

## Polimorfismo en genes de la inmunidad innata. Análisis funcional.

Miguel A. Domínguez, Vincenzo Landi, Luis Morera, Juan J. Garrido

*Grupo de Genómica y Mejora Animal, Departamento de Genética, Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba*

### RESUMEN

**Introducción:** Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) son el tipo de variación más común entre individuos y su vinculación con enfermedades complejas que afectan a los animales de interés económico es actualmente motivo de intensas investigaciones. En fecha reciente, el estudio de los SNPs que afectan la expresión de genes relacionados con la respuesta inmune ha suscitado un gran interés, ya que las diferencias genéticas entre individuos pueden modificar el fenotipo originando alteraciones que desembocarían en cambios en los patrones de resistencia o susceptibilidad a las enfermedades infecciosas. **Objetivo:** Identificar y evaluar funcionalmente polimorfismos SNPs en las secuencias promotoras de los genes TLR2, TLR5 y NOD2 porcinos, que codifican para receptores de patógenos y que por tanto desempeñan una función relevante en la respuesta inmune. **Métodos:** La identificación de SNPs en las regiones promotoras de los genes TLR2, TLR5 y NOD2 porcinos se llevó a cabo mediante PCR-SSCP. El análisis funcional de los polimorfismos fue llevada a cabo mediante la expresión de la actividad luciferasa en células CHO transfectadas con las distintas variantes polimórficas de las secuencias promotoras. **Resultados:** El trabajo realizado permitió la identificación de 16 SNPs en las regiones promotoras de los genes TLR2, TLR5 y NOD2 porcinos (2, 5 y 9, respectivamente). Cuatro SNPs fueron seleccionados para su análisis funcional: TLR2-SNP1 -318T>A, TLR5-SNP3 -193G>A y TLR5-SNP4 -187A>G tomando como referencia su ubicación en sitios de unión a factores de transcripción implicados en la inmunidad. El análisis funcional reveló la existencia de diferencias entre las variantes alélicas analizadas en cada promotor, observándose que el alelo TLR2-SNP1 -318T>A mostró una actividad luciferasa del doble de la obtenida con la variante alélica T. En el caso del promotor del gen TLR5 se evaluaron dos polimorfismos mapeando en el sitio de unión al factor de transcripción FKHD, involucrado en los mecanismos de inmunidad. De nuevo fue observado que la presencia en el promotor de los alelos con menor frecuencia TLR5-SNP3 -193A y TLR5-SNP4 -187G generaba un mayor nivel de expresión del gen reportero ( $p \leq 0.05$ ). Sin embargo, en el caso del SNP4 -741T>C, localizado en el promotor del gen NOD2 porcino, no se observaron diferencias significativas en la actividad transcripcional determinada por las dos variantes alélicas. **Conclusión:** Nuestros resultados demuestran que variaciones de un solo nucleótido en las secuencias promotoras de los genes analizados modifican el nivel de expresión del gen reportero luciferasa, sugiriendo que efectivamente, el polimorfismo caracterizado puede afectar de manera directa la regulación de la expresión del gen.

### INTRODUCCIÓN

Los procesos patológicos ocasionados por agentes infecciosos representan uno de los principales problemas que afectan a los sistemas de producción animal. Tradicionalmente, los planes de control y lucha contra las enfermedades en los animales de abasto se han llevado a cabo mediante intervenciones vinculadas a las características del agente patógeno, el hospedador y el medio ambiente en el que se generaron. En la actualidad los planes de prevención se enfrentan a los nuevos retos que representan enfermedades de difícil erradicación y de posible transmisión al ser humano (zoonosis). La etiología de estos procesos es compleja, pues la manifestación clínica del agente patógeno está asociada a la presencia de múltiples factores de susceptibilidad. Pese a las medidas tradicionales de control sanitario, las pérdidas achacables a estas enfermedades infecciosas siguen constituyendo un pesado lastre para la industria agropecuaria.

Una solución alternativa podría hallarse en la resistencia genética a la enfermedad ligada a mecanismos inmunológicos, esto es, la capacidad inherente de un animal de resistir a la presencia de patógenos en su organismo sin haber tenido contacto previo con ellos. Aunque los modos de alimentación y cría influyen sobre la variabilidad en la expresión de la enfermedad, ha podido observarse que la resistencia natural es hereditaria y se transmite de un progenitor a su descendencia. Profundizar en el conocimiento de la base genética de la respuesta inmune, tanto innata o natural, como específica o adquirida, permitirá la identificación de genes asociados a fenotipos, genes marcadores que pudieran

ser utilizados en programas de selección que permitan aumentar el nivel general de resistencia a las enfermedades en las poblaciones animales (Mallard y Wilkie, 2007).

Los mecanismos de defensa establecidos por el hospedador frente a la infección están regulados genéticamente e interconectados entre sí. De este modo, el sistema inmune innato reconoce patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) a través de un conjunto de receptores (PRRs) anclados a las membranas de las células epiteliales y fagocíticas, denominados receptores Toll-like (TLRs) y NOD-like (NLRs) (Janeway y Mezhitov, 2002). La defensa del hospedador mediada por los PRRs se basa principalmente en la activación en el interior celular de vías de señalización que conducen a la regulación de la transcripción de un conjunto de genes que codifican citoquinas inflamatorias y quimioquinas, cuya función es promover la respuesta inflamatoria contra la infección, la activación de células T y la inmunidad adaptativa (Dempsey et al., 2003). Estudios recientes en diversas especies sugieren que la existencia de variaciones genéticas en las secuencias promotoras de los genes que codifican para PRRs, pueden ser la causa de alteraciones en el nivel transcripcional de dichos genes, y por tanto pueden desencadenar como consecuencia alteraciones en el nivel de eficacia de la respuesta final a la infección (Uenishi, 2009).

La caracterización del polimorfismo en secuencias reguladoras de la transcripción de genes candidatos para la mejora de la respuesta inmune, tal como se plantea en este trabajo, tiene como fin último el establecimiento de planes de selección que resulten en un aumento de la resistencia genética a las enfermedades en la especie porcina. Este polimorfismo, originado en cambios de secuencia de un único nucleótido (SNP) constituye la base de la variabilidad del genotipo y permitirá la identificación de alelos funcionales susceptibles a la infección que podrían ser eliminados de las poblaciones naturales mediante selección (Houston et al., 2003; Zhou and Lamont, 2003).

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Identificación de SNPs y genotipado

La identificación de SNPs en las regiones promotoras de los genes TLR2, TLR5 y NOD2 porcinos se llevó a cabo mediante PCR-SSCP (Hayashi, 1992), y el polimorfismo confirmado mediante secuenciación. Para el genotipado del polimorfismo identificado se emplearon muestras de ADN genómico procedente de 100 animales (Jabalí, Landrace/LargeWhite, Ibérico y Pelón Mexicano), y la técnica de minisequenciación Snapshot. El análisis de los resultados de secuenciación se llevó a cabo mediante el software GeneScan® y la tipificación alélica con el software Genotyper 3.7. Para el análisis estadístico de los resultados se emplearon los paquetes MStools para Excel, Arlequin v3.0 y Popgene32.

### Análisis del polimorfismo SNP mediante ensayos de luciferasa

Una vez identificado el polimorfismo SNP, se procedió a validar su función reguladora. En primer lugar, fueron analizadas las secuencias promotoras mediante el software MatInspector de la plataforma informática Genomatix (Referencia). El objetivo fue identificar las secuencias cis-reguladoras afectadas por la presencia de variación nucleotídica y seleccionar aquellas de mayor relevancia en la respuesta inmune porcina para su posterior análisis. A continuación, se llevaron a cabo construcciones recombinantes en el vector de expresión pGL4.17 (Promega) que contiene el gen reportero de la luciferasa de luciérnaga (*luc2*) bajo el control transcripcional de las distintas variantes genéticas de las secuencias promotoras. Para ello, los promotores mutados fueron obtenidos mediante mutagénesis dirigida empleando el sistema QuickChange Site-Directed Mutagenesis (Stratagene). A continuación, cada una de las construcciones fue introducida mediante transfección en células CHO cultivadas en medio RPMI 1640 suplementado con 5% de L-glutamina y 10% de Suero Fetal Bovino. Con este fin, se realizó una transfección transitoria mediante el sistema Lipofectamine 2000 (Invitrogen), empleando al mismo tiempo un vector de control interno (pGL4.74) para normalizar la expresión del gen reportero y controlar la eficiencia de la transfección. La estimación de la expresión *luc2* se llevó a cabo mediante el sistema Dual-Glo (Stop & Glow; Promega), consistente en un procedimiento de lisis del cultivo transfectado y la medición de la luminiscencia emitida mediante el empleo de un lector Synergy™ HT Multi-Detection Microplate Reader (BIO-TEK). Dicha emisión constituyó una medida del nivel de expresión del gen reportero en cada una de las variantes alélicas del promotor.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Caracterización de polimorfismos

El trabajo realizado permitió la identificación de 16 SNPs en las regiones promotoras de los genes TLR2, TLR5 y NOD2 porcinos (2, 5 y 9, respectivamente). Por su localización en el promotor, para el análisis funcional fueron seleccionados 4 SNPs que mapearon en secuencias potenciales de unión a factores transcripcionales con una función relevante en la regulación de la expresión de genes del sistema inmune (ver Tabla 1).

LOCUS	LOCALIZACIÓN	ALELOS	ALELO MENOR	FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN
<b>TLR2-SNP1</b>	N -318	T>A	A	PAX6 y PAX8
<b>TLR5-SNP3</b>	N -193	G>A	A	FKHD
<b>TLR5-SNP4</b>	N -187	A>G	G	FKHD
<b>NOD2-SNP4</b>	N -741	T>C	C	IRFF, NFAT, ETSF, FKHD y XBBF

Tabla 1. SNPs seleccionados para su estudio funcional.

Debido a su potencial empleo como marcadores genéticos, se llevó a cabo un estudio de distribución del polimorfismo, empleando muestras de ADN de 100 animales, incluyendo 40 muestras procedentes de jabalíes de distinto origen geográfico. Los alelos observados con menor frecuencia en las poblaciones estudiadas, considerados por tanto en este trabajo como alelos mutantes se observan en la Tabla 1. Es necesario destacar que la variante alélica menor correspondiente al SNP1 en el promotor del gen TLR2, fue, sin embargo, la de mayor frecuencia en la población de 20 animales de la raza Pelón Mexicano considerados en este estudio, con una frecuencia del 63.16%.

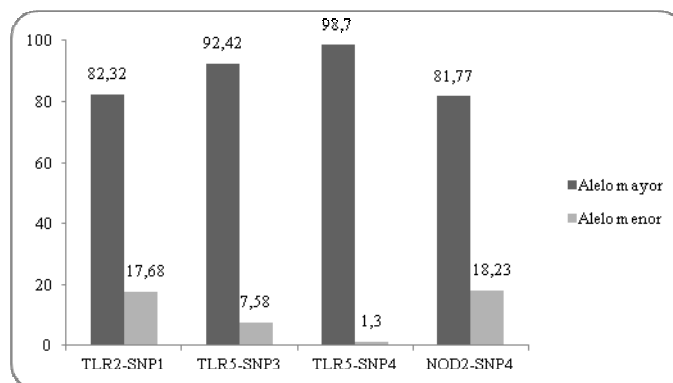


Figura 1. Frecuencias alélicas de los polimorfismos analizados funcionalmente (n=100).

### Análisis funcional de los polimorfismos

Los resultados del análisis funcional mostraron que la construcción conteniendo la variante polimórfica N-318A identificada en la región promotora del gen TLR2 incrementa significativamente la actividad luciferasa relativa ( $35.59 \pm 1.54$ ) con respecto a la construcción que contiene la variante N-318T ( $15.62 \pm 2.76$ ), sugiriendo que el alelo mutante de TLR2-SNP1 determina una regulación positiva sobre la actividad transcripcional del gen TLR2. En el caso de las construcciones con las secuencias promotoras del gen TLR5 el resultado fue similar, observándose una diferencia estadísticamente significativa entre los valores de actividad luciferasa obtenidos con la construcción N-193A/N-187G ( $7.83 \pm 1.52$ ) y los correspondientes a la construcción N-193G/N-187A ( $2.49 \pm 1.09$ ). Finalmente, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de actividad transcripcional observados para las dos variantes alélicas del promotor del gen NOD2 estudiadas ( $p \leq 0.05$ ), a pesar de observarse un ligero incremento en la actividad luciferasa relativa de la variante N-741C ( $3.87 \pm 1.86$ ) con respecto a la variante N-741T ( $2.46 \pm 0.89$ ). Nuestros resultados demuestran que variaciones de un solo nucleótido en las secuencias promotoras de los genes analizados modifican el nivel de expresión del reportero luc2, sugiriendo que efectivamente, el polimorfismo caracterizado puede afectar de manera directa la

regulación de la expresión del gen. Los PRRs desempeñan un papel crucial en la respuesta a patógenos y el estudio del polimorfismo en los genes que los codifican ha sido relacionado con una mayor o menor eficacia en el nivel de la respuesta inmune (Uenishi y Shinkai, 2009; Tsz Hin Ng et al., 2010). A pesar de que el valor de nuestros resultados debe ser considerado en el contexto de los necesarios estudios de asociación, representan por sí mismos un paso importante en la identificación de determinantes genéticos implicados en los procesos de resistencia/susceptibilidad a las enfermedades de origen infeccioso que afectan a la cabaña porcina.

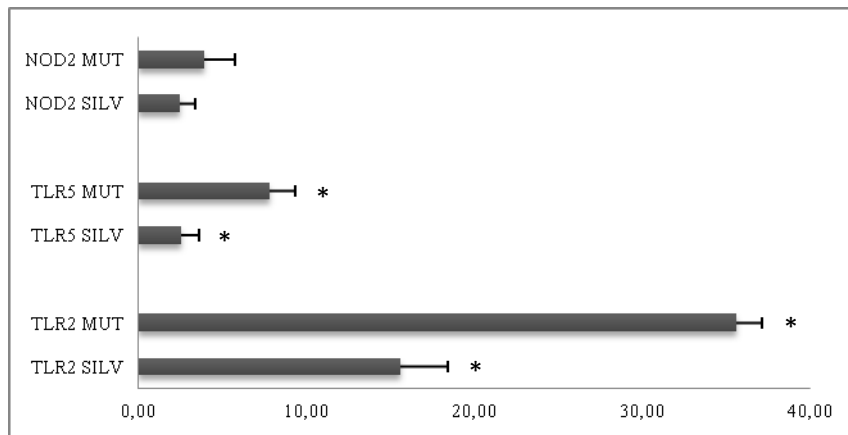


Figura 2. Actividad luciferasa relativa. La identificación corresponde a cada SNP seleccionado por gen, donde MUT = Alelo de menor frecuencia y SILV = alelo de mayor frecuencia. \* Indica diferencias estadísticas significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre las construcciones.

#### BIBLIOGRAFÍA

- Uenishi H, Shinkai H. 2009. *Developmental and Comparative Immunology* 33: 353–361.
- Kersse K, Bertrand MJM, Lamkanfi M, Vandenaabeele P. 2011. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 22: 257–276.
- Hayashi K. 1992. *GATA*, 9, 73-79.
- Mike Tsz Hin Ng, Van't Hof R, Julie C. Crockett, Hope ME, Berry S, Thomson J, McLean MH, McColl KEL, El-Omar EM, Hold GL. 2010. *Infect Immun* 78: 1345–1352.
- Botstein D, White RD, Skolnick M and Davis RW. *Am J Hum Genet.* 32: 314-331
- Janeway CA., Medzhitov R. 2002. *Annu. Rev. Immunol.* 20 (1): 197.
- Mallard BA., Wilkie BM. 2007. *Advances in Pork Production* 18: 139.
- Dempsey PW., Doyle SE., He JQ. Cheng G. 2003. *Cytokine Growth Factor Rev.* 14: 193.
- Houston F., Goldmann W., Chong A., Jeffrey M., Gonzalez L., Foster J., Parnham D., Hunter N. 2003. *Nature*, 423: 498.
- Zhou H., Lamont SJ. 2003. *Poultry Sci* 82(7): 133-140