DISCRIMINACIÓN DE HETEROCIGOTOS EN EL GEN PRP OVINO

Parra, D.; Cañón J.; Dunner, S.
Laboratorio de Genética. Facultad de Veterinaria. 28040 Madrid.

INTRODUCCIÓN

La tembladera ovina o *scrapie* es una enfermedad descrita en 1732 que afecta a la especie ovina en la mayoría de los países, con la excepción de Nueva Zelanda y Australia. Esta enfermedad se caracteriza, al igual que las demás Encefalopatías Espongiformes Transmisibles, por la acumulación de una proteína (PrP o prión) que adquiere una conformación anormal (PrPsc) en diferentes órganos del animal afectado (Prusiner et al., 1990).

Existe un determinismo genético para la resistencia o la susceptibilidad a la enfermedad en la especie ovina asociado a la combinación de determinados aminoácidos en las posiciones 136, 154 y 171 de la proteína PrP. En estas posiciones, los individuos VRQ y en menor medida los ARH están asociados a una susceptibilidad a la tembladera mientras que los alelos ARR y en menor medida los AHQ muestran una resistencia clara a padecer la enfermedad (Westaway et al., 1994).

En varios países europeos se está llevando a cabo un genotipado sistemático de los tres codones mediante diferentes técnicas: PCR-RFLP (Hunter et al., 1994; Yuzbasuyan-Gurkan et al., 1999), PCR alelo-específica (Okayama et al., 1989) o Primer Extension (Syvänen, 1999). La determinación de la presencia de Histidina (H) y Glutamina (Q) en el tercer triplete requiere la detección de cambios en la segunda y tercera posición del codón 171 lo cual, a su vez, implica el análisis de cuatro posiciones diferentes para identificar el genotipo adecuadamente.

Como la mayoría de los países afectados, con la excepción de Islandia, han propuesto reducir la incidencia de la tembladera modificando la frecuencia de los alelos asociados a la resistencia/susceptibilidad, sería importante que no existiera confusión entre alelos. En algunos países no se realiza la diferenciación entre ARQ y ARH, lo que dada la ausencia de un completo conocimiento de las asociaciones estadísticas entre alelos y resistencia/susceptibilidad podría ser fuente de sesgos de magnitud desconocida.

Una de las técnicas más utilizadas para el análisis del gen PrP es la mini-secuenciación (o 'primer extension') de las variantes nucleotídicas en los tres codones, basándose en la elongación, por medio de la polimerasa, de un oligonucleótido complementario a la región 5' inmediatamente adyacente a la posición nucleotídica de interés. Cada extensión implica la unión de un único ddNTP (dideoxi-nucleósido-trifosfato) marcado con un fluoróforo que es complementario al nucleótido en la posición variable o SNP, deteniéndose la reacción de polimerización iniciada (Syvänen, 1999, Makridakis et al., 2001). El codón 171 se analiza con sendos cebadores diseñados en la región inmediatamente adyacente al codon, discriminando en la posición segunda (mediante el abordaje desde la cadena 5'→ 3') las variantes nucleotídicas *G* (dando lugar a un codon que genera una Arginina) o *A* (una Histidina o una Glutamina) y cualquiera de los cuatro nucleótidos en la posición tercera del codón desde la cadena complementaria. Sin embargo, aparecen casos de individuos 'doble heterocigoto' para estas dos posiciones (es decir *AG/AGCT*) por lo que el método descrito no permite determinar su fase y por lo tanto su genotipo, que podría ser tanto R/Q como R/H.

Proponemos una técnica que discriminaría de manera segura todos los genotipos para el gen PrP en los tres codones considerados, evitando posibles sesgos en los análisis de asociación entre genotipos y resistencia/susceptibilidad al scrapie.

MATERIAL Y MÉTODOS

El ADN se extrajo de semen de moruecos siguiendo un protocolo de lisis alcalina consistente en cuatro lavados con H_2O destilada, una incubación de 15' con NaOH 0,25M, la adición de HCl 0,25 M y añadiendo posteriormente el mismo volumen de Tris-HCl 0,1M pH=8.
La amplificación de 639 pb de ADN genómico se realizó en un volumen de 25 µL con la siguiente composición: 5 µl de la lisis alcalina, 0,5 unidades de Taq polimerasa (Biotools), 10 pmol de cada cebador: SCRAPOV-for: (GTGAAAAGCCACATAGGCA GTTGG) y SCRAPOV-rev: (GCTCCACCACTCGCTCCATTATCTTG), 1,5 mM de MgCl2, Buffer 1x y 200 µM de dNTPs. Después de purificar el producto amplificado por precipitación con etanol (con el objetivo de eliminar los restos de oligonucleótidos y dNTPs no incorporados) se llevó a cabo la minisecuenciación para la que se emplearon oligonucleótidos específicos diseñados a partir de la secuencia de PrP ovina AJ223072 (Goldmann et al., 1990), con distintas longitudes para evitar el solapamiento entre productos finales (Tabla I). Esta reacción en múltiplex se llevó a cabo en un volumen final de 10 µL, con la siguiente composición: 5 µL de kit SNaPshot™ (Applied Biosystem), 1 µL de PCR purificada (0.4 pmol total) y 1 µL de cada primer a 5 µM. Previo a su carga en el secuenciador automático ABI PRISM 3100 se purificó mediante precipitación con etanol. El análisis de los fragmentos se llevó a cabo mediante el software Genescan 3.7.1®. El tamaño relativo de los fragmentos se determinó por comparación con el standard interno de tamaño GeneScan 120-LIZ (Applied Biosystems).

Tabla I. Oligonucleótidos diseñados para el análisis del gen PrP ovino.

Cebador	Secuencia[1]	Resultado[2]
Prp136	GTGGCTACATGCTGGGAAGTG	negro (*C*:**A**) / rojo (*T*:**V**)
Prp154	TATACATTTTGGCAATGACTATGAGGACCGTTACTATC	azul (*G*:**R**)/ verde (*A*:**H**)
Prp171.2	TATATCCAAGTGTACTACAGACCAGTGGATC	azul (*G*:**R**)/ verde (*A*:**H** o **Q**)
Prp171.3	GCTACAGACCAGTGGATCA	azul (*G*:**H**) / rojo (*T*:**Q**)

[1] Todas las secuencias tienen una orientación 5'-3'
[2] El resultado indica en primer término el color de la señal, y entre paréntesis, el nucleótido detectado (en cursiva) y correspondencia amino-acídica (en negrita).

RESULTADOS

La primera amplificación produce un fragmento de 639 pb, que comprende los cuatro sitios polimórficos. La tabla I incluye los cuatro cebadores utilizados en la segunda reacción que permiten determinar el nucleótido incorporado y por tanto el amino-ácido resultante. En el caso del codón 171, ambos cebadores (que interrogan el segundo y tercer nucleótido de ese codón respectivamente) tienen la misma orientación pero el cebador prp171.3 aparte de interrogar el tercer nucleótido final, al ser alelo-específico solamente mostrará el nucleótido siguiente en la secuencia que

presente una adenina en la segunda posición de tal manera que la fase de un heterocigoto podrá interpretarse fácilmente como se puede observar en la Figura 1.

El procedimiento empleado en este trabajo que incluye la extracción de ADN por lisis alcalina y las purificaciones sencillas con etanol (y que difiere de la digestión con exonucleasa y fosfatasa alcalina generalmente utilizada en estos protocolos) permite automatizar y por tanto simplificar y abaratar el escrutinio de posiciones variables o SNPs mediante mini-secuenciación del gen PrP ovino. La interpretación de los nucleótidos en la segunda y tercera posición del codón 171, aunando interrogación y especificidad alélica, permite determinar sin ninguna duda cuál es el genotipo exacto para el gen PrP del individuo analizado.

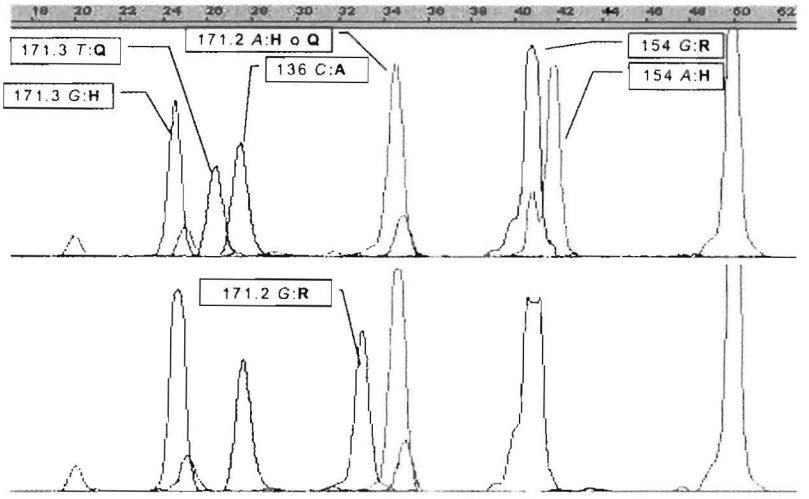


Figura 1. Electroferograma que muestra dos individuos heterocigotos AHQ/ARH (arriba) y ARR/ARH (abajo) donde se pueden observar los picos diagnósticos en las posiciones 136, 154 y 171. En el individuo AHQ/ARH, aparecen tres picos para este último codón, presentando en la posición 171.2 el correspondiente al nucleótido A, lo que unido a que en la posición 171.3 aparecen dos picos correspondientes a los nucleótidos G y T, permite deducir que es heterocigoto Q/H. El individuo ARR/ARH es heterocigoto para la posición 171.2, y debido a la especificidad alélica reseñada, el pico 171.3 es el que acompaña a la 171.2 A, determinando la presencia del alelo H.

AGRADECIMIENTOS

Laboratorio Central del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

REFERENCIAS

Goldmann, *et al.* (1990). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**: 2476-2480
Hunter *et al.* (1994). *Archives of Virology* **137**:171-177
Makridakis y Reichardt (2001). *Biotechniques* **31**:1374-1380
Okayama *et al.*, 1989. *Journal of Laboratory Clinical Medicine* **114**: 105-113
Prusiner *et al.*, 1990. *Cell* **63**: 673-686
Syvänen A.C. (1999). *Human Mutation* **13**:1-10
Westaway *et al.*, (1996). *Lancet* **347**: 1114
Yuzbasuyan-Gurkan et al., (1999). *American Journal of Veterinary Research* **60**: 884-887