DETERMINACIÓN DEL GENOTIPO DEL LOCUS *PRNP* EN EL GANADO OVINO MEDIANTE "*PRIMER EXTENSION*"*

L. Álvarez, J.J. Arranz y F. San Primitivo.
Dpto. Producción Animal I, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, Campus de Vegazana s/n, 24071 León

INTRODUCCIÓN

Las encefalopatías espongiformes transmisibles (EET) son un grupo de enfermedades degenerativas que afectan al sistema nervioso central y que han creado una importante alarma social, al existir evidencias epidemiológicas de su transmisión desde la especia bovina al hombre, mediante la ingestión de material infectado (variante de la enfermedad de Creutzeldt-Jakob). En las especies ovina y caprina estos procesos están representados, fundamentalmente, por el *scrapie* o tembladera que hasta hace unos pocos años no había recibido especial atención.

Las EET están asociadas con el cambio post-traduccional de una proteína del hospedador (PrP) a una conformación alterada o prión (PrP^{sc}), actuando esta última como mediador en dicha transformación y siendo considerada el agente infectivo (Prusiner, 1998). En diversas especies, como el hombre, el ratón y la oveja, se ha detectado una diferente susceptibilidad de determinados hospedadores a padecer las EET. Esta susceptibilidad genética, está principalmente determinada por polimorfismos en el gen *PRNP* que codifica para la proteína PrP. En el caso del ganado ovino se ha detectado una asociación entre el polimorfismo de 3 codones 136, 154 y 171 y un diferente riesgo al padecimiento de la tembladera. Así, los animales que presentan los aminoácidos Alanina, Arginina y Arginina (ARR) para los tres codones indicados, respectivamente, se consideran animales resistentes al padecimiento de la enfermedad (Hunter, 1997).

En función de estos conocimientos, recientemente la Unión Europea ha fijado una serie de normas referentes al genotipado de las razas puras para el gen PRNP (decisión 2002/1003/CE) y la implantación de una serie de programas de cría de ovinos y caprinos resistentes a las EET (decisión 2003/100/CE). Estas normas condicionan de una forma clara los programas de selección establecidos en el ganado ovino, ya que priorizan la resistencia a la tembladera como criterio fundamental en la elección de reproductores. Como resultado de las mencionadas decisiones, y teniendo en cuenta que nuestro grupo de investigación dirige técnicamente el programa de selección de las razas Churra y Castellana, nos hemos propuesto, como objetivo de este trabajo, la puesta a punto de un método rápido y fiable para la determinación del genotipo en los codones 136, 154 y 171, en el ganado ovino.

MATERIAL Y MÉTODOS

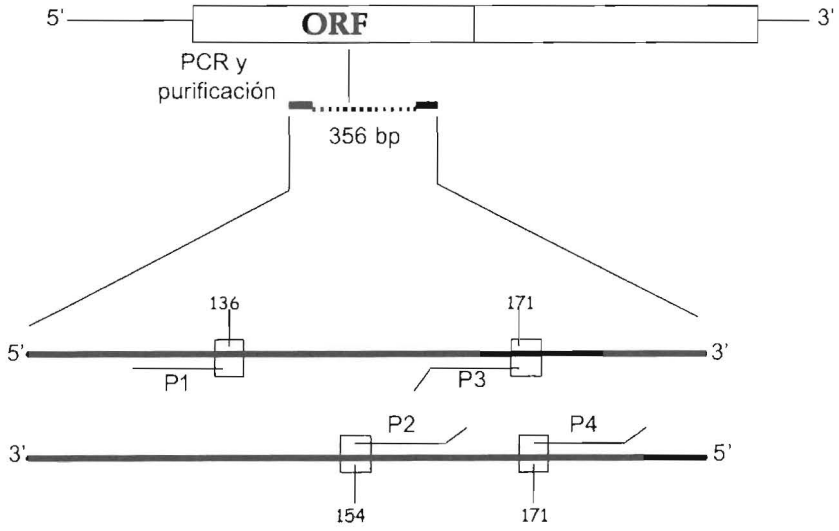
Para la verificación del método de diagnóstico genotípico, se ha analizado un grupo de 72 animales de diversas razas ovinas.

El proceso de genotipado se basa en la técnica denominada "*primer extension analysis*" (Syvanen, 1999; Sauer et al., 2000) y que explicamos brevemente a continuación.

* Trabajo financiado por la Junta de Castilla y León (Proyecto LE43/02)

A partir de la secuencia del gen *PRNP* de la oveja (Nº acceso GeneBank U67922) se han diseñado dos *primers* que amplifican un fragmento de 356 bp del exón III (entre las bases 353 y 708 de la región ORF) (Ver Figura 1).
Una vez amplificado el fragmento, se incuba con fosfatasa alcalina y exonucleasa III con el fin de eliminar el exceso de *primers* y nucleótidos de la reacción. A continuación, se realiza la reacción de *"primer extension"* para la que se emplean cuatro *primers*, cada uno de ellos específico de uno de los SNP relacionados con la resistencia a la tembladera. Con el fin de facilitar el proceso de genotipado, dos de los *primers* se han diseñado complementarios de la cadena directa (SNP del codón 136 y primer SNP del codón 171) y otros dos de la cadena reversa (SNP del codón 154 y segundo SNP del codón 171). El diseño de los *primers* del codón 154 y los dos del 171 se ha basado en la adición de diferentes colas de nucleótidos, con objeto de obtener productos con distinto tamaño.
La reacción de extensión de los *primers* se lleva a cabo utilizando el kit *"SNaPshot Multiplex"* de Applied Biosystems. Los productos resultantes se purifican con fosfatasa alcalina y a continuación se realiza la separación electroforética en un secuenciador automático ABIPrism 377 y la identificación de los genotipos mediante el software GeneScan®.
La verificación del método de genotipado se efectuó mediante secuenciación doble de 2-3 animales de cada uno de los genotipos detectados, empleando secuenciación cíclica del producto de 356 bp.

Figura 1: Esquema del procedimiento de genotipado en los codones 136, 154 y 171 del gen *PRNP* ovino



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 2 se pueden observar algunos de los patrones obtenidos en el proceso de secuenciación. Podemos ver que existen 4 regiones perfectamente diferenciadas en cuanto al tamaño del producto de electroforesis.

- En la región de los 20 bp se resuelve el genotipo del SNP del codón 136 pudiendo diferenciar entre la presencia de una citosina (triplete G**C**C) que codifica el aminoácido Alanina (A), o bien una timina (triplete G**T**C) correspondiente a la Valina (V).

- En la zona de 30 pares de bases diferenciamos la existencia de un triplete GCA, complementario de C**G**T y correspondiente al aminoácido Arginina (R) o bien GTA, complementario de C**A**T y correspondiente a Histidina (H).
- En la región de 35 bp se diferencian los animales que codifican para Arginina (R) en el aminoácido 171 de la proteína (triplete C**G**G) y los que no codifican para Arginina que son portadores del triplete C**A**K.
- La región de 40 bp diferencia dentro del grupo que no codifica para Arginina, a los portadores del triplete CAG, que determina una Glutamina (Q) o CAT y los que llevan una Histidina (H) en el aminoácido 171.

El método descrito es sencillo y rápido ya que, en una sola reacción, es capaz de discriminar los 4 SNPs relacionados con la resistencia a la tembladera en el ganado ovino. El alto rendimiento laboratorial que se puede alcanzar con esta técnica, permite hacer factible la introducción del genotipo del gen PRNP para los codones 136, 154 y 171 como uno de los criterios complementarios en los programas de selección establecidos en las distintas razas del ganado ovino.

Por lo que respecta a la fiabilidad del método, en la Tabla 1 podemos observar la coincidencia entre el genotipo definido mediante el método "*primer extension*" y la secuencia encontrada en los codones analizados. En los 3 animales secuenciados para cada uno de los 10 genotipos identificados, existe un 100% de coincidencia entre el genotipo identificado y la secuencia correspondiente a cada uno de los alelos. El método propuesto presenta, por lo tanto, una elevada fiabilidad.

Figura 2: Diferenciación de algunos de los genotipos para los codones 136, 154 y 171 del gen PRNP en el ganado ovino.

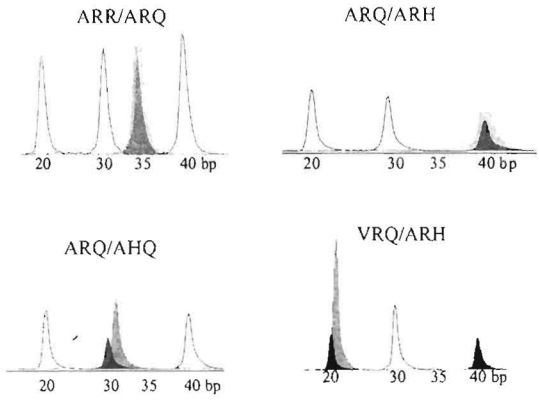


Tabla 1. Secuencia identificada en los alelos de los 30 animales secuenciados

Alelo	Codón 136	Codón 154	Codón 171
ARQ	GCC	CGT	CAG
ARH	GCC	CGT	CAT
ARR	GCC	CGT	CGG
AHQ	GCC	CAT	CAG
VRQ	GTC	CGT	CAG

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Dawson M, Hoinville, B, Hosie BD, Hunter N. (1998). Guidance on the use of PrP genotyping as an aid to the control of clinical scrapie. Vet. Rec., 142: 623-625.

Hunter N. (1997). Molecular biology and genetics of scrapie in sheep. En: The genetics of sheep. Ed. L Piper y A. Ruvinsky. Cab International.

Prusiner SB. (1998). Prions. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 117: 421-434.

Saber S, Lechner D, Berlin K, Lehrach H, Escary JL, Fox N, Gut IG. (2000). A novel procedure for efficient genotyping of single nucleotide polymorphisms. Nucleic Acids Res., 28: E13.

Syvanen AC. (1999). From gels to chips: "minisequencing" primer extension analysis of point mutations and single nucleotide polymorphisms. Hum. Mutat., 13: 1-10.