

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE MARCADORES MOLECULARES POTENCIALES EN EL GEN *TLR5* PORCINO

IDENTIFICATION AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF PUTATIVE MOLECULAR MARKERS IN THE PORCINE *TLR5* GENE.

Domínguez M.^{1*}, Landi V.¹, Martínez A.¹, Morera L.¹, Garrido J.J.¹

¹Departamento de Genética. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba. España. *madm02@hotmail.com

Abstract

Toll-like receptor 5 (TLR5) play a key role in the immune response acting as an innate sensor of pathogens, mainly in tissues maintaining close contact with microorganisms. Recently it has suggested that the occurrence of genetic polymorphisms in innate receptors may impair the immune function, consequently increasing or decreasing the individual susceptibility to infectious diseases. In this study, the promoter and coding sequences of the porcine *TLR5* gene were scanned with the aim of identifying mutations with potential effects on gene expression and pathogen recognition ability. Sixteen polymorphisms (9 promoter; 7 coding sequence), including two Indel variations in the promoter sequence, were identified in the porcine *TLR5* gene. The luciferase reporter gene assay indicated that one Indel, consisting in a 23-bp insertion at the - 581 to - 559 nucleotide position of the promoter *TLR5*, creates an additional STAT binding site, and it is associated with an increase of the promoter activity. In addition, one non-synonymous SNP 1272C/T causing a Pro402Leu change at the LRR7 domain of the porcine TLR5 resulted in a significant decrease in the receptor recognition ability. Taken together, our results suggests that genetic variation in the porcine *TLR5* gene could alter the expression and pathogen recognition ability of TLR5, and may be used as molecular markers to define pathogen susceptibility or resistance patterns in pigs.

Resumen

El receptor TLR5 desempeña un papel clave en la respuesta inmune, actuando como un sensor de patógenos, principalmente en aquellos tejidos que mantienen un estrecho contacto con los microorganismos. Recientemente, se ha sugerido que la presencia de variaciones genéticas en los receptores innatos puede alterar la respuesta inmune, incrementando o disminuyendo la susceptibilidad individual frente a enfermedades infecciosas. En este estudio, las secuencias promotora y codificante del gen *TLR5* porcino fueron analizadas con el objetivo de identificar mutaciones con efectos potenciales sobre la expresión génica y la capacidad de reconocimiento de patógenos. Se identificaron 16 polimorfismos (9 en el promotor; 7 en la secuencia codificante), incluyendo dos variaciones de tipo Indel, en el gen *TLR5* porcino. Los ensayos funcionales con el gen reportero luciferasa indicaron que un Indel (inserción de 23 pb en la posición -581 a -559, del promotor *TLR5*), crea un nuevo sitio de unión al factor transcripcional STAT, asociado con un incremento de la actividad promotora. Además, la presencia de un SNP no sinónimo (SNP 1272C/T = Pro402L), ubicado en el dominio LRR7 de TLR5, resultó en una disminución significativa de la capacidad de reconocimiento del receptor. En conjunto, nuestros resultados sugieren que la variación genética en el gen *TLR5* porcino podría alterar la expresión génica y la capacidad de reconocimiento de patógenos de TLR5, y pueden en un futuro ser usados como marcadores moleculares para definir los patrones de resistencia o susceptibilidad a los patógenos en cerdos.

Introducción

La familia de proteínas receptoras tipo toll (TLR) desempeñan un papel clave en el sistema inmune innato debido a su capacidad para actuar como sensores de una amplia gama de microorganismos, representando la primera línea de defensa contra los patógenos (Akira, 2003). TLR5 es un receptor extracelular encargado de reconocer la flagelina de origen bacteriano y desencadenar una cascada de señalización intracelular que desemboca en la inducción de la expresión de citoquinas y otros mediadores pro-inflamatorios (Kawai y Akira, 2011). TLR5 es especialmente relevante en aquellos tejidos donde la actividad de otros receptores es limitada, como en el caso del epitelio intestinal, el cual mantienen un contacto continuo con microorganismos comensales. En el epitelio intestinal, TLR5 es expresado en la superficie basolateral, por lo que solo puede ser

activado cuando algún microorganismo logra penetrar la barrera epitelial, evitando de esta forma la activación excesiva de la respuesta inflamatoria por microorganismos comensales. Recientes estudios en humanos, han sugerido que la presencia de variación genética en genes del sistema inmune pueden estar asociados con modificaciones en los patrones de resistencia o susceptibilidad a las enfermedades infecciosas (Ragnarsdóttir *et al.*, 2010; Krasznai *et al.*, 2011). Es por esto que en el presente trabajo se llevó a cabo la búsqueda y análisis funcional de polimorfismos en las secuencias promotora y codificante del gen *TLR5* porcino, con el objetivo de identificar marcadores potenciales de resistencia natural a las enfermedades en cerdos, que podrían en un futuro ser utilizados para establecer planes de mejora enfocados en el control de las enfermedades infecciosas.

Material y métodos

La secuencia promotora del gen *TLR5* porcino fue analizada con la herramienta bio-informática Genomatix (www.genomatix.de/), con el fin de identificar los principales elementos de regulación transcripcional ubicados en el promotor de *TLR5*. La identificación de los dominios funcionales de la proteína receptora *TLR5* se llevó a cabo con la herramienta *PROSITE* de la plataforma *Expasy* (www.expasy.org). La búsqueda de polimorfismos se realizó mediante la técnica de PCR-SSCP, sobre un total de 10 muestras de ADN procedentes de cerdos del cruce comercial Landrace x Large White. El análisis poblacional se llevó a cabo empleando la técnica de minisequenciación, sobre un total de 128 muestras de ADN, de 5 poblaciones porcinas (40 jabalíes, 15 Landrace, 25 Ibéricos, 13 Pelones Mexicanos y 35 Landrace x Large White), las cuales fueron analizadas de forma global y divididas en dos grupos de cerdos domésticos y jabalíes. Para el análisis funcional del polimorfismo, se realizó una selección de aquellas variaciones que afectaron sitios de unión a factores transcripcionales relevantes en la expresión génica (promotor: SNP -495A/G, Indel1 23pb, Indel2 5pb), o bien afectaron algún dominio funcional relevante en la actividad del receptor (secuencia codificante: SNP 1272C/T). Se diseñaron construcciones de ADN recombinante en vectores de expresión, y las variantes alélicas fueron generadas mediante mutagénesis dirigida. Las construcciones fueron transfectadas de forma transitoria en células CHO (estudio promotor) y HEK293T (estudio secuencia codificante). En el caso del polimorfismo SNP 1272C/T, las células transfectadas fueron estimuladas con flagelina y una cepa bacteriana de *Salmonella typhimurium*. Los datos funcionales de cada polimorfismo fueron obtenidos mediante ensayos con el gen reportero luciferasa. La determinación de diferencias estadísticas entre las variantes alélicas analizadas se realizó mediante una prueba ANOVA de una vía.

Resultados

En total se identificaron 9 polimorfismos en el promotor *TLR5*, siete correspondieron a variaciones de tipo SNP (SNP1 -834A→C, SNP2 -806G→A, SNP3 -779T→G, SNP4 -674G→A, SNP5 -673A→G, SNP6 -495A→G, SNP7 -431G→C) y los dos restantes a variaciones de tipo Indel (Indel1 23 pb, Indel2 5 pb). Las dos variaciones Indel detectadas, ocasionaron cambios en el patrón transcripcional de *TLR5*. En el Indel1, la inserción de 23 pb entre los nucleótidos -581 a -559, generó un sitio de unión al factor STAT. En lo que respecta al Indel2, la inserción de 5 pb cercanas al inicio del primer exón, entre los nucleótidos -87 a -83, creó un nuevo sitio de unión al factor ZF02. Por otro lado, el SNP6 -495A→G afectó un posible sitio de unión al factor de transcripción PPAR. A nivel de secuencia codificante, se detectaron 7 SNP, tres de tipo no sinónimos: SNP COD2 +901T→G (H278Q), SNP COD3 +1272C→T (P402L) y SNP COD4 +1313A→T (T416S). El SNP COD3, se observó dentro del dominio LRR7 de reconocimiento de patógenos. Los resultados obtenidos en el estudio poblacional confirmaron la elevada variabilidad del gen *TLR5*, observándose altos niveles de polimorfismo tanto en el grupo de cerdos domésticos como en el grupo de jabalíes. Los datos obtenidos en el cálculo de las frecuencias alélicas para cada *locus* revelaron que, con excepción del SNP2 y el SNP7, el resto de polimorfismos mostró frecuencias elevadas para su alelo menor, principalmente en aquellos localizados en la región promotora (figura 1). Los valores obtenidos en el análisis funcional del polimorfismo ubicado en la región promotora de *TLR5*, revelaron que en el Indel1, el cual crea un nuevo sitio de unión al factor transcripcional STAT, los valores de actividad luciferasa relativa mostraron un incremento altamente significativo ($p < 0,0001$) en aquellas células transfectadas con la inserción de 23 nucleótidos (19.00 ± 0.4661), con respecto al valor observado en aquellas células transfectadas con la delección de nucleótidos (9.253 ± 0.1732) (figura 2). Finalmente, el análisis funcional del SNP COD3 +1272C→T el cual provoca un cambio del aminoácido P402 por L402 en un dominio funcional de reconocimiento de patógenos de *TLR5*, reveló una

diferencia significativa ($p=0,0186$) en los ratios de actividad luciferasa generados por cada una de las variantes alélicas al ser estimuladas con el ligando flagelina (figura 3A), observándose una disminución de la actividad luciferasa en aquellas células transfectadas con la variante TLR5 402L (80.50 ± 3.522) con respecto a las células transfectadas con la variante TLR5 402P (95.01 ± 1.404). Una tendencia similar fue observada cuando las células transfectadas fueron estimuladas utilizando la cepa bacteriana *Salmonella typhimurium* DT 104 inactivada. Tal como se muestra en la figura 3B, la presencia de la variante alélica TLR5 402L (+1272T), localizada en el dominio LRR7 del receptor TLR5, provoca una reducción significativa ($p= 0,0224$) de la actividad luciferasa relativa (77.63 ± 5.277) con respecto a la actividad generada en aquellas células transfectadas con la variante alélica +1272C (TLR5 402L), la cual mostró un valor de 103.8 ± 4.953 .

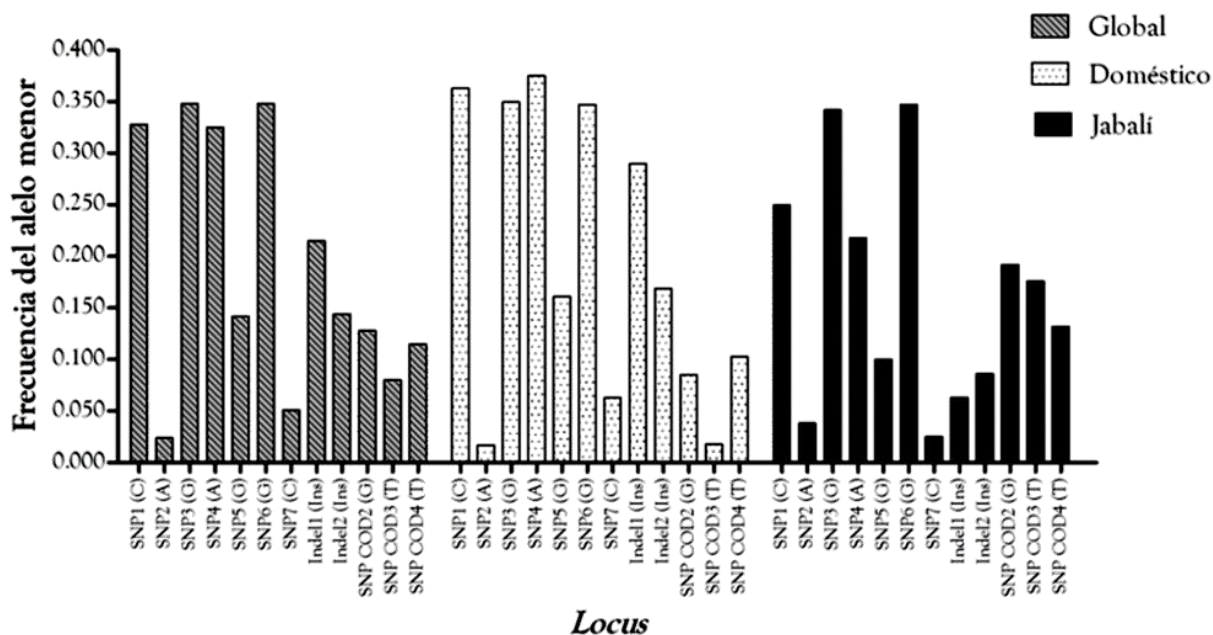


Figura 1. Frecuencias alélicas de las variaciones genéticas identificadas en TLR5. (Allele frequencies for genetic variations identified in TLR5). La figura muestra el resultado del análisis global del cálculo de frecuencias, así como la comparación entre los grupos poblacionales. Entre paréntesis se muestra el alelo menor para cada polimorfismo.

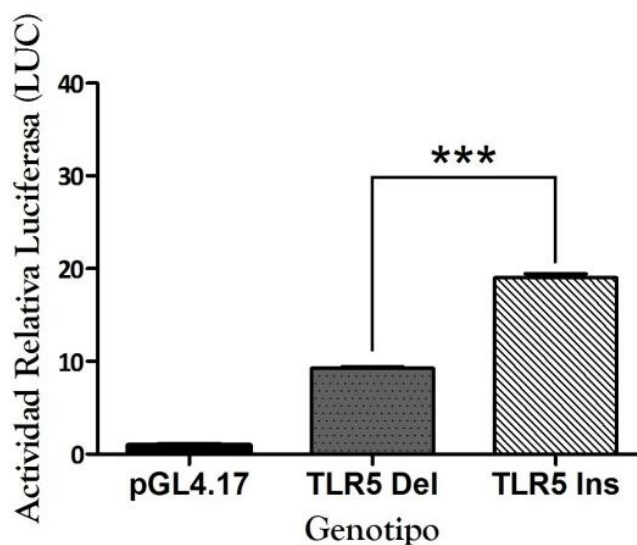


Figura 2. Análisis funcional del polimorfismo TLR5 Indel1 (Functional analysis of TLR5 Indel1 polymorphism). La gráfica muestra los valores de actividad luciferasa generados por cada variante alélica del Indel 1, localizado en la región promotora del gen TLR5 (***) $p<0,0001$).

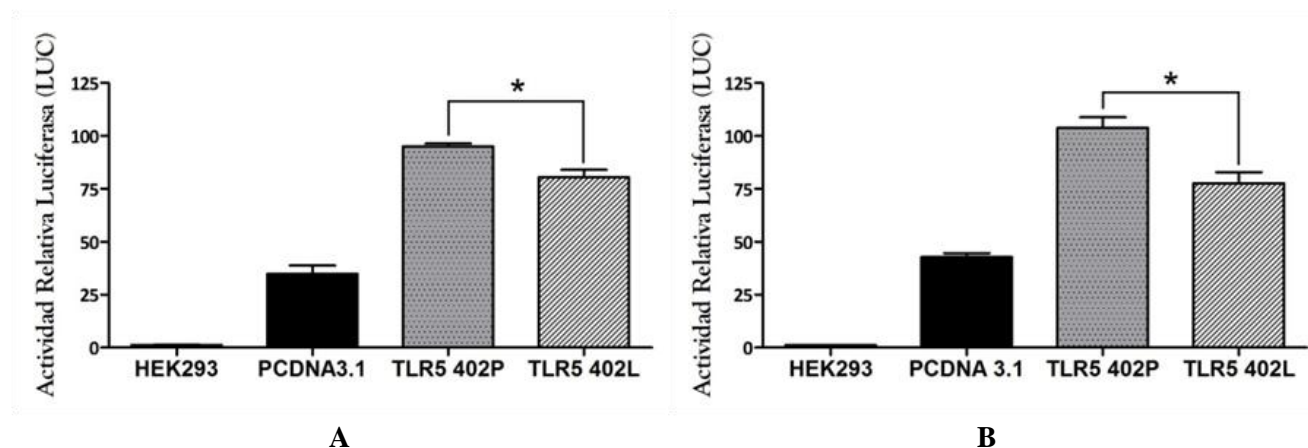


Figura 3. Ensayos funcionales del polimorfismo *TLR5* SNP COD3 +1272C→T (*Functional assays of TLR5 SNP COD3 +1272C→T polymorphism*). Ratios de actividad luciferasa relativa mostrados por las células HEK293T transfectadas con las variantes alélicas del SNP, estimuladas con flagelina (A) y con la cepa bacteriana bacteriana *Salmonella typhimurium* DT 104 inactivada (B).

Conclusiones

En conclusión, nuestros datos revelan un alto nivel de variabilidad en el gen *TLR5* porcino. Algunas de estas variaciones polimórficas pueden modificar la expresión del gen o alterar la capacidad de reconocimiento e interacción del receptor con el ligando bacteriano, confirmando que estos polimorfismos pueden ser utilizados como marcadores moleculares para posteriores ensayos enfocados en el estudio de la susceptibilidad o resistencia a las enfermedades infecciosas en el ganado porcino.

Bibliografía

- Akira S. (2003). *Mammalian Toll-like receptors*. Current Opinion in Immunology 15(1): 5-11.
- Kawai, T., Akira, S. (2011). Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. Immunity 34, 637–650.
- Kraszna, M., Szaniszló, K., Kraxner, H., Vargha, E., Kovacs, M., Borocz, Z., et al. (2011). Association of TLR-4 and TNF alpha polymorphisms with clinical symptoms and cytokine levels in patients with allergic rhinitis. Eur Arch Otorhinolaryngol 268, 561–567.
- Ragnarsdóttir, B., Jönsson, K., Urbano, A., Grönberg-Hernandez, J., Lutay, N., Tammi, M., et al. (2010). Toll-like receptor 4 promoter polymorphisms: common TLR4 variants may protect against severe urinary tract infection. PLoS One 5, e10734.