et al.* 1993).

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizaron extracciones de RNA a partir de muestras de hígado utilizando el reactivo Trizol (Gibco BRL). La síntesis de cDNA se llevó a cabo mediante el kit ThermoScript (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante y empleando como molde 1-2 µg de RNA. Se utilizaron los oligonucleótidos mhcl-5', 5'- ATG GGG CCG CGA ACC CTC CT-3' y mhcl-3' 5'-GAT GGA GAC GGC CCA GCC C-3' para amplificar aproximadamente 1,3 kb del cDNA MHC de clase I caprino. El perfil térmico fue de 94 °C-90 seg, 57 °C-2 min y 72 °C-4 min durante 31 ciclos. La composición de la reacción de PCR fue 1.5 mM MgCl₂ 100 µM dNTP, 0.5 µM de cada primer, y 1.25 U de Taq DNA polimerasa (Ecogen) en un volumen final de 50 µl. Asimismo, se amplificó un fragmento de aproximadamente 0.69 kb con los oligonucleótidos mhcl-5' y mhcl-3I, 5'-GGC CCA GCA CCT CAG GGT GAG-3'. Las condiciones de la reacción de PCR fueron iguales a las descritas anteriormente, aunque el número de ciclos fue de 36. Los productos amplificados de 1,3 y 0.69 kb fueron purificados mediante el QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen). A continuación fueron clonados en el plásmido pCR 2.1-TOPO vector (Invitrogen) y secuenciados de acuerdo con los protocolos descritos por Amills *et al.* (2005). Las secuencias obtenidas fueron alineadas mediante el programa Multalin (Corpet, 1988).

El análisis filogenético de las secuencias se realizó mediante el programa MrBayes 3.1. Se consideró un modelo con seis tasas de sustitución distintas y se emplearon los *flat priors* definidos por defecto en el programa para describir las frecuencias nucleotídicas, la proporción de lugares invariantes y el parámetro α . El árbol filogenético consenso se visualizó con el programa TreeView.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente trabajo, se ha caracterizado la secuencia codificante total de un gen MHC de clase I caprino (Cahi-MHCI). Dicha secuencia posee una identidad nucleotídica del 94%, y 92% con los genes ortólogos bovino (DQ121165.1) y ovino (AJ874673.2). Asimismo, se han caracterizado parcialmente otras dos secuencias MHC de clase I (clones 60251 y 71274). El análisis filogenético bayesiano de un fragmento de 572 pb correspondiente a dichas secuencias y a las caracterizadas en ovino se muestra en la Figura 1. Puede observarse, que la secuencia Cahi-MHCI agrupa con las secuencias ovinas F12 y D5 con una elevada probabilidad posterior (1,00). De forma similar, la secuencia caprina 60252 agrupa con la secuencia ovina D3 con una probabilidad posterior de 1,00. En un análisis previo, Miltiadou *et al.* (2005) demostraron que las secuencias ovinas D3, D5, F8 y F12 agrupan conjuntamente en un único clúster (valor de bootstrap 82, cluster I) y con toda probabilidad corresponden a un único locus de clase I que se transcribe a niveles elevados. De manera similar, podemos concluir que las secuencias Cahi-MHCI y 602521 probablemente correspondan a un mismo locus. El alineamiento de estas dos secuencias ha permitido detectar la existencia de 32 posiciones polimórficas. Finalmente, cabe destacar que la secuencia caprina MHC de clase I correspondiente al clon 71274 no agrupa con ninguna de las demás secuencias ovinas o caprinas, por lo cual cabe concluir que corresponde a un locus distinto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amills M, Ramiya V, Norimine J, Lewin HA. 1998. The major histocompatibility complex of ruminants. *Rev. Sci. Tech.* 17: 108-20.
- Amills M, Sulas C., Sánchez A., Bertoni G., Zanoni R., Obexer-Ruff G. 2005. Nucleotide sequence and polymorphism of the major histocompatibility complex class II *DQA1* (*Cahi-DQA1*) gene. *Mol. Immunol.* 42: 375-379.
- Ellis S. 2004. The cattle major histocompatibility complex: is it unique? *Vet. Immunol. Immunopathol.* 102: 1-8.
- Harty JT, Tvinnereim AR, White DW. 2000. CD8⁺ T cell effector mechanisms in resistance to infection. *Annu. Rev. Immunol.* 18: 275-308.
- Joosten I, Ruff G, Sanders MF, Hensen EJ. 1993. Use of isoelectric focusing to define major histocompatibility complex class I polymorphism in goats. *Anim. Genet.* 24: 47-51.
- Miltiadou D, Ballingall KT, Ellis SA, Russell GC, McKeever DJ. 2005. Haplotype characterization of transcribed ovine major histocompatibility complex (MHC) class I genes. *Immunogenetics* 57: 499-509.

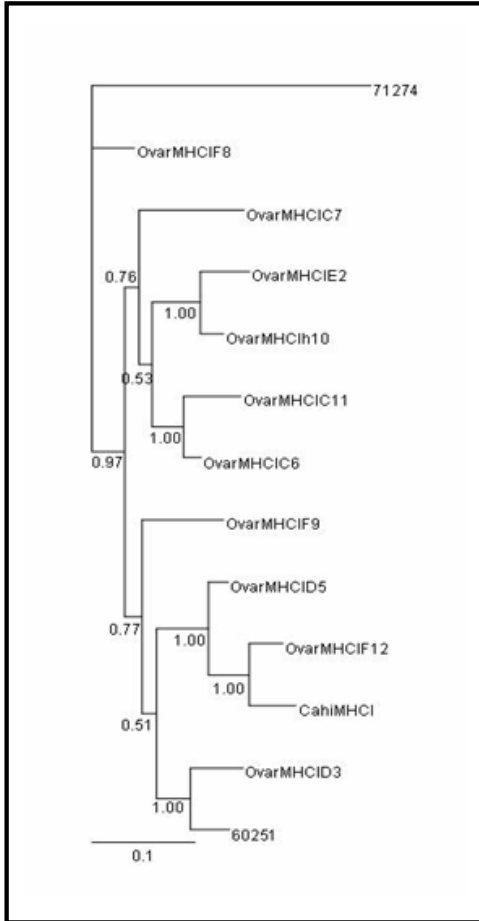


Figura 1. Arbol filogenético bayesiano de las secuencias MHC de clase I ovinas y caprinas