



Universitat Autònoma de Barcelona

Facultat de Veterinària

**FACTORS GENÈTICS DE LA LEISHMANIOSI CANINA:
CARACTERITZACIÓ DEL *NRAMP1* COM A GEN CANDIDAT**

TESI DOCTORAL

Laura Altet i Sanahujes

Bellaterra (Barcelona), maig 2002

a l'Enric i als pares

El Dr. **Armand Sánchez Bonastre**, Catedràtic del Departament de Ciència Animal i dels Aliments de la Universitat Autònoma de Barcelona,

i

la Dra. **Olga Francino Martí**, Tècnic de suport a la recerca de la Universitat Autònoma de Barcelona.

CERTIFIQUEN:

Que na **Laura Altet i Sanahujes** ha realitzat sota la seva direcció el treball de recerca “Factors Genètics de la leishmaniosi canina: caracterització del *Nramp1* com a gen candidat” per a obtenir el grau de doctor en Veterinària.

Que aquest treball s’ha dut a terme a la Unitat de Genètica i Millora del Departament de Ciència Animal i dels Aliments de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Bellaterra, 13 de Maig de 2002

Dr. Armand Sánchez Bonastre

Dra. Olga Francino Martí

Tot i que semblava que mai s'acabés ha arribat l'hora de recordar tota la gent que ha fet possible la realització d'aquest treball de recerca, que he disfrutat moltíssim i que només m'ha deixat ganes de continuar i treballar afèrrissament en totes les coses que han anat quedant pel camí.

Primerament agrair als pares tot el que sóc i fins on he arribat, i al meu germà el seu exemple, ajut i bons consells.

El meu home, l'Enric, mereix un apartat a part: és la persona que em cuida i em fa feliç, m'ha aguantat totes les neures i es mereix sense cap dubte el títol de “sufridor”. A més aquests darrers dies ha estat el meu “printing man”.

Als directors de tesi, l'Olga i l'Armand, agrair-los-hi sobretot la confiança que m'han demostrat i tot l'ajut que d'ells he rebut, no només en l'àmbit científic sinó també en el personal. Són el que se'n diu una JOIA.

A tots els companys del departament, tant els que encara hi són com els que han anat circulant, agrair-los-hi el bon ambient i companyerisme que s'hi respira i totes les bones estones tant a dins com fora de la feina.

En aquests apartat faré especial menció a la Romi, que ha estat la persona amb qui vaig començar la tesi i que m'ha ajudat sempre moltíssim en tot el que he necessitat. A l'Alex que sempre ha tingut el moment de fer una bona tertúlia, o teràpia de grup, davant d'una cerveseta. Al Marcel per la seva crítica constructiva. A l'Oscar i al Manel, els primers “pupilos” que he tingut, per la paciència que m'han mostrat i tot el que m'han ensenyat. A l'Alhelí i la Laia per haver-me ensenyat tant sobre la leishmaniosi i per no deixar que vagi sola als congressos. I a l'Atilio pel seu ajut en tot el tema estadístic.

Fora de l'àmbit de la feina vull agrair al Marius i especialment al Jordi, el meu cunyat, la seva paciència i suport tècnic en la tesi. M'han escanejat tot el que he necessitat quan ho he necessitat i això no té preu.

D'una manera més genèrica agrair a tots els amics que han suportat l'excusa de "no puc, estic liada amb la tesi" i als quals d'ara endavant hauré de compensar totes les trobades perdudes.

Per últim, no em voldria deixar a totes les clíniques veterinàries i criadors, especialment Can Riera, que m'han aportat mostres per poder realitzar aquest treball.

Si en tot aquests recordatori m'ha fallat en algun moment la memòria, que ningú s'ho prengui malament i es doni també per agraït.

Gràcies a tots.

ABREVIATURES

- **AP** Proteïna activadora
- **APC** Cèl·lules presentadores d'antigen
- **bp** Parell de bases
- **CATS** Comparative anchor tagged sequences
- **DLA** Dog leukocyte antigen
- **DSCA** Double-strand conformation analysis
- **FISH** Hibridació fluorescent *in situ*
- **HVR** Regions hipervariables
- **IFN** Interferó
- **Ig** Immunoglobulina
- **IL** Interleucina
- **iNOS** Sintetasa d'òxid nítric induïble
- ***Ir-2*** Immune Response 2
- **Kb** Quilobase
- **LPS** Lipopolisacàrid
- **MAPK** Proteïncinases mitogen-activades
- **MHC** Complex principal d'histocompatibilitat
- **Mlv** Malvolio
- **MnTH** Manganese transporter protein
- **NF** Factor nuclear
- **NK** Natural Killer
- **NO** Òxid nítric
- **Nramp** Natural resistance-associated macrophage protein
- **PCR** Polymerasa chain reaction
- **PIC** Polymorphism information content

- **PKC** Proteïncinasa C
- **RFLP** Restriction fragment length polymorphism
- **RH** Radiation Hybrid
- ***Rld-1*** Recovery from *Leishmania donovani*
- **SBT** Sequence based typing
- **SH3** Src homology 3
- **Slc11a1** Solute carrier family 11 member 1
- **SNP** Single nucleotide polymorphism
- **SSCP** Single strand conformation polymorphism
- **SSOP** Sequence-specific oligonucleotide probes
- **TDT** Test de transmissió desequilibrada
- **Th** Limfòcits col·laboradors
- **TM** Transmembrana
- **TNF** Factor de necrosi tumoral

ÍNDIX

INTRODUCCIÓ	1
1. La importància de la leishmaniosi	1
2. Gens candidats de resistència o susceptibilitat a la leishmaniosi	4
2.1 El locus <i>Bcg/Ity/Lsh</i> : caracterització funcional	6
2.2 <i>Nramp1</i> : caracterització genètica i proteica	7
2.3 <i>Nramp1</i> en altres espècies: conservació proteica i funcional	11
2.4 El gen <i>Nramp1</i> com a candidat de la resistència/susceptibilitat a diferents patologies infeccioses i autoimmunes	17
2.5 Altres possibles gens candidats de resistència o susceptibilitat a la leishmaniosi	21
3. La necessitat de famílies de referència	26
OBJECTIUS	33
RESULTATS	35
Microsatellite polymorphism in closely related dogs	35
Mammalian orthologous PCR of the putative TM4 of the <i>NRAMP1</i> gene and molecular characterisation of this region in dog	41
Mapping and sequencing of the canine <i>NRAMP1</i> gene and identification of mutations in leishmaniasis-susceptible dogs	45
Anàlisi del polimorfisme dels gens <i>DRB1</i> i <i>DQB1</i> del complex principal d'histocompatibilitat del gos	55
DISCUSIÓ	65
1. Anàlisi de marcadors	65
2. Gens candidats a la leishmaniosi canina	69
2.1 <i>Nramp1</i> : caracterització genètica i proteica	69
2.2 El gen <i>Nramp1</i> : anàlisi de polimorfisme i identificació de mutacions	75

2.3	Caracterització del MHC caní	79
CONCLUSIONS		89
RESUM		91
RESUMEN		97
SUMMARY		103
REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES		107
ANNEX 1		137

ÍNDIX DE TAULES I FIGURES

FIGURES

Introducció

1. Signes clínics més freqüents en la leishmaniosi canina	3
2. Múltiples efectes pleiotròpics del locus <i>Bcg/Ity/Lsh</i> sobre la regulació de l'activació dels macròfags	8
3. Estructura de la proteïna Nramp1	10
4. Transport d'ions divalents per les proteïnes Nramp en la inter fase d'interacció hoste-patogen	16
5. Esquema de les molècules de classe I i classe II del MHC	22
6. Polimorfisme descrit en les molècules de classe II de l'home i del ratolí	24
7. Cariotip caní	27
8. Mapa de lligament (meiòtic), <i>RH map</i> i mapa citogenètic integrat del cromosoma 1 del gos	30

Resultats

1. Anàlisi de segregació dels patrons de PCR-RFLP per al gen <i>DRB1</i>	57
2. Aliniament de les seqüències aminoacídiques del domini $\beta 1$ de les seqüències DRB1 canines	63
3. Aliniament de les seqüències aminoacídiques del domini $\beta 1$ de les seqüències DQB1 canines	64

Discussió

1. Esquema de les mutacions identificades en els quatre Beagles infectats experimentalment	76
2. Aliniament aminoacídic del DLA-DQB1	85
3. Aliniament aminoacídic del DLA-DRB1	87

TAULES

Introducció

- | | |
|---------------------------------|----|
| 1. Família de gens <i>Nramp</i> | 13 |
|---------------------------------|----|

Discussió

- | | |
|---|----|
| 1. Anàlisi de l'exó 5 a l'exó 7 del gen <i>Nramp1</i> caní per PCR-RFLP | 73 |
|---|----|

introducció

Els darrers avenços en genètica molecular i en els projectes de seqüenciació del genoma de moltes espècies, entre elles l'espècie canina, ha permès un exhaustiu anàlisi comparatiu dels genomes ajudant, en gran mesura, a la recerca de gens candidats. Dins el camp de la resistència o susceptibilitat a malalties infeccioses, aquesta recerca pot millorar la comprensió dels mecanismes d'interacció hoste-patogen, i ajudar en el control i eliminació de l'agent infecciós. La identificació d'aquests gens candidats i els seus polimorfismes, a nivell molecular, és un primer pas necessari per portar a terme treballs d'associació que permetin esbrinar la funció del gen. Així doncs, entendre la resposta que genera l'individu en front de l'agent causal prepara, sens dubte, el terreny d'una profilaxi i terapèutica individualitzades i racionals que permetin augmentar la resistència de l'hoste. Aquesta tesi s'enmarca conceptualment en l'estudi dels factors genètics que influeixen en la leishmaniosi canina, malaltia estudiada, fins al moment, tant a nivell epidemiològic i immunològic, com a nivell terapèutic, on incloc patologia, diagnòstic, tractament i profilaxi. Identificar els gens que intervenen en la resistència o susceptibilitat a la leishmaniosi, junt amb programes de cria gestionats, podria dur a una significativa disminució de la prevalença de la malaltia en el gos. A més, hem de tenir en compte que, per la seva similar patologia i simptomatologia (Keenan *et al.*, 1984) i pel fet de que comparteixen les mateixes condicions ambientals, aquesta espècie pot ser utilitzada com un bon model d'estudi de la mateixa malaltia en l'home.

1. La importància de la leishmaniosi.

En la conca mediterrània, la leishmaniosi és una zoonosi endèmica causada pel paràsit *Leishmania infantum*, un protozou de l'ordre dels Kinetoplastida i de la família Trypanosomatidae, inclòs en el complex *Leishmania donovani*. En aquesta malaltia,

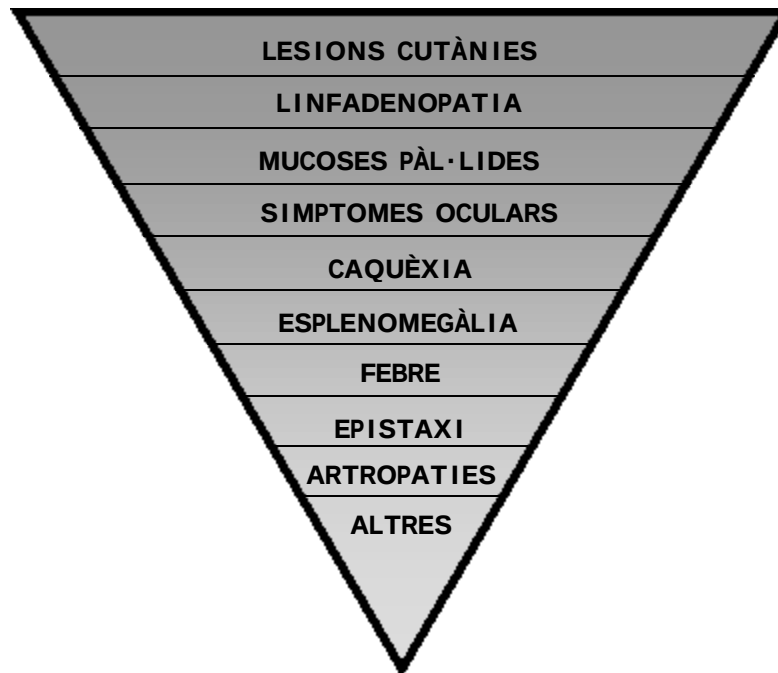
transmesa per insectes del gènere *Phlebotomus*, el gos i alguns cànids salvatges són considerats el reservori natural del paràsit (Bettini & Gradoni, 1986).

En el cas del gos però, infecció no s'ha d'entendre com a sinònim de malaltia. En una zona endèmica com la nostra, la prevalença de la infecció, mesurada identificant específicament el DNA del paràsit en l'animal, és d'un 65%, mentre que la prevalença de la malaltia és, tan sols, d'un 10% (Solano-Gallego *et al.*, 2000). El gos infectat reacciona en front del paràsit amb una resposta immunitària humoral i cel·lular que confereix un gran ventall de situacions en funció de quin tipus de resposta predomini. Mentre que una forta resposta humoral s'associa a susceptibilitat a la malaltia, la resposta cel·lular és protectora en front *L. infantum* (Pinelli *et al.*, 1994; Cabral *et al.*, 1998; Ferrer *et al.*, 2002). Així doncs, tenim gossos simptomàtics amb una resposta humoral específica i nula o minsa resposta cel·lular i gossos asimptomàtics. Aquests darrers engloben els animals no infectats amb cap resposta específica vers el paràsit, gossos infectats resistents amb una forta resposta cel·lular específica i baixa producció d'anticossos, i gossos infectats en període d'incubació que acabaran esdevenint malalts i que mostren una resposta humoral sense resposta cel·lular específica (Ferrer *et al.*, 2002). Tot i que els factors que decanten el tipus de resposta immunitària que es produeix no estan del tot aclarits, si que està establert que el macròfag juga un paper fonamental en el control del paràsit, no només com a cèl·lula hoste a l'interior de la qual es multiplica, sinó també com a cèl·lula presentadora d'antigen (Alexander & Russell, 1992; Solbach *et al.*, 1991).

Basat en els diferents quadres clínics que es produeixen en la leishmaniosi humana, la leishmaniosi canina es classifica com a visceral, tot i que la simptomatologia en el gos és sistèmica i molt variada (Figura 1), dificultant en molts casos el seu diagnòstic. A tot l'esmentat anteriorment, hem d'afegir un tractament car i no sempre efectiu, ja que hi ha gossos que recidiven arribant a morir per la malaltia, i una profilaxi, basada

fins al moment, en el control del vector que la transmet, el *Phlebotomus* (Strauss-Ayali & Baneth, 2000).

Figura 1. Signes clínics més freqüents en la leishmaniosi canina (Strauss-Ayali & Baneth, 2000).



La leishmaniosi causada per *L. infantum* però, no només és de gran importància en el gos, ja que també pot afectar l'home i així com, tradicionalment, es limitava a infants, darrerament està resorgint com una de les coinfeccions més freqüents, i sovint de curs fatal, en persones malaltes del virus de la SIDA (Strauss-Ayali & Baneth, 2000). Dels 1700 casos de coinfecció leishmaniosi-SIDA recollits per l'Organització Mundial de la Salut fins l'any 1998, 835 casos es varen produir a Espanya. No és d'extranyar doncs, que aquesta mateixa organització hagi declarat els malalts de SIDA com el major grup de risc en zones on aquestes dues malalties coexisteixen (<http://www.who.int/emc/diseases/leish/index.html>).

2. Gens candidats de resistència o susceptibilitat a la leishmaniosi.

Donat que la leishmaniosi afecta també als ratolins, aquests animals s'han utilitzat àmpliament com a model d'experimentació per obtenir el màxim d'informació possible que pugui ajudar en el control d'aquesta malaltia (Cox, 1981). Va ser observant el curs de la leishmaniosi en diferents línies de ratolí quan Bradley va descriure que el creixement del paràsit, en aquest cas *Leishmania donovani*, variava molt en funció de la població de ratolí analitzada (Bradley, 1974). D'aquesta observació van sorgir les preguntes de quines són les bases que regulen aquesta diferent resposta i de com pot ser que en una malaltia on molts individus s'infecten, només alguns esdevinguin realment malalts. La diferent virulència del paràsit, la diferent quantitat de paràsit que entra en contacte amb cada hoste i la diferent resposta de l'hoste, on s'inclouria l'ambient, com per exemple malnutrició, i un possible control genètic de la resistència/susceptibilitat a la infecció, varen ser les respostes plantejades (revisat per Bradley, 1982).

La certesa d'una component genètica en el control de la resposta de l'hoste va quedar establerta quan van seguir observant un creixement diferencial del paràsit en funció de la línia de ratolí analitzada, tot i tenir la resta de paràmetres que podien influir controlats (Bradley, 1977). Al realitzar una infecció experimental s'asseguraven una mateixa dosi, amb la mateixa soca de *Leishmania* i sota les mateixes condicions ambientals. En aquest mateix treball es definien dues fases en el curs de la malaltia controlades per diferents gens i, donat que utilitzaven línies de ratolí no seleccionades per la diferent resistència o susceptibilitat a la leishmaniosi, detectar gens d'efecte major va ser relativament fàcil.

En la primera fase, que inclouria les quatre primeres setmanes de la infecció, es produeix la multiplicació del paràsit i està sota el control de la **immunitat natural o**

innata. Realitzant diferents creuaments i retrocreuaments entre les línies de resposta diferent es va poder determinar que aquesta resposta innata està sota el control d'un sol gen autosòmic, que varen anomenar *Lsh*, on l'al·lel de resistència segrega seguint una dominància incompleta, i l'al·lel de susceptibilitat de forma recessiva (Bradley, 1977). Posteriorment aquest gen va ser mapejat al cromosoma 1 del ratolí, entre el centròmer i el gen *Id-1* (Bradley *et al.*, 1979), i la seva expressió delimitada als orgues del sistema Reticle-endotelial (fetge i melsa) i als macròfags madurs derivats d'ells (Crocker *et al.*, 1984).

Estudis paral·lels en altres patògens intracel·lulars, com ara *Mycobacterium bovis* o *Salmonella typhimurium*, destacaven també l'efecte d'un sol gen autosòmic dominant com a responsable del control de la proliferació dels microorganismes en les primeres fases de la infecció, que es van anomenar *Bcg* i *Ity*, respectivament (Gros *et al.*, 1981; Plant & Glynn, 1976). Donat que ambdós gens estaven situats també al cromosoma 1 del ratolí, com en el cas del gen *Lsh*, i que no existia recombinació entre ells, es va postular que *Bcg/Ity/Lsh* eran un mateix gen amb efectes pleiotròpics que li permetien controlar la replicació de microorganismes taxonòmicament i antigènicament tant diferents (Plant *et al.*, 1982; Skamene *et al.*, 1982).

Fent un seguiment de la leishmaniosi a llarg plaç, es va veure que línies susceptibles de ratolí en la primera fase tenien diferent evolució: mentre que unes curaven de forma espontània, altres seguien un curs fatal de la malaltia que sovint acabava amb la mort dels animals (Bradley, 1977). Aquesta segona fase de resposta a la malaltia a llarg termini està sota el control de la **immunitat específica o adquirida** que pot estar influenciada per diferents gens. Mitjançant anàlisi de segregació va ser identificat un gen situat dins el complex principal d'histocompatibilitat (*H-2*), o molt a prop d'ell, anomenat provisionalment *Rld-1* per *recovery from L. donovani*, que controla la resistència adquirida d'una manera recessiva permetent la recuperació de ratolins

susceptibles en la primera fase de la malaltia (Blackwell, 1982; Blackwell *et al.*, 1980). Altres autors confirmen el paper d'aquest locus situat al cromosoma 17 del ratolí, però afegeixen altres loci no lligats al complex principal d' histocompatibilitat (MHC, de *Major Histocompatibility Complex*) com el gen *Ir-2* (*immune response 2*), situat al cromosoma 2 del ratolí, i el locus H-11 (DeTolla *et al.*, 1980).

Resultats similars, tant en el decurs de la malaltia com en els gens involucrats en el control de cadascuna de les fases, s'han trobat en infeccions experimentals de ratolí amb el paràsit *Leishmania infantum* (Leclercq *et al.*, 1996).

2.1. El locus *Bcg/Ity/Lsh*: caracterització funcional.

Estudis funcionals per intentar esbrinar com actua el locus *Bcg/Ity/Lsh* han demostrat que té múltiples efectes pleiotròpics que regulen l'activació dels macròfags (Figura 2). Un estímul, tal com el lipopolisacàrid bacterià (LPS), sol o conjuntament amb gamma interferó (IFN- γ), que és secretat pels limfòcits T o per les cèl·lules agressores naturals (NK, de *natural Killer*), produeixen sobre el macròfag una cascada d'esdeveniments controlats pel locus *Bcg/Ity/Lsh* (Crocker *et al.*, 1984; Govoni *et al.*, 1995; 1997; Oliver *et al.*, 1998). Aquests esdeveniments inclouen efectes sobre la producció de substàncies antimicrobials i citocines per part del macròfag, així com efectes sobre l'expressió dels gens del MHC.

Els efectes sobre la producció de substàncies antimicrobials consisteixen en la regulació de l'expressió de la sintetassa d'òxid nítric induïble (iNOS) i el control del fluxe de L- arginina, ambdues necessàries per l'alliberació d'òxid nítric (NO) (Barton *et al.*, 1995), i el control de les formes reactives de l'oxigen ($O_2^- + H_2O_2$) (Denis *et al.*, 1988; Barton *et al.*, 1995). Els efectes sobre la producció de citocines inclouen la regulació tant de la quimiocina KC, pertanyent a la família de la interleucina 8, que atrau els leucòcits polimorfonuclears (Roach *et al.*, 1994), com de les citocines factor

de necrosi tumoral- α (TNF- α) (Roach *et al.*, 1991; Formica *et al.*, 1994) i la interleucina-1 β que indueixen la formació del granuloma que activa als limfòcits T CD4⁺ o CD8⁺ (revisat per Blackwell *et al.*, 1991; Karupiah *et al.*, 2000). El darrer efecte pleiotròpic que se li ha atribuït al locus *Bcg/I ty/Lsh* és el control de l'expressió de les molècules de classe II del MHC presentadores d'antigen (Kaye & Blackwell, 1989; Lang *et al.*, 1997).

Aquesta cascada de fets mèdia la inflamació i augmenta l'activitat microbicida dels macròfags i l'activació limfocitària per l'augment en el processament i presentació d'antigen als limfòcits T. Una resposta perllongada de l'activació dels macròfags però, pot desencadenar en una malaltia autoimmunitària i una patologia crònica (Blackwell, 1996; Blackwell & Searle, 1999). Això augmenta l'interès pel locus *Bcg/I ty/Lsh*, ja que no tan sols té efecte sobre el control de la replicació de microorganismes intracel·lulars en les primeres fases de la infecció, com hem descrit prèviament, sinó que pot ésser també un gen candidat de susceptibilitat a malalties autoimmunitàries (Blackwell, 1996).

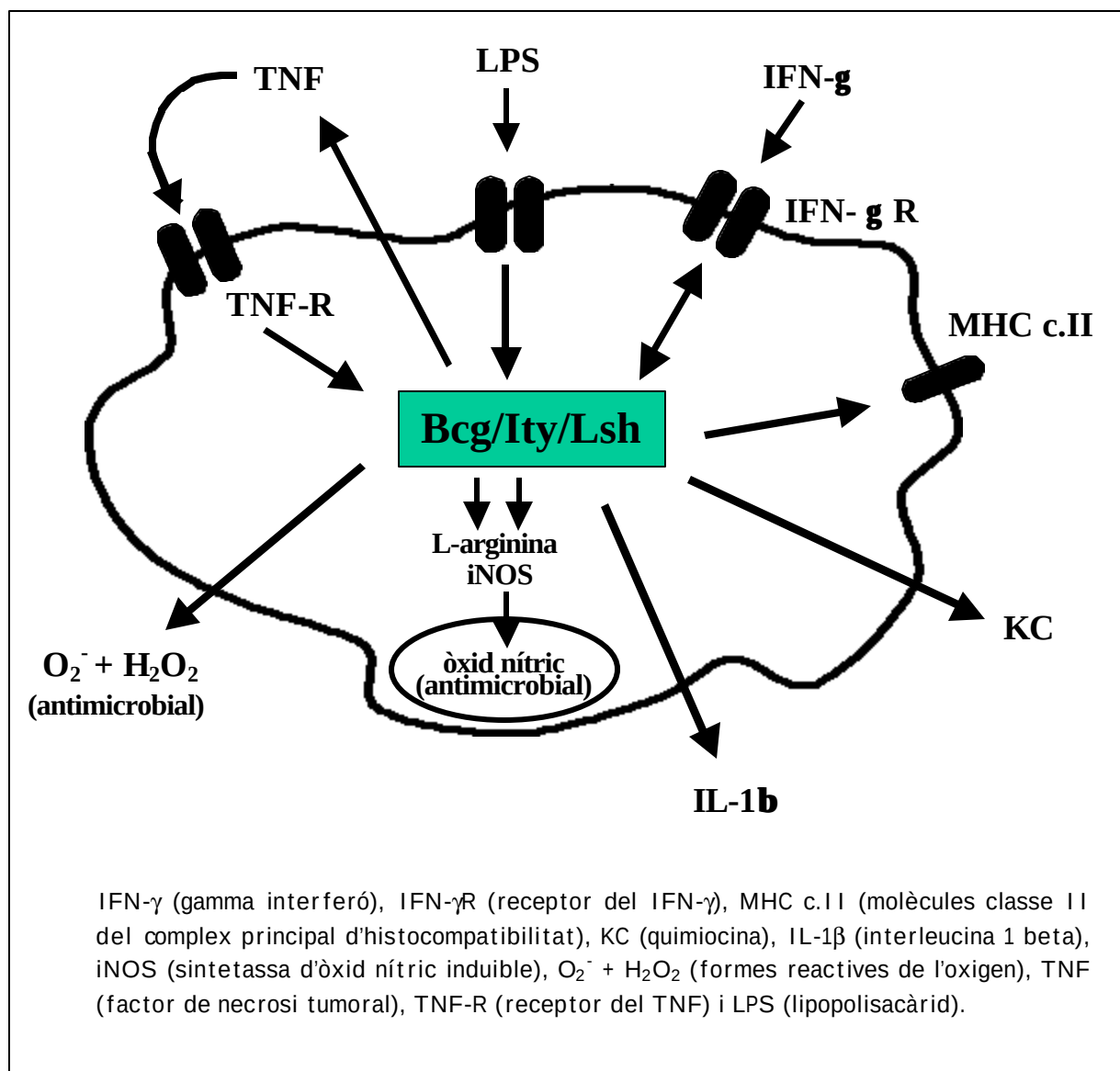
2.2. Nrampl: caracterització genètica i proteica.

Al 1993, fent recerca d'unitats de transcripció en les proximitats de la zona on havia estat posicionat el locus *Bcg/I ty/Lsh*, mitjançant el mètode d'amplificació d'exons (*exon trapping*), Vidal i col·laboradors identifiquen sis gens majors com a possibles candidats. Estudis d'expressió d'aquests gens confirmen que només un s'expressa exclusivament en macròfags provinents dels òrgans del sistema Reticle-endotelial i es per això que l'anomenen *Natural resistance-associated macrophage protein (Nrampl)* (Vidal *et al.*, 1993).

La seqüència completa del seu cDNA en diferents línies consanguínies de ratolí permet identificar quatre polimorfismes silenciosos i un canvi no conservatiu (Gly¹⁶⁹ → Asp¹⁶⁹) que està en absoluta associació amb la diferent resistència observada a la

infecció per micobacteris, essent Gly¹⁶⁹ l'al·lel de resistència i Asp¹⁶⁹ l'al·lel de susceptibilitat (Malo *et al.*, 1994). Comparant el perfil de la replicació dels diferents microorganismes que sembla que controla el locus *Bcg/Ity/Lsh* (*Mycobacterium*,

Figura 2. Múltiples efectes pleiotròpics del locus *Bcg/Ity/Lsh* sobre la regulació de l'activació dels macròfags (modificat de Blackwell, 1996).



Salmonella i *Leishmania*) en ratolins modificats genèticament, que contenen al·lells nuls per al gen *Nramp1* (*Nramp1*^{-/-}), s'estableix que l'al·lel *Nramp1*^{Asp169} presenta les

característiques d'un al·lel nul, amb una pèrdua total de funció (Vidal *et al.*, 1995b; 1996). La certesa d'una associació al·lèlica entre el locus *Bcg/Ity/Lsh* i el gen *Nramp1* però, queda confirmada definitivament mitjançant la realització d'animals transgènics (Govoni *et al.*, 1996). Transferint una còpia de l'al·lel *Nramp1*^{Gly169} a un animal *Nramp1*^{Asp169}, aquest esdevé resistent a la infecció per qualsevol dels tres microorganismes intracel·lulars que controla el locus *Bcg/Ity/Lsh*.

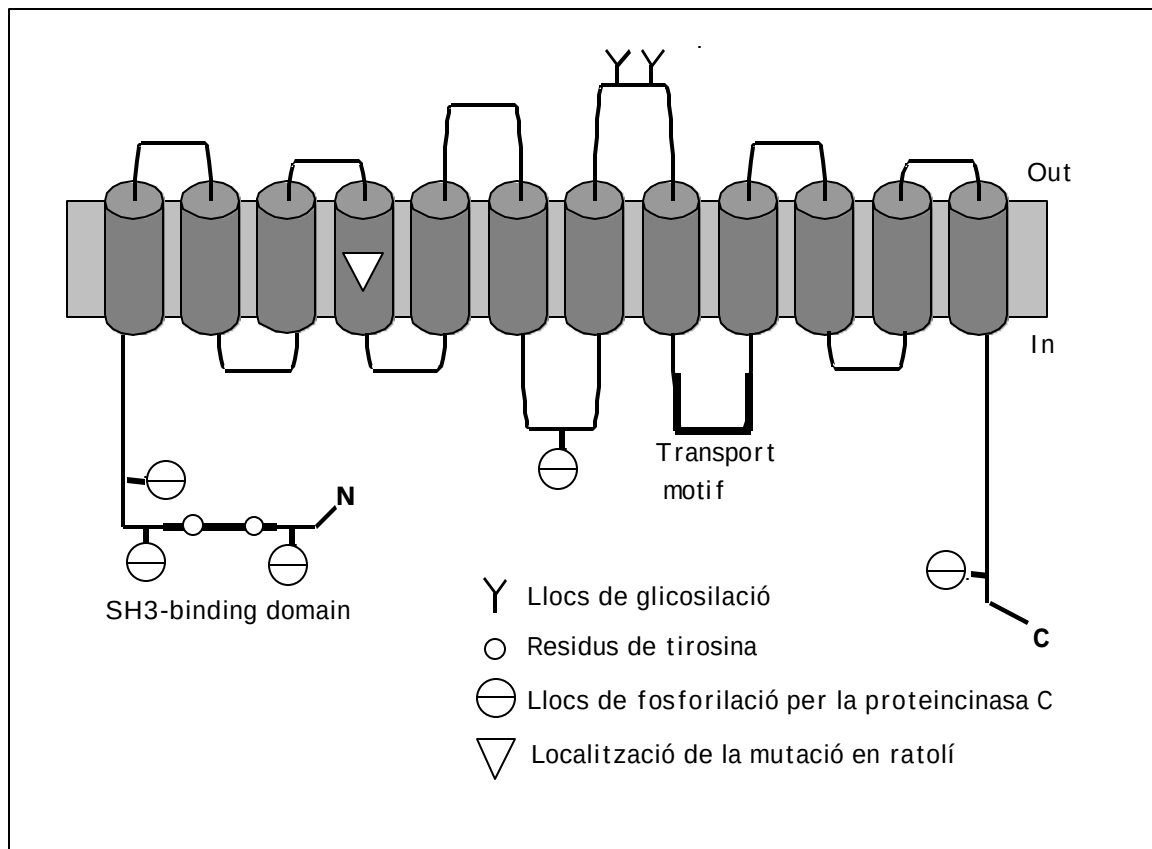
El gen *Nramp1* (actualment classificat com *Slc11a1*, de *solute carrier family 11 member 1*), en ratolí, està format per 15 exons que s'extenen un total de 11.5 Kb i el seu promotor conté diversos elements de resposta a LPS i IFN- γ que augmenten la seva expressió (Govoni *et al.*, 1995). Aquest gen codifica per a una proteïna de membrana (Figura 3) composta de 12 dominis transmembrana (TMs) altament hidròfobs, un *loop* extracel·lular glicosilat i diversos llocs de fosforilació per a les proteïncinases A i C (Vidal *et al.*, 1993). La mutació Gly¹⁶⁹ $\rightarrow$ Asp¹⁶⁹ s'ha localitzat al TM4. També s'ha identificat a l'extrem aminoterminal un motiu ric en prolines i serines d'unió als dominis SH3 (*Src homology 3*), que sembla que medien interaccions proteiques específiques i necessàries com a senyals de transducció (Barton *et al.*, 1994), i un motiu de transport similar al motiu de transport de procariotes conegut com *binding-protein-dependent transport systems inner-membrane-component signature* (Bairoch, 1993).

Dins del macròfag la proteïna està localitzada en les membranes dels darrers compartiments endocítics (darrer endosoma/lisosoma) quan està inactiu (Atkinson *et al.*, 1997; Gruenheid *et al.*, 1997) i després de la fagocitosi es situa a la membrana del fagosoma on s'hi manté associada durant la seva maduració a fagolisosoma (Gruenheid *et al.*, 1997; Searle *et al.*, 1998). Aquesta localització, junt amb el fet de contenir un motiu de transport, suporta la hipòtesi de que el gen *Nramp1* controla la replicació

dels microorganismes intracel·lulars alterant l'ambient dels fagosomes que els contenen (Gruenheid *et al.*, 1997; Searle *et al.*, 1998).

Per la similitud estructural entre el *Nramp1* i el transportador de membrana *CrnA*, que actua com a concentrador de nitrogen en l'eucariota *Aspergillus nidanus*, es va proposar primerament que el *Nramp1* podria estar involucrat en el transport de nitrat

Figura 3. Estructura de la proteïna Nramp1(Blackwell, 1996).



o nitrit, dos productes de l'oxidació de l'òxid nítric que juga un paper fonamental en l'activitat microbicida dels macròfags activats (Vidal *et al.*, 1993). Aquesta funció però, no explicaria tots els efectes pleiotròpics atribuïts al *Nramp1*.

2.3. Nramp1 en altres espècies: conservació proteica i funcional.

Un avenç important en l'estudi del mecanisme d'acció i el possible substracte transportat pel *Nramp1* apareix amb el descobriment de que aquest gen forma part d'una família més àmplia de gens que codifiquen per proteïnes íntegres de membrana (revisat per Cellier *et al.*, 1996). S'han descrit fins a dos gens més de la mateixa família en el ratolí: el *Nramp2* s'expressa en tots el teixits analitzats i es situa al cromosoma 15 del ratolí i un tercer gen situat al cromosoma 17 anomenat *Nramp-related sequence (Nramp-rs)* (Dosik *et al.*, 1994; Gruenheid *et al.*, 1995). A aquesta família s'han anat incorporant tots els gens *Nramp* descrits en altres espècies fins al moment.

En el cas de l'home també han estat descrits dos gens *Nramp*. El *NRAMP1*, localitzat al cromosoma 2 regió q35 (Cellier *et al.*, 1994; Blackwell *et al.*, 1995), a diferència del de ratolí, s'expressa en totes les línies hematopoiètiques, però majoritàriament en leucòcits polimorfonuclears i macròfags durant la seva maduració (Kishi & Nobumoto, 1995; Cellier *et al.*, 1997; Yoshida & Kishi, 1997). El gen *NRAMP2*, amb la localització cromosòmica 12q13, s'expressa en tots el teixits analitzats igual que en el cas de ratolí (Vidal *et al.*, 1995a; Lee *et al.*, 1998).

En les diferents espècies domèstiques només s'ha descrit un gen *Nramp* fins al moment que ha estat caracteritzat en ovella (Pitel *et al.*, 1994; Bussmann *et al.*, 1998) amb la localització cromosòmica 2q41 (Pitel *et al.*, 1995), pollastre, localitzat al cromosoma 7 (Hu *et al.*, 1995), porc (Tuggle *et al.*, 1997) localitzat al cromosoma 15 (Sun *et al.*, 1998), vaca (Feng *et al.*, 1996), localitzat al cromosoma 2 (Barendze *et al.*, 1994) i cèrvol (Matthews & Crawford, 1998).

Tots aquests gens *Nramp* formen part d'una família més àmplia de gens que codifiquen per proteïnes de membrana d'espècies molt separades evolutivament (Cellier *et al.*, 1995). Els primers en identificar-se foren tres gens en plantes: 2 gens en *Oryza*

sativa i 1 en *Arabidopsis thaliana* *Oryza*, amb una identitat aminoacídica del 57%, 46% i 48% respectivament amb el Nramp1 de ratolí; el gen *malvolio* (*Malv*) en *Drosophila melanogaster*, amb un 54% d'identitat; i els gens *SMF1* i *SMF2* en llevats, amb una identitat del 25% i 28% respectivament (Cellier *et al.*, 1995). A partir d'aquest moment molts d'altres gens, tant en eucariotes, com en procariotes, s'han anat incorporant a aquesta família (Taula1) amb un alt nivell de conservació concentrat bàsicament en els deu primers TMs, incloent les càrregues aminoacídiques dins d'ells, i en el motiu de transport, suggerint una funció comú d'aquestes proteïnes (Cellier *et al.*, 1995).

A mesura que s'ha anat coneixent la funció d'aquestes proteïnes tant conservades al llarg de l'evolució, i mitjançant estudis de complementarietat en models d'organismes vius, s'ha vist que aquesta similitud estructural es tradueix en una homologia funcional dins la família de gens *Nramp* (revisat per Gruenheid & Gros, 2000; Forbes & Gros, 2001). Així doncs, s'ha vist que l'expressió del gen *Nramp2* de ratolí en llevats mutants per als gens *SMF1/SMF2*, transportadors de cations divalents tals com Mn^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} i Co^{2+} , pot restaurar la capacitat d'aquests llevats de créixer en medis que contenen quel·lants metàl·lics o pH alcalins (Pinner *et al.*, 1997). De la mateixa manera, s'ha vist que una sobreexpressió del gen *NRAMP1* en *Drosophiles* mutants per al gen *malvolio* pot corregir el dèficit de Fe^{2+} i Mn^{2+} que produeix una alteració del tast (D'Souza *et al.*, 1999).

La demostració definitiva de que el gen *Nramp1* actua com un transportador d'ions divalents, com els seus homòlegs en altres espècies, s'ha fet mitjançant un estudi que permet monitoritzar el fluxe d'aquests ions en els fagosomes de macròfags vius *in situ* i en temps real (Jabado *et al.*, 2000). Aquest estudi suggereix que el Nramp1 actua com un transportador depenent de pH que pot treure ions divalents de l'espai intrafagosomal, d'una manera més eficient en el genotip *Nramp1* salvatge que en el

Taula 1. Família de gens *Nramp*. Ident.: % d'identitat amb la seqüència de la proteïna Nramp1 humana. MntH: Manganese transporter protein. *: submissió directa al GENBANK, sense publicar. Amb degradat de grisos s'agrupa als diferents ordres, separats també per una línia. Amb ordre creixent de colors tenim mamífers, aus, peixos, insectes, plantes, nemàtodes, bacteries, llevats i arquees.

Espècie	Gen	Ident.	Referència
<i>Homo sapiens</i>	<i>NRAMP1</i>	100	(Blackwell <i>et al.</i> , 1995; Cellier <i>et al.</i> , 1994)
<i>Homo sapiens</i>	<i>NRAMP2</i>	65	(Vidal <i>et al.</i> , 1995a)
<i>Equus caballus</i>	<i>Nramp1</i>	90	(Matiasovic & Horin, 2001)*
<i>Ovis aries</i>	<i>Nramp1</i>	88	(Bussmann <i>et al.</i> , 1998; Pitel <i>et al.</i> , 1994)
<i>Bos taurus</i>	<i>Nramp1</i>	88	(Feng <i>et al.</i> , 1996)
<i>Bison bison</i>	<i>Nramp1</i>	88	(Feng <i>et al.</i> , 1995)*
<i>Bubalus bubalis</i>	<i>Nramp1</i>	88	(Hashad <i>et al.</i> , 1995)*
<i>Cervus elaphus</i>	<i>Nramp1</i>	88	(Matthews & Crawford, 1998)
<i>Mus musculus</i>	<i>Nramp1</i>	87	(Vidal <i>et al.</i> , 1993)
	<i>Nramp2</i>	64	(Gruenheid <i>et al.</i> , 1995)
<i>Sus scrofa</i>	<i>Nramp1</i>	86	(Tuggle <i>et al.</i> , 1997)
<i>Macaca</i> ¹ <i>sp</i>	<i>Nramp2</i>	64	(Zhang <i>et al.</i> , 2000b)
<i>Rattus norvegicus</i>	<i>Nramp1</i>	88	(Ge <i>et al.</i> , 1996)
	<i>Nramp2</i>	64	(Gunshin <i>et al.</i> , 1997)
<i>Gallus gallus</i>	<i>Nramp1</i>	70	(Hu <i>et al.</i> , 1995)
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	<i>Nramp-a</i>	68	(Dorschner & Phillips, 1999)
	<i>Nramp-b</i>	66	(Dorschner & Phillips, 1999)
<i>Cyprinus carpio</i>	<i>Nramp</i>	65	(Saeij <i>et al.</i> , 1999)
<i>Pimephales promelas</i>	<i>Nramp</i>	64	(Dasmahapatra <i>et al.</i> , 1999)*
<i>Perca flavescens</i>	<i>Nramp</i>	66	(Dasmahapatra <i>et al.</i> , 1999)*
<i>Morone saxatilis</i>	<i>Nramp</i>	72	(Burge <i>et al.</i> , 2000)*
<i>Danio rerio</i>	<i>Nramp</i>	69	(Dasmahapatra <i>et al.</i> , 2000)*
<i>Pagrus major</i>	<i>Nramp</i>	80	(Miyata & Miyazaki, 2000)*
<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>malvolio</i>	59	(Rodrigues <i>et al.</i> , 1995)
<i>D. heteroneura</i>	<i>malvolio</i>	61	(Davis <i>et al.</i> , 1998)*
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Nramp1</i>	51	(Theologis <i>et al.</i> , 2000)
	<i>Nramp2</i>	47	(Theologis <i>et al.</i> , 2000)
	<i>Nramp3</i>	49	(Thomine & Schroeder, 1999)*
	<i>Ion transporter like protein</i>	45	(Bevan <i>et al.</i> , 1999)*

Espècie	Gen	Ident.	Referència
Oryza sativa	<i>OsNramp1</i>	50	(Belouchi et al., 1997)
	<i>OsNramp2</i>	50	(Belouchi et al., 1997)
	<i>OsNramp3</i>	39	(Belouchi et al., 1997)
Caenorhabditis elegans	<i>Folate like transporter 4</i>	51	(Wilcox, 1995)*
Mesorhizobium loti	<i>MntH</i>	40	(NCBI Microbial Genomes Annotation Project, 2001)
Staphylococcus aureus	<i>MntH</i>	35	(Kuroda et al., 2001)
Lactobacillus brevis	<i>MntH</i>	35	(Hayashi et al., 2001)
Pseudomonas aeruginosa	<i>MntH1</i>	35	(Kehres et al., 2000)
	<i>MntH2</i>	36	(Kehres et al., 2000)
Yersinia pestis	<i>MntH</i>	32	(Parkhill et al., 2001)
Salmonella typhimurium	<i>MntH</i>	33	(Kehres et al., 2000)
Deinococcus radiodurans	<i>MntH</i>	30	(White et al., 1999)
Bacillus subtilis	<i>MntH</i>	31	(Kunst et al., 1997)
Escherichia coli	<i>Putativ.tran sp. Syst.permease</i>	31	(Perna et al., 2001)
	<i>High affinity MntH</i>	31	(Makino et al., 1999)
Xylella fastidiosa	<i>MntH</i>	36	(Simpson et al., 2000)
Clostridium acetobutylicum	<i>MntA</i>	28	(Nolling et al., 2001)
Mycobacterium tuberculosis	<i>Mramp</i>	29	(Cole et al., 1998)
M. bovis	<i>Bramp</i>	29	(Agranoff, 1998)*
M. leprae	<i>MntH</i>	29	(Cole et al., 2001)
	<i>SMF2</i>	28	(Smith, 1994)*
Burkholderia cepacia	<i>MntH</i>	39	(Kehres et al., 2000)

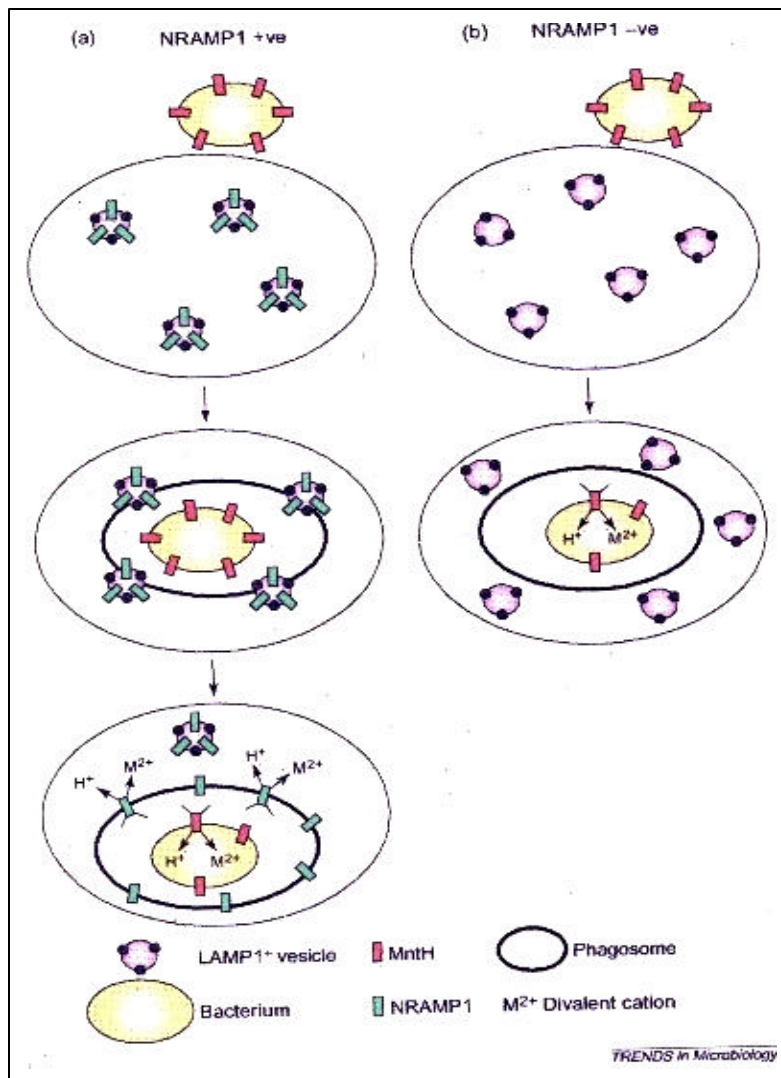
Espècie	Gen	Ident.	Referència
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>MntH</i>	35	(Hinkle <i>et al.</i> , 2001)*
<i>Streptomyces coelicolor</i>	<i>Putativ. metal ion transp. prot.</i>	23	(Redenbach <i>et al.</i> , 1996)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>SMF1</i>	29	(Lafuente <i>et al.</i> , 1996)
	<i>SMF2</i>	31	(Goffeau <i>et al.</i> , 1996)
	<i>SMF3</i>	30	(Goffeau <i>et al.</i> , 1996)
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	<i>Nramp Mn transporter</i>	31	(Harris <i>et al.</i> , 1996)*
<i>Neurospora crassa</i>	<i>ESP1</i>	25	(Schulte <i>et al.</i> , 2000)*
<i>Thermoplasma volcanium</i>	<i>Mn transporter</i>	24	(Kawashima <i>et al.</i> , 1999)
<i>Thermoplasma acidophilum</i>	<i>Mn transporter</i>	22	(Ruepp <i>et al.</i> , 2000)
<i>Sulfolobus sulfatanicus</i>	<i>Mn transporter</i>	23	(NCBI Microbial Genomes Annotation Project, 2001)

Nramp1^{-/-}. Els ions divalents atribuïts com a substracte del gen *Nramp1* són fins al moment Mn^{2+} , Zn^{2+} i Fe^{2+} (Atkinson & Barton, 1998; Blackwell *et al.*, 2000; Jabado, *et al.*, 2000; Biggs *et al.*, 2001). La gran quantitat de funcions cel·lulars que requereixen d'ions divalents com a cofactors podria explicar els múltiples efectes pleiotròpics que s'han atribuït al gen *Nramp1* i alhora ajudar a entendre el seu complex paper en la susceptibilitat a malalties tant infeccioses com autoimmunes (Blackwell *et al.*, 2000).

El fet que s'hagin detectat homòlegs *Nramp* en bacteries directament afectades pel *Nramp1* de l'hoste, com és el cas del *Nramp* de *Mycobacterium tuberculosis*, quelant d'ions divalents sota ambients àcids (Agranoff *et al.*, 1999), reforça la hipòtesi de que aquestes protínes treballen a l'espai intrafagosomal sobre el mateix substracte d'una manera pH-depenent però en sentits oposats (Figura 4) (Forbes & Gros, 2001).

Figura 4. Transport d'ions divalents per les proteïnes Nramp en la interfase d'interacció hoste-patogen (Forbes & Gros, 2001).

(a) Als macròfags *Nramp1*-positius, les bactèries invasores són fagocitades inicialment en un fagosoma que deriva de la membrana plasmàtica. Els lisosomes/darrers endosomes, que són positius al marcador LAMP-1 i que contenen la proteïna Nramp1, es fusionen amb aquests fagosomes, passant a ser fagolisosomes madurs, acídics i amb plena activitat bacteriostàtica i bactericida. Dins el fagolisosoma, les proteïnes Nramp, tant de l'hoste, com del patògen, funcionaran d'una manera depenent del pH, però en sentit oposat, competint per l'obtenció d'ions metàl·lics essencials. Limitant la quantitat d'ions divalents disponibles per la bactèria, el Nramp1 restringeix la possibilitat de replicació del patogen i la capacitat d'expressar determinants patogènics associats a la inhibició de la maduració del fagosoma i/o a la producció d'enzims detoxificants depenents d'ions divalents.



(b) En absència del Nramp1, la bactèria de l'interior dels fagosomes és capaç d'inhibir la fusió amb els lisosomes/darrers endosomes, deixant el fagosoma immadur i amb poca activitat bactericida. El mecanisme pel qual la bactèria pot inhibir la fusió del fagolisosoma i el paper del Nramp1 en aquest procés encara no és conegut.

Així doncs, tant els substractes metàl·lics, com les proteïnes transportadores jugarien un paper fonamental en la virulència dels microorganismes i en la defensa de l'hoste (Forbes & Gros, 2001).

2.4. El gen *Nramp1* com a candidat de la resistència/susceptibilitat a diferents patologies infeccioses i autoimmunes.

D'ençà de la caracterització del gen *NRAMP1* humà (Cellier *et al.*, 1994) i de la identificació dels seus polimorfismes (Liu *et al.*, 1995) són nombrosos els treballs d'associació duts a terme, amb més o menys èxit, amb malalties causades per micobacteris, d'alt impacte en la salut pública mundial, com són la lepra (causada pel *Mycobacterium lepraemurium*) i la tuberculosi (causada pel *Mycobacterium tuberculosis*).

Un anàlisi de lligament (*sib-pair linkage analysis*) fet amb 168 membres de 16 famílies vietnamites i 4 xineses on, com a mínim, dos germans estaven afectats per la lepra, i analitzant sis polimorfismes dins el gen *NRAMP1* (haplotip intragènic) i 4 més localitzats en les immediateses del gen (haplotip extès), demostra que hi ha una forta associació amb la susceptibilitat a la lepra, en tots dos haplotips analitzats, en les famílies vietnamites ($p < 0.02$ –haplotip extès- i $p < 0.06$ –haplotip intragènic-), concloent que la susceptibilitat a patir la lepra està associada al gen *NRAMP1* (Abel *et al.*, 1998). D'igual manera, tant estudis d'associació afectats *versus* controls, com anàlisis de lligament en extensos pedigrís, han demostrat associació entre susceptibilitat a la tuberculosi i el gen *NRAMP1*. En un primer estudi, on s'analitzaren quatre polimorfismes del gen *NRAMP1* en 410 adults afectats de tuberculosi pulmonar i 417 controls sans, es trobà associació de tots quatre polimorfismes amb la tuberculosi, essent els genotips heterozigots pels polimorfismes localitzats en l'intró 4 i en la zona 3' UTR del gen els més sobrerrepresentats en els individus afectats (*odds ratio*, 4.07)

(Bellamy *et al.*, 1998). Aquests resultats han estat confirmats posteriorment en un anàlisi de lligament dut a terme en 160 individus de 44 famílies de Guinea-Conakry, on s'ha trobat una forta associació del mateix polimorfisme intrònic i la tuberculosi ($p=0.036$) (Cervino *et al.*, 2000). Un altre anàlisi de lligament dut a terme durant una epidèmia de tuberculosi en una comunitat d'aborígenes canadencs durant 1987-89, demostra lligament entre susceptibilitat a la tuberculosi i un marcador molt proper al gen *NRAMP1*, així com d'un haplotip de 10 polimorfismes dintre del gen, amb un *LOD score* màxim de 3.81 i 2.68 respectivament (Greenwood *et al.*, 2000).

D'altra banda, un anàlisi de lligament realitzat en 72 famílies (389 individus) que patien lepra, 98 famílies (731 individus) que patien tuberculosi i 89 famílies (638 individus) que patien leishmaniosi visceral, del nord-est del Brasil, no dona, en cap de les patologies, associació significativa amb el gen *NRAMP1*, tot i que un estudi de segregació recolza la hipòtesi d'un model d'un gen major dominant en comptes d'un model poligènic, multifactorial o d'un gen recessiu, en el cas del control de la leishmaniosi visceral per a aquestes famílies (Blackwell, 1998; Blackwell *et al.*, 1997). Cap altre estudi s'ha realitzat en el cas de la leishmaniosi.

Al 1995, amb la seqüenciació completa de la regió promotora del *NRAMP1* humà, s'identifica una zona polimòrfica que forma repeticions de dinucleòtids, amb la identificació de 4 al·lels diferents (Blackwell *et al.*, 1995). Posteriorment, mitjançant construccions que incorporen el promotor del *NRAMP1* amb els diferents al·lels per a aquest microsatèl·lit a un vector que inclou el gen de la luciferassa, i després de realitzar transfeccions transitòries, es demostra que aquest microsatèl·lit té l'habilitat per dirigir l'expressió del gen (Searle & Blackwell, 1999). Sense la presència d'estímul exògen, els al·lels 1, 2 i 4 són promotors dèbils, mentre que l'al·lel 3 genera una forta expressió del gen. L'estimulació amb LPS bacterià no té efecte sobre els al·lels 1 i 4, mentre que provoca una reducció de l'expressió en l'al·lel 2 i un fort

augment en l'al·lel 3. Això demostra que una hiperactivació dels macròfags associada a l'al·lel 3 està funcionalment lligada a una susceptibilitat a malalties autoimmunes, però a una protecció en vers malalties de tipus infeccioses, mentre que la dèbil expressió promoguda per l'al·lel 2 contribueix a la susceptibilitat a malalties infeccioses, però protegeix vers malalties autoimmunes. És per això que se suposa que tots dos al·lells és mantenen segregant en una població.

Aquests treballs van obrir les portes a un gran ventall d'estudis d'associació d'aquest polimorfisme de la regió promotora amb malalties autoimmunes, com és el cas de l'enfermetat de Crohn's (Hofmeister *et al.*, 1997) o l'artritis reumatoide (Shaw *et al.*, 1997). Posteriorment, Graham i col·laboradors identifiquen dos nous al·lells, anomenats 5 i 6, realitzant PCR-RFLP de la regió que inclou el microsatèl·lit i descobreixen que l'al·lel 5 i el 3 tenen el mateix tamany però diferent patró de restricció per una diferent distribució de les repeticions de dinucleòtids afirmant que, fins al moment, l'al·lel 5 ha estat enmascarat per l'al·lel 3 (Graham *et al.*, 2000). En aquest mateix treball troben associació entre aquest nou al·lel 5 i la cirrosi primària biliar. Un estudi posterior de casos-controls confirma l'associació d'aquest nou al·lel amb la susceptibilitat a patir malalties autoimmunes, en aquest cas l'esclerosi múltiple (Kotze *et al.*, 2001). Un estudi posterior de casos-controls realitzat en poblacions espanyoles però, no troba associació entre quatre polimorfismes del gen *NRAMP1* i l'esclerosi múltiple (Comabella *et al.*, 2002). Tot i que un dels polimorfismes analitzats és el microsatèl·lit de la regió promotora, aquest es va fer per tamany i no per PCR-RFLP, impedit l'anàlisi de l'al·lel 5 prèviament associat amb la susceptibilitat a patir aquesta malaltia.

Donat els efectes pleiotròpics del gen *NRAMP1* i les múltiples associacions a diferents malalties infeccioses i autoimmunes que se li atribueixen, la recerca del seu possible paper en diferents patologies no s'ha aturat. És així doncs com s'ha trobat que aquest

gen modifica el risc a patir la infecció pel virus de la SIDA (Marquet *et al.*, 1999), on la línia cel·lular monòcits/macròfags juga un paper molt important, i, molt recentment, s'ha descobert que, al igual que en el cas de la *Drosophila*, en ratolins aquest gen s'expressa en neurones influenciant la resposta neuronal a l'estrès (Evans *et al.*, 2001). Aquest últim descobriment obre les portes a un possible paper del gen *Nramp1* en el control de l'homeostasi cerebral, amb les implicacions patològiques que això pot tenir.

En el cas de les espècies domèstiques els treballs d'associació no han estat, ni de bon troç, tant abundants:

Al 1997, Hu i col·laboradors identifiquen 11 polimorfismes en el gen *Nramp1* de pollastre, 10 canvis nucleotídics conservatius i un canvi nucleotídic (G696A) no conservatiu, que provoca un canvi d'aminoàcid (Arg223Gln), en el TM5-6, només identificat en línies de pollastre susceptibles a *Salmonella typhimurium* i mai en línies resistents (Hu *et al.*, 1997).

En boví, de manera similar a l'home, s'ha identificat un microsatèl·lit polimòrfic a la regió 3' UTR del gen *Nramp1* (Horín *et al.*, 1999), que, mitjançant estudis d'expressió *in vitro*, s'ha vist que afecta l'expressió del gen controlant la replicació de *Brucella abortus*, però no de *Salmonella enterica* serovar Dublin (Barthel *et al.*, 2001). Aquest microsatèl·lit ha estat evaluat en un estudi en 33 vaques d'uns ramats de Texas i Mèxic, positives al test intradèrmic de la tuberculina, que han estat classificades: com a resistents a la tuberculosi (9 animals, cap lesió *postmortem* i resultats negatius al cultiu de *Mycobacterium bovis*, l'agent causal) i com a susceptibles (24 animals, presència de lesions i cultiu positiu). No s'ha trobat cap tipus d'associació, concloent que el gen *Nramp1* no determina la diferent resistència o susceptibilitat a la infecció per *M. bovis* (Barthel *et al.*, 2000). Resultats similars s'han obtingut en el cèrvol, en un estudi on s'ha evaluat el component genètic en la resistència a la infecció per *Mycobacterium bovis* (Mackintosh *et al.*, 2000). Després d'escollir 6 reproductors per

la seva diferent resistència a *M. bovis*, d'un total de 42 infectats experimentalment, i un cop analitzats 70 descendents, conclouen que l'heretabilitat estimada de la resistència a la infecció és d'un 0.48 ($p < 0.01$), però no troben cap associació entre aquesta i el microsatèl·lit polimòrfic de la regió 3' UTR del gen *Nramp1* del cèrvol.

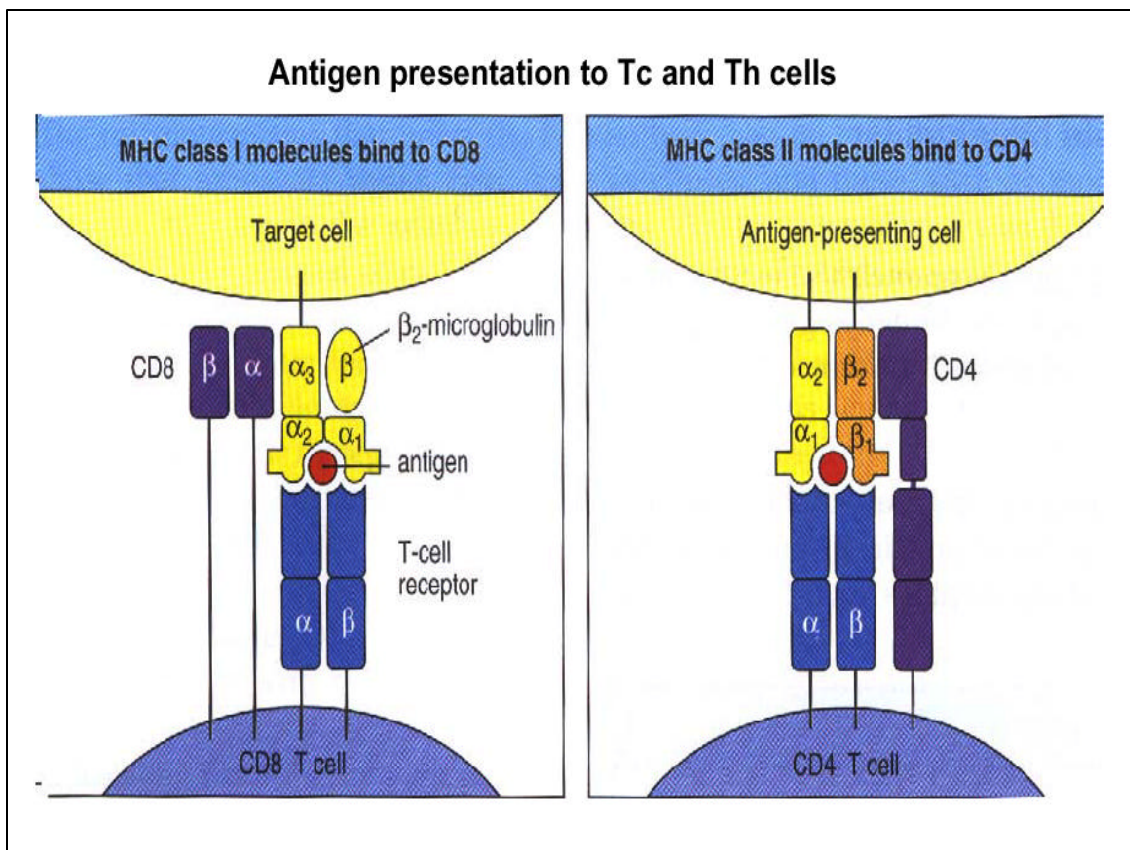
2.5. Altres possibles gens candidats de resistència o susceptibilitat a la leishmaniosi.

El complex principal d'histocompatibilitat és un cluster de gens que codifiquen per glicoproteïnes de superfície que interaccionen amb diferents receptors de cèl·lules T (Figura 5). Les molècules de classe I presenten antígens endògens pel seu reconeixement a limfòcits T citotòxics CD8+ que lisen la cèl·lula diana. Les molècules de classe II presenten antígens exògens als limfòcits col·laboradors (Th) CD4+ que poden cooperar amb els limfòcits B per induir la producció d'anticossos i alliberar citocines que ajuden als macròfags en el procés de destrucció dels microorganismes intracel·lulars. Les cèl·lules Th, a part del reconeixement antigènic, requereixen ser estimulades per altres molècules de superfície de les cèl·lules presentadores d'antigen (APC), així com per proteïnes solubles secretades per aquestes, les més importants IL-1 i IL-12. Així doncs, en funció de les citocines presents en l'ambient les cèl·lules Th derivaran cap a Th1 o Th2 provocant una diferent resposta immunitària. Mentre que les cèl·lules Th1 secreten IL-2 i IFN- γ provocant una resposta cel·lular que consisteix en l'activació de les cèl·lules T citotòxiques i dels macròfags i la producció d'algunes IgGs, les cèl·lules Th2 secreten una mescla de citocines, que comprenen la IL-4, IL-5 i IL-10, provocant una resposta immunitària humoral caracteritzada per una gran producció d'anticossos.

Coneixent la importància de la diferent resposta immunitària desencadenada per l'hoste en la resistència o susceptibilitat a la leishmaniosi, no és d'extranyar que s'hagi

trobat associació de les molècules del MHC en la diferent resposta immunitària adquirida o específica que mostra l'hoste vers el paràsit, no només en ratolí, sinó també en l'home (Blackwell, 1982; Blackwell *et al.*, 1997; 1980; DeTolla *et al.*, 1980; Singh *et al.*, 1997).

Figura 5. Esquema de les molècules de classe I i classe II del MHC.
(www.bio.sdsu.edu/pub/tsoukas/Bio485Lectures/MHC.pdf)



Les molècules de classe II del MHC són heterodimèriques, és a dir, estan formades per la unió no covalent de dues cadenes, α i β , codificades per diferents gens (Figura 5). Cadascuna d'aquestes cadenes està formada per dos dominis extracel·lulars (α_1 , α_2 i β_1 , β_2). La major part del polimorfisme d'aquestes molècules està localitzat en els dominis amino terminals (α_1 i β_1) i agrupat en regions hipervariables (HVRs) en la zona

d'unió a l'antigen, donant lloc a la unió de diferents pèptids antigènics en funció del tipus de molècula de classe II present (Brown *et al.*, 1993).

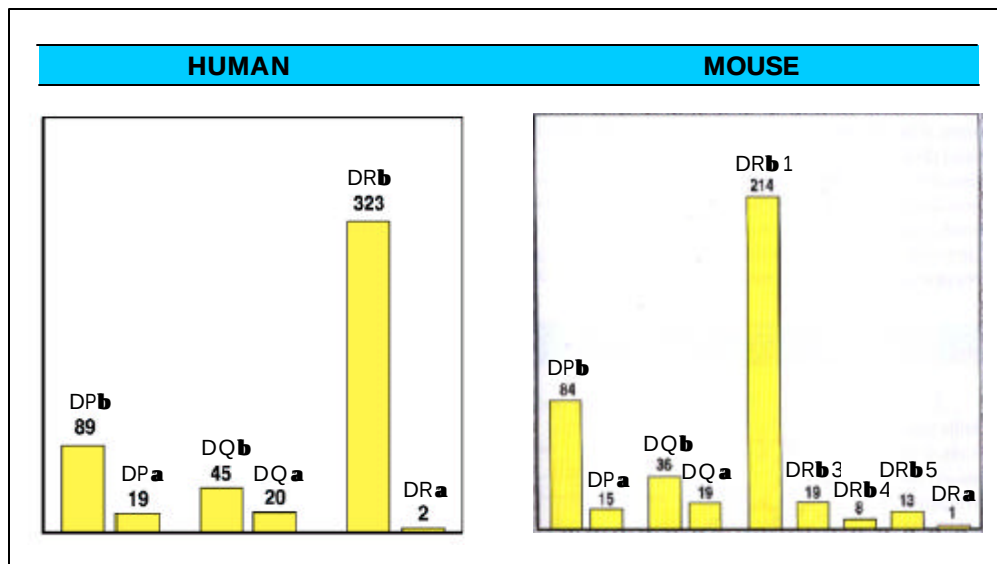
El MHC del gos, també anomenat DLA (de *Dog Leukocyte Antigen*) està situat al cromosoma 12 (Dutra *et al.*, 1996; Mellersh *et al.*, 2000) i va ser prèviament caracteritzat a nivell cel·lular, serològic i immunoquímic (Deeg *et al.*, 1986; Bull *et al.*, 1987) i el seu polimorfisme analitzat mitjançant hibridació amb sondes humanes (Sarmiento & Storb, 1988a; 1988b). La primera caracterització genètica d'una molècula de classe II no va ser fins al 1990, quan Sarmiento i col·laboradors varen descriure el cDNA del gen *DRB1* caní i nou variants al·lèliques (Sarmiento *et al.*, 1990; Sarmiento & Storb, 1990). Posteriorment es varen identificar els gens *DQA1* i *DQB1* amb quatre variants al·lèliques cadascun (Sarmiento *et al.*, 1992; Sarmiento *et al.*, 1993). El gen *DRA*, caracteritzat posteriorment, sembla ser monomòrfic (Wagner *et al.*, 1995).

A partir d'aquest moment, tots els esforços aniran dirigits a analitzar el polimorfisme present en aquests loci, així com en trobar un sistema de genotipat senzill i fiable capaç de detectar, no tant sols tots els al·lells descrits fins al moment, sinó també els nous al·lells que vagin sorgint, que s'espera que siguin molts tenint en compte l'elevat nivell de polimorfisme descrit en altres espècies on ha estat més estudiat, com és, per exemple, el cas de l'home o del ratolí (Figura 6).

L'anàlisi del polimorfisme es fa inicialment per seqüenciació. Apareixen uns quants treballs que analitzen les regions DR i DQ i on es descriuen nous al·lells per aquests loci i dos pseudogens (*DRB2* i *DQB2*) (Polvi *et al.*, 1997; Wagner *et al.*, 1996b; 1996c; 1996d; Wagner *et al.*, 1998a). Amb l'aparició continuada de nous al·lells però, i donat l'alt grau de polimorfisme que presenten, sobretot els gens *DRB* i *DQB*, dificultant la seqüenciació directe de fragments de PCR, cada cop es fa més necessari trobar un sistema de genotipat. En aquest sentit hi ha un seguit de treballs que plantegen diferents estratègies. La primera es basa en l'anàlisi de dos microsatèlits altament

polimòrfics, un situat en la regió de classe I prop del gen *DLA-53*, i l'altre en la regió de classe II, prop del pseudogen *DLA-DRB2* (Wagner *et al.*, 1996a).

Figura 6. Polimorfisme descrit en les molècules de classe II de l'home i del ratolí (mcdb.colorado.edu/courses/4300/Lect_15_slides.pdf) / (www.bio.sdsu.edu/pub/tsoukas/Bio485Lectures/MHC.pdf)



El problema d'aquest sistema és que aquests marcadors permeten estudiar l'herència dels diferents haplotips dins de famílies, però no permeten genotipar animals no relacionats, ja que no identifiquen els genotips de cadascun dels loci. Pel cas concret del gen *DRB1* es va descriure un sistema de genotipat basat en l'amplificació per PCR del segon exó del gen, que inclou els tres HVRs, i una posterior digestió amb diferents enzims de restricció (PCR-RFLP) donant un patró diferent per cadascun dels al·lels (Francino *et al.*, 1997). Aquest sistema identifica tots els al·lels descrits fins al moment i és capaç de detectar nous al·lels, però tan sols aquells que impliquin canvis en les dianes de restricció dels enzims utilitzats. Altres sistemes de genotipat descrits, majoritàriament per al locus *DRB1*, que és el més polimòrfic, utilitzen tècniques de laboratori no gaire senzilles per a la seva utilització rutinària. Així

trobem un sistema basat en l'amplificació per PCR de l'exó 2 i el seu anàlisi posterior per la tècnica de SSCP (de *single strand conformation polymorphism*) basada en la diferent conformació que adquireixen els fragments de PCR desnaturalitzats, depenent de la seva seqüència, en un gel electroforètic no desnaturalitzant (Hedrick *et al.*, 2000; Wagner *et al.*, 1998b), un sistema basat en l'amplificació per PCR de l'exó 2 i la seva posterior hibridació amb sondes específiques de gos (SSOP, de *sequence-specific oligonucleotide probes*) incapaç però de detectar tots els al·lels (Kennedy *et al.*, 1999), o un sistema basat en la realització d'una PCR al·lel específica amb primers específics que permetin fer una assignació d'al·lels (http://www.compapp.dcu.ie/~vetseq.ca4/funspec_main.html). Recentment, i donat l'alt nombre d'al·lels descrits fins al moment, ha sorgit un sistema de genotipat (SBT, de *sequence based typing*) que es basa en la seqüenciació directa de PCR de l'exó 2 dels gens *DRB1*, *DQA1* i *DQB1* i l'assignació automàtica d'al·lels mitjançant un software específic (Kennedy *et al.*, 2001). En l'actualitat hi ha 16 al·lels descrits per al gen *DQA1*, 36 per al gen *DQB1* i 52 per al gen *DRB1* incloent el gos i altres cànids salvatges (www.pcweb.liv.ac.uk/ALANRAD/Mirg/MIRGhome.html).

En gos no s'ha realitzat cap estudi d'associació que relacioni les molècules del MHC amb infeccions parasitàries, d'altra banda, tant les molècules de classe II, com totes les citocines i receptors que intervenen en la resposta immunitària posterior, semblen, per la seva funció, òptims gens candidats de resistència o susceptibilitat a la leishmaniosi. En un estudi recent realitzat en humana però, on s'han analitzat 156 pacients de leishmaniosi visceral causada per *L. infantum* i 154 controls infectats asimptomàtics, no s'ha trobat associació significativa entre les molècules de classe II, *DRB1* i *DQB1*, ni amb les de classe III que inclouen la citocina $TNF\alpha$ i $TNF\beta$ (Meddeb-Garnaoui *et al.*, 2001).

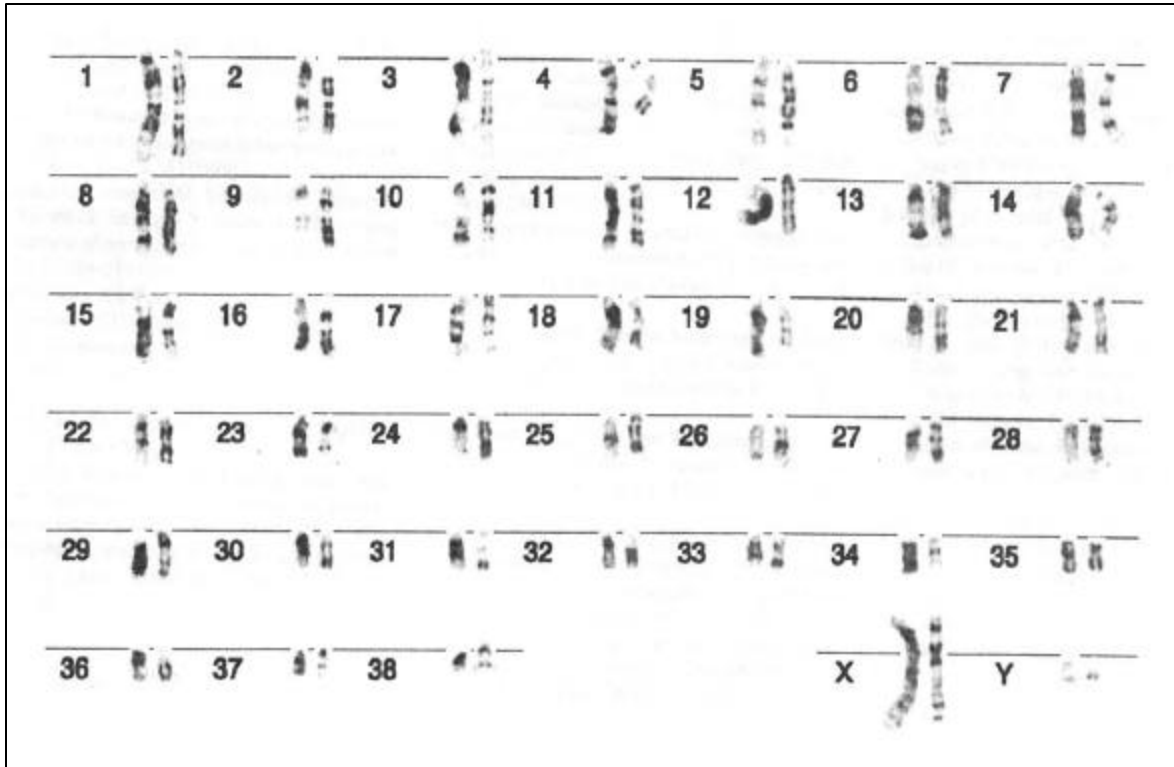
3. La necessitat de famílies de referència

Per investigar les bases genètiques d'una determinada patologia es poden utilitzar bàsicament dues estratègies. La primera consistiria en una recerca generalitzada de tot el genoma, mitjançant l'anàlisi de marcadors, per tal de cercar zones candidates d'incloure els gens que hi poden estar involucrats, és l'anomenat anàlisi de lligament. La segona, anomenada de gens candidats, consistiria en aprofitar els coneixements ja existents d'associació entre el fenotip que ens interessa i un o més gens ja localitzats en altres espècies, on l'estudi genètic està més avançat, com podrien ser el ratolí o l'home (Gaudenz, 1999).

La primera aproximació, utilitzada normalment quan no es coneixen gens candidats, requereix una família de referència on estigui segregant la malaltia i un mapa genètic de l'espècie prou dens de marcadors com per ser representatiu de tot el genoma (Gaudenz, 1999). Aquest darrer punt, en el cas del gos, és el més complicat, ja que fins fa molt poc no existia un mapa genètic que abarqués tots els cromosomes (Breen *et al.*, 2001). La dificultat radica en el complex cariotip caní. Com es pot veure en la figura 7, el cariotip del gos consta de 38 parells d'autosomes acrocèntrics i amb una gradual disminució de tamany i dos cromosomes sexuals. Degut a la seva similaritat en el tamany i en el patró de bandes obtingut per les tècniques convencionals, s'ha hagut de recórrer a tècniques moleculars de citogenètica com és la hibridació fluorescent *in situ* (FISH) per poder discernir inequívocament cadascun dels cromosomes (revisat per Reimann *et al.*, 1999). Així doncs, en un primer moment, els esforços per a la realització del mapa genètic del gos consistiren en la realització de mapes de lligament (Lingaas *et al.*, 1997; Mellersh *et al.*, 1997; Neff *et al.*, 1999; Werner *et al.*, 1999) i mapes realitzats mitjançant un panell de cèl·lules híbrides de gos i ratolí (Langston *et*

al., 1997), els anomenats *Radiation Hybrid (RH) Maps* (Mellersh et al., 2000; Priat et al., 1998).

Figura 7. Cariotip caní (Reimann et al., 1996).



Paral·lelament, s'anaren fent molts esforços en desenvolupar un panell de marcadors específics de cada cromosoma que permetessin posicionar aquests grups de lligament físicament (Breen et al., 1999a), arribant al primer mapa integrat, que amb un total de 1800 marcadors ha assignat, al llarg de tots els cromosomes del gos, 72 grups RH i 39 grups de lligament, cobrint més d'un 90% de tot el genoma (Breen et al., 2001). Del total dels 1800 marcadors, n'hi ha 320 de tipus I i la resta són de tipus microsatèl·lit. En la figura 8 es pot veure un exemple del mapa integrat per a un dels cromosomes. Els polimorfismes nucleotídics senzills (SNPs, de *Single Nucleotide Polymorphism*) són mutacions puntuals d'un sol nucleòtid, molt abundants i àmpliament distribuïdes per

tot els genomes. L'existència de noves tecnologies que permeten la detecció de polimorfismes faciliten el seu anàlisi en un gran nombre, fent que s'estiguin utilitzant recentment com a marcadors per a realitzar anàlisis de lligament i estudis d'associació. L'incipient estat del mapa genètic del gos però, fa que encara no estigui posicionat cap SNP en el recent mapa genètic d'aquesta espècie (www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP).

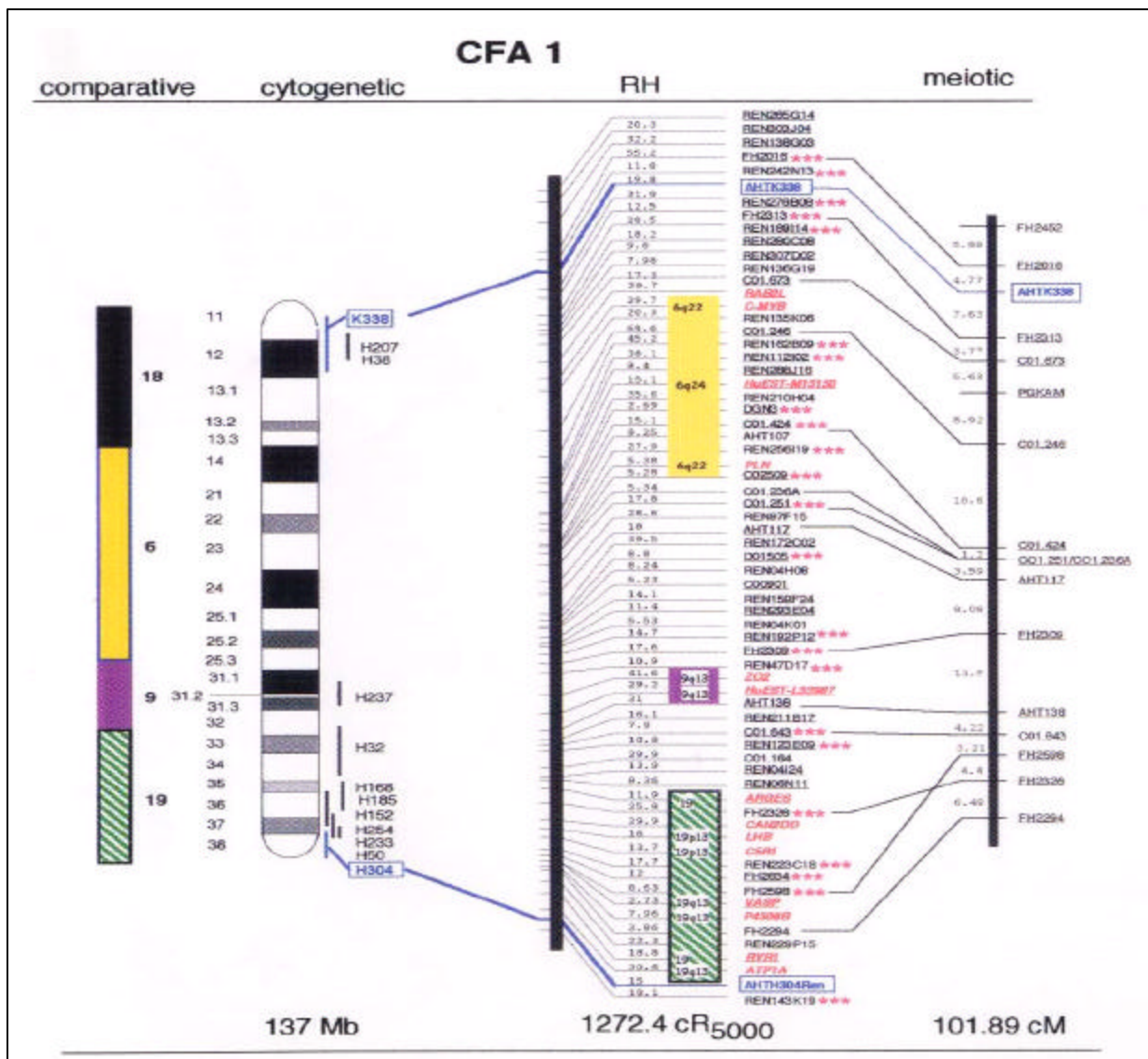
L'aproximació de gens candidats ha estat àmpliament utilitzada en malalties infeccioses, principalment en l'home, per la relativa facilitat d'identificar gens de susceptibilitat en línies consanguínies de ratolí mitjançant la tècnica, anteriorment esmentada, d'anàlisi de lligament (Hill, 1998). Així doncs, el tipus d'estudi més popular consisteix en la comparació de les freqüències dels al·lels d'aquests gens candidats, identificats prèviament en ratolí, entre casos clínics i individus control (Hill, 1998). Si un determinat al·lel del gen, o d'un marcador estretament lligat a ell, està associat amb la malaltia que estem estudiant la seva freqüència no serà aleatòria, sinó que serà significativament més alta o més baixa en els pacients *versus* els controls. Aquest tipus d'estudi es pot realitzar en individus no relacionats entre si, però depenent del mostreig que es realitzi poden existir artefactes en els resultats, sobretot si els individus estan dividits en subpoblacions (Abel & Dessein, 1998). Per tal d'augmentar el poder de l'anàlisi s'han desenvolupat estudis d'associació basats en famílies, com és el cas del test de transmissió desequilibrada (TDT) o el mètode de germans complets (*sib-pair analysis*) (Abel & Dessein, 1998). El TDT consisteix en agafar dos parentals amb un descendent afectat per la malaltia. Els al·lels parentals no transmesos al descendent afectat seran els utilitzats de control. En el mètode de germans complets el que es compara és si els germans afectats comparteixen més al·lels parentals que els esperats sota una segregació aleatòria. Aquests mètodes estan considerats molt sòlids i són molt recomanats quan poca cosa es coneix de la relació

existent entre el fenotip a estudi i el possible gen candidat analitzat (Abel & Dessein, 1997).

Sigui quina sigui l'aproximació utilitzada per l'estudi de les bases genètiques d'una determinada patologia, queda ben palesa la necessitat de famílies de referència. Per tal de tenir famílies de referència fiables però, s'ha de recórrer a tècniques moleculars que permetin tenir un control inequívoc de les paternitats. Els microsatèl·lits, repeticions en tàndem de 2 a 5 nucleòtids que estan àmpliament distribuïts pels genomes de tots els eucariotes (Tautz & Renz, 1984), són les eines moleculars utilitzades per realitzar aquest tipus de proves, degut al seu alt nivell de polimorfisme i a la seva facilitat d'anàlisi al laboratori (Tautz, 1989; Jeffreys *et al.*, 1991; Hammond *et al.*, 1994). Els nivells de polimorfisme, mesurats tant per nivells d'heterozigositat o mitjançant l'índex de polimorfisme PIC (Polymorphism Information Content), exhibeixen uns nivells mitjos de 0.60 en diferents espècies (Bowcock *et al.*, 1994; Deka *et al.*, 1995; Vaiman *et al.*, 1994). En el cas del gos però, el nivell de polimorfisme d'aquests marcadors té una limitació intrínseca a l'espècie. Tot i que en el gos hi ha unes 320 races descrites a tot el món, amb una gran heterogeneïtat entre elles, hi ha una gran homogeneïtat dins de cadascuna de les races degut al manteniment dels estandars racials (Mellersh & Ostrander, 1997). Així doncs, sovint diferents línies d'una mateixa raça tenen ancestres comuns disminuint molt la variabilitat genètica intra-raça.

Fins al moment, s'han descrit un elevat nombre de microsatèl·lits en gos (Breen *et al.*, 2001; Francisco *et al.*, 1996; Holmes *et al.*, 1993; 1995; Mariat *et al.*, 1996; 1998; Mellersh *et al.*, 1994; Ostrander *et al.*, 1993; 1995; Thomas *et al.*, 1997), però l'anàlisi de la seva variabilitat genètica s'ha realitzat, principalment, en poblacions mixtes de

Figura 8. Mapa de lligament (meiòtic), RH map i mapa citogenètic integrat del cromosoma 1 del gos (Breen *et al.*, 2001). En la part inferior es mostra el tamany de cadascun dels mapes. Els marcadors subratllats es varen determinar utilitzant un LOD score >3. Els marcadors que tenen tres asteriscs són aquells amb un valor d'heterozigositat o PIC (*polymorphism information content*) >0.5. El mapa comparatiu mostra els segment cromosòmics conservats evolutivament amb els cromosomes humans segons un estudi realitzat per Breen i col·laboradors (Breen *et al.*, 1999b).



gossos. En poblacions de pura raça, on sempre s'analitzen animals no relacionats entre si, les dades de freqüències al·lèliques i poliformisme mostren una disminució de la

variabilitat genètica respecte les poblacions mixtes (Fredholm & Wintero, 1995; Morera *et al.*, 1999; Sutton *et al.*, 1998; Zajc *et al.*, 1997; Zajc & Sampson, 1999). El problema radica en la utilització d'aquests marcadors per analitzar famílies tancades, que poden provenir de pocs animals reproductors, ja que, fins al moment, no han estat testats per aquest tipus de necessitats, molt importants quan es vol treballar amb criadors per anar construint famílies de referència.

objectius

El treball de recerca aquí exposat està enmarcat dins un projecte internacional més ampli anomenat DOGMAP, que té com a objectiu la construcció d'un mapa genètic caní (<http://www.dogmap.ch>). En aquest projecte hi participen 42 laboratoris de 20 països diferents que col·laboren en les tasques d'identificació de microsatèl·lits i altres marcadors, formació de famílies de referència, estudi de patologies hereditàries i suport informàtic. El nostre objectiu global és ajudar en la recerca de gens candidats de resistència i susceptibilitat a la leishmaniosi canina. Per tal de poder dur a terme aquesta tasca, els nostres objectius concrets han estat els següents:

- ✓ Posar a punt un sistema d'identificació individual i control de paternitats en extenses famílies amb cert grau de consanguinitat.
- ✓ Identificar el gen *Nramp1* en el gos i realitzar la seva caracterització estructural.
- ✓ Identificar els polimorfismes del gen *Nramp1* i la seva possible implicació en la susceptibilitat a la leishmaniosi canina.
- ✓ Caracteritzar noves variants al·lèliques de les molècules de classe II del MHC caní.

D'acord amb aquests objectius s'han realitzat diversos treballs recollits entre l'apartat següent i l'annex 1. En el primer s'analitza el polimorfisme i freqüències al·lèliques de 10 microsatèl·lits en una família de 3 generacions formada per 360 gossos de raça Rottweiler amb un coeficient màxim de consanguinitat del 16% i es compara amb dos tipus de poblacions diferents de gossos: una formada per animals no relacionats de pura raça i una altra formada per individus no relacionats d'una barreja de races i creuaments. El segon treball identifica el gen *Nramp1* caní, concretament la zona on ha estat posicionada la mutació causant de la diferent resistència o susceptibilitat en ratolí, utilitzant un *primers* ortòlegs que permeten l'anàlisi d'aquesta regió en qualsevol mamífer com una primera aproximació a la recerca de mutacions. El

tercer treball presenta la caracterització estructural del gen *Nramp1* caní, així com el seu posicionament físic en el mapa genètic, i l'anàlisi de les seves variants de seqüència en 4 gossos infectats experimentalment amb *L. infantum*, dos dels quals estan classificats com a susceptibles i dos com a resistent en funció de la seva resposta immunitària. En aquest treball també es porta a terme un estudi de casos-controls per evidenciar la possible associació d'aquest gen amb la leishmaniosi canina. Per últim, el darrer treball mostra l'anàlisi del polimorfisme de les molècules de classe II del MHC caní, identificant nous al·lels per als gens *DRB1* i *DQB1*. En l'annex 1 es mostra un compendi del treball realitzat per diferents laboratoris on es recullen tots els al·lels descrits per al MHC caní i s'estandaritza la seva nomenclatura.

resultats

Microsatellite polymorphism in closely related dogs

Altet, L., Francino, O., and Sánchez, A.

2001

The Journal of Heredity **92**: 276-279

Brief Communication

Microsatellite Polymorphism in Closely Related Dogs

L. Altet, O. Francino, and A. Sánchez

From the Unitat de Genètica i Millora, Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Edifici V, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain.

Correspondence: Address correspondence to Laura Altet at the address above or e-mail: Laura.Altet@uab.es.

Abstract

The effectiveness of microsatellites in parentage testing and individual identification has been proven in many species, including dogs. However, the use of these markers has not been extended to control for pedigrees in large populations of closely related animals. We have analyzed polymorphism in a set of 10 microsatellites over three generations of 360 pedigree rottweilers. Results were compared with two pure-bred populations of unrelated animals and with one population constituted by unrelated dogs of mixed breeds to measure polymorphism variation. We optimized this set of microsatellites to be analyzed by a semiautomated capillary electrophoresis method after amplification in two multiplex polymerase chain reactions (PCRs). The mean polymorphism information content (PIC) value in the rottweiler pedigree is 0.401 and the combined paternity exclusion probability (CPE) is 95.6%. These values are similar to those obtained in pure-bred populations of unrelated animals, and although polymorphism is reduced in relation to the pool population, we solved all paternity exclusions. In only a few cases did we have to use two additional microsatellites to solve individual identification of full-sib dogs.

Introduction

Microsatellites have been proven as a useful tool in parentage testing and individual identification in many species, owing to their high levels of polymorphism ([Hammond et al. 1994](#); [Tautz 1989](#)). However, these levels of polymorphism have an intrinsic limitation when analyzing dogs. Although there are more than 300 different breeds described all over the world, there is high genetic homogeneity within each breed because they have been inbred to select for characteristic traits. Therefore different lines of the same breed often share common ancestors and this results in decreased genetic variability within those breeds.

Large numbers of microsatellites have been described in dogs to date ([Francisco et al. 1996](#); [Holmes et al. 1993, 1995](#); [Mellersh et al. 1994](#); [Ostrander et al. 1993, 1995](#); [Primmer and Mathews 1993](#); [Thomas et al. 1997](#)), however, genetic data has been pooled and analyzed mostly from mixed populations. In pure-bred populations, data about allele frequencies and polymorphism indexes are scarce ([Fredholm and Wintero 1995](#); [Koskinen and Bredbacka 1999](#); [Sutton et al. 1998](#); [Zajc et al. 1997](#); [Zajc and Sampson 1999](#)). In these pure breeds, where only unrelated animals have been analyzed, intrabreed variation is reduced in relation to pooled populations. Moreover, breeders who rely on dog parentage testing and individual identification commonly use a few selected animals to produce salable pups. This creates difficulties, since microsatellite polymorphism analysis has not been utilized to test for the paternity of closely related dogs. We have addressed this issue and present microsatellite polymorphism and allele frequencies in 360 pedigree rottweilers over the course of three generations. This population reached a maximum inbreeding coefficient of 16%. Our main purpose was to compare this microsatellite polymorphism with two different types of dog populations: one constituted of unrelated pure-bred animals with no common grandparents (golden retrievers and Labrador retrievers) and the other one constituted of 95 unrelated dogs of mixed breeds (pool population). In this way we are able to detect if microsatellite variability is substantially reduced in an inbred population where most of the animals share recent ancestors. These data are particularly relevant to dog breeders, which usually mate closely related individuals and consequently need to use accurate and sensitive parentage tests. Two multiplex PCR reactions were optimized for this set of microsatellites using a semiautomated fluorescent genotyping protocol.

Materials and Methods

Animal Material

The three generations of pedigree rottweilers originate from 47 crosses among 49 dogs used as breeding animals. Twenty-seven of these breeding animals share recent common ancestors (at least grandparents) and 18 of the 47 crosses are inbred. The whole pedigree belongs to a single breeder and we consider it as a related pure-bred population. The pure-bred populations of unrelated dogs are composed of animals that have been collected from different breeders and have no common grandparents: 33 golden retrievers and 23 Labrador retrievers. The pool of

95 unrelated dogs includes animals from 24 different breeds: Newfoundland, Spanish greyhound, Belgian tervueren, German shepherd, Belgian groenendael shepherd, dachshund, Siberian husky, poodle, Yorkshire terrier, giant schnauzer, West Highland white terrier, Spanish mastiff, Neapolitan mastiff, boxer, basset hound, English cocker spaniel, Dalmatian, fila brasileiro, bullmastiff, Lhasa apso, Irish wolfhound, beagle, rottweiler, and American Staffordshire terrier. Dog genomic DNA was isolated as described elsewhere ([Francino et al. 1997](#)).

Microsatellite Markers

A total of 10 unlinked markers have been studied ([Mellersh et al. 1997, 2000](#)), seven dinucleotide markers—CPH5 and CPH9 ([Fredholm and Wintero 1995](#)) and CXX 366, CXX410, CXX442, CXX459, and CXX474 ([Ostrander et al. 1995](#))—and three tetranucleotide markers—CXX2001, CXX2010, and CXX2054 ([Francisco et al. 1996](#)). We have used two more 4 bp microsatellites—CXX2130 and CXX2158 ([Francisco et al. 1996](#))—to solve the genetic identity in some cases of full sibs. These 10 microsatellites were amplified using two multiplex PCR reactions with five markers in each: multiplex-1 (CPH5, CXX366, CPH9, CXX474, and CXX459) and multiplex-2 (CXX2001, CXX2010, CXX2054, CXX410, and CXX442). The two multiplex reactions were carried out in 10 µl final reaction mixture containing PCR buffer (1x), 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM of each dNTP (PE Biosystems), and 30–40 ng of dog genomic DNA. Primer concentration was optimized for each marker: 0.2 µM for 4 bp markers, 0.3 µM for CPH5, CPH9, and CXX366 markers, and 0.4 µM for the other 2 bp markers. One primer from each pair was fluorescently labeled with 6-FAM, TET, or HEX. *Taq* polymerase (Life Technologies Inc.) was used at a final concentration of 0.075 U/µl and 0.1 U/µl in multiplex-1 and multiplex-2, respectively. Thermocycling conditions were 3 min at 94°C followed by 25 cycles of 94°C (30 s), 58°C for multiplex-1 and 55°C for multiplex-2 (30 s) and 72°C (30 s), followed by a final extension of 15 min at 72°C in an MJ Research Hot-Bonnet. The two additional microsatellites were used either together or were added to multiplex-1, using 0.4 µM of each primer.

PCR reactions were analyzed by capillary electrophoresis in an ABI 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, PE) and labeled PCR products were automatically sized relative to the internal standard (PRISM GENESCAN-350TM TAMRA) with the GeneScanTM Analysis 2.0 software.

Computation and Analysis

Allele frequencies and heterozygosity values were calculated with the Biosys-1 version 1.7 software package ([Swofford and Selander 1989](#)). The exclusion probability (PE) was calculated on the basis of the estimated allele frequencies ([Jamieson 1994](#)). Polymorphism information content (PIC) and PE values were calculated assuming that the genotypes of both parents were known ([Botstein et al. 1980; Jamieson 1994](#)). We compared the mean PIC values per population using the Student's *t* test with a significance level of 99.9% using the SAS package ([SAS Institute 1995](#)).

Results and Discussion

Microsatellite allele frequencies and PIC values tend generally to be described in populations of unrelated animals. We were interested in measuring how these PIC and PE values are reduced when analyzing inbred populations. In such populations where most of the animals share recent ancestors, 10 microsatellites might be considered insufficient in order to distinguish closely related animals. Indeed, [Sutton et al. \(1998\)](#) found it necessary to use two typing systems (DNA fingerprinting and microsatellites, or DNA fingerprinting alone) in order to elucidate such problems. In this study we have analyzed 10 microsatellite polymorphism in 360 pedigree rottweilers over three generations (R). Results were compared with two pure-bred populations of unrelated animals [golden retriever (G) and Labrador retriever (L)] and also with a pool of 95 dogs from 24 different breeds (P). Allele frequencies for each microsatellite are shown in [Table 1](#).

Table 1. Breed allele frequencies and polymorphism information content (PIC) for each locus

Locus	Alleles	P	G	L	R	Locus	Alleles	P	G	L	R
CXX366	160	.284	.371	.955	.014	CXX2010	226	.086	—	—	.568
	164	.519	.581	.023	—		230	.441	.048	.478	—
	166	.198	.048	.023	.986		234	.204	.532	.065	.203
							238	.231	.419	.457	.229
							242	.038	—	—	—
	PIC	.540	.427	.085	.027		PIC	.655	.438	.459	.519
CPH5	105	.011	—	—	—	CXX442	157	.167	.385	.133	—
	107	.368	.406	.239	.332		159	—	.019	—	—
	109	.142	—	—	.297		161	.139	—	.233	—
	111	.400	.594	.043	.226		163	.483	.558	.633	.985
	113	.068	—	.717	—		165	.100	.038	—	.015
	115	.011	—	—	.144		167	.083	—	—	—
							169	.028	—	—	—
	PIC	.621	.366	.366	.680		PIC	.669	.445	.468	.029
CPH9	133	.011	—	.217	—	CXX459	149	.022	—	—	—
	137	.394	.484	.348	.240		151	.250	.355	.227	—
	139	.005	—	—	—		153	.114	.323	.023	.569
	141	.005	—	—	—		155	.136	.226	.023	—
	145	.441	.516	.435	.760		157	.147	.032	.682	.424
	147	.059	—	—	—		159	.163	—	—	—
	149	.074	—	—	—		161	.163	.065	.045	.007
	151	.011	—	—	—		167	.005	—	—	—
	PIC	.574	.375	.567	.298		PIC	.808	.661	.430	.380
CXX474	107	.314	.015	—	.052	CXX2054	140	.005	—	—	—
	109	.016	—	—	—		144	.102	.076	.109	.003
	111	.197	.652	.174	.120		148	.027	—	—	—
	113	.080	—	.696	.391		150	.161	—	.587	.065
	115	.245	—	.065	—		154	.274	.136	.152	.835
	117	.059	—	—	—		158	.161	.045	.087	.006
	119	—	.167	.043	—		162	.065	.076	.022	—
	121	.090	.167	.022	.437		166	.113	.455	.043	—
							170	.038	.182	—	.030
							174	.054	.030	—	.060
							178	—	—	—	.001
	PIC	.753	.470	.443	.569		PIC	.822	.697	.578	.282
CXX2001	120	.005	.030	—	—	CXX410	93	.057	—	—	—
	124	.016	—	—	.001		97	.172	.078	.043	—
	128	.229	.045	.152	.389		102	—	—	—	.003
	132	.186	.167	—	—		105	.046	.078	.043	.261
	136	.027	—	—	—		108	.109	—	—	—
	140	.229	.424	.065	.200		110	.040	.406	.174	.486
	144	.154	.121	.609	.099		112	.190	.344	.652	—
	148	.090	.212	.087	.018		114	.034	.094	—	—
	150	—	—	.022	—		116	.259	—	.087	.004
	152	—	—	.022	—		118	.075	—	—	.246
	154	.016	—	—	—		122	.017	—	—	—
	156	.048	—	.022	.293						
	160	—	—	.022	—						
	PIC	.802	.692	.564	.662		PIC	.823	.645	.497	.566

P, pool; G, golden retriever; L, Labrador retriever; R, rottweiler.

It is interesting to note that the mean PIC value obtained for these 10 microsatellites in R show no significant differences with the pure-bred populations of unrelated dogs we have analyzed (G and L) (shown in [Table 2](#)). These PIC values are similar to the ones previously described analyzing 19 microsatellites in three populations of unrelated pure-bred dogs ([Zajc et al. 1997, 1999](#)). The sustained polymorphism in R may be explained in two ways. First, the breeding animals possessed a relatively high level of heterozygosity. Second, despite an inbreeding coefficient of 16% in some crosses and a number of backcrosses among the R pedigree progeny, the breeder used a sufficient number of breeding animals to maintain variability.

Table 2. Mean values for the polymorphism information content (PIC) and heterozygosities (H_o and H_e) and combined paternity exclusion probability (CPE) for each population

	H_o	H_e	PIC	CPE
Pool	.550 (.052)	.750 (.028)	.707 (.103)*	.999
Golden Retriever	.592 (.028)	.607 (.034)	.522 (.128)	.986
Labrador Retriever	.517 (.061)	.505 (.051)	.446 (.136)	.964
Rottweiler	.452 (.083)	.452 (.083)	.401 (.228)	.956

* $P < .01$.

The mean PIC value for P shows significant differences in relation to the pure breeds (G, L, and R). This population contains a higher level of genetic heterogeneity since it comprises 24 different breeds with some characteristic alleles within each marker that result in a mean PIC value of 0.70. Otherwise this value does not guarantee sustained polymorphism levels when a certain pure breed is analyzed. For example, in our pure-bred populations (G, L and R), the PIC values range from 0.03 to 0.69, with only 40% of the PIC values being higher than 0.5 for the same microsatellites. Moreover, although there are some breed-specific alleles, the major differences between purebred populations are the relative allele frequencies at each individual loci, as has previously been reported ([Fredholm and Wintero 1995; Zajc et al. 1997](#)). CXX366 has the same number of alleles in G and in R, but shows an enormous difference in the PIC values (0.34 and 0.05, respectively) due to the different distribution of allele frequencies. Therefore it is important to describe allele frequencies of microsatellites in a certain pure breed of dogs in order to select a useful set of markers for parentage control in that particular breed.

Microsatellite sequence is also an important consideration when choosing markers. Although greater instability has been described for tetranucleotide motifs, making them more polymorphic than dinucleotide repeats, we have not found any correlation between the repeat motif and the polymorphism level of these microsatellites. The most informative markers for each breed were CPH5 (2 bp) in the R population, CXX2054 (4 bp) in the G and L populations, and CXX410 (2 bp) in the P population. It has also been reported that longer repeats can generate alternatively sized alleles more frequently than shorter ones ([Francisco et al. 1996](#)). However, the longest microsatellite marker we analyzed (CXX2010) was not the most polymorphic one in any of our breeds. Furthermore, our results suggest that polymorphism levels in dogs depend on the specific pure breed in which a microsatellite has been studied.

Markers CXX2001, CXX2054 and CXX410 do not always follow the above 2 bp or 4 bp repeat motifs, perhaps because of some variation contained within the repeat, as has been previously described for sequenced tetranucleotide markers ([Francisco et al. 1996](#)). Alternatively it may be due to variability in the flanking regions of the repeats ([Grimaldi and Crouau-Roy 1997](#)). Similar results have been reported by [Sutton et al. \(1998\)](#) for 4 bp repeat microsatellites, with alleles separated by 2 bp or less.

In conclusion, this work has addressed and substantiated the use of microsatellites for parentage testing and individual identification in a large population of closely related dogs. Although microsatellite polymorphism is reduced in the rottweiler pedigree if compared to the mixed-breed population, it is similar to the populations composed of unrelated pure-bred dogs. Therefore 10 microsatellites, multiplexed in two different PCR reactions, were enough to solve all paternity exclusions. Only a limited number of cases required the use of two additional microsatellites to allow individual identification of full-sib dogs. We also demonstrate the existence of allele-specific patterns in the G, L, and R breeds. Taken together, our results suggest that microsatellite polymorphism data obtained from heterogeneous populations cannot always be extrapolated to specific breeds. This fact must be taken into account when implementing microsatellite-based assay for parentage cases, especially in closely related dogs.

Acknowledgments

We are thankful to the breeders Pere Pujals and Didier Schaer and to the Veterinary Clinic Hospital from the Universitat Autònoma de Barcelona for providing the samples used in this study. We are also thankful to Atilio Aranguren for SAS computation analysis and to Simon Boa and Marcel Amills for their critical reviews.

Footnotes

Corresponding Editor: Stephen J. O'Brien

Received for publication March 27, 2000. Accepted for publication October 31, 2000.

References

- Botstein D, White RL, Skolnick M, and Davis RW, 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 32:314–331.
- Francino O, Amills M, and Sánchez A, 1997. Canine *Mhc* DRB1 phenotyping by PCR-RFLP analysis. *Anim Genet* 28:41–45.
- Francisco LV, Langston AA, Mellersh CS, Neal CL, and Ostrander EA, 1996. A class of highly polymorphic tetra-nucleotide repeats for the canine genetic mapping. *Mammal Genome* 7:359–362.
- Fredholm M and Wintero AK, 1995. Variation of short tandem repeats within and between species belonging to the *Canidae* family. *Mammal Genome* 6:11–18.
- Grimaldi M-C and Crouau-Roy B, 1997. Microsatellite allelic homoplasmy due to variable flanking sequences. *J Mol Evol* 44:336–340.
- Hammond H, Jin L, Zhong Y, Caskey CT, and Chakraborty R, 1994. Evaluation of 13 short tandem repeat loci use in personal identification applications. *Am J Hum Genet* 55:175–189.
- Holmes NG, Dickens HF, Parker HL, Binns MM, Mellersh CS, and Sampson J, 1995. Eighteen canine microsatellites. *Anim Genet* 26:132–133.
- Holmes NG, Mellersh CS, Humphreys SJ, Binns MM, Holliman A, Curtis R, and Sampson J, 1993. Isolation and characterization of microsatellites from the canine genome. *Anim Genet* 24:289–292.
- Jamieson A, 1994. The effectiveness of using co-dominant polymorphic allelic series for (1) checking pedigrees and (2) distinguishing full-sib pair members. *Anim Genet* 25(suppl 1):37–44.
- Koskinen MT and Bredbacka P, 1999. A convenient and efficient microsatellite-based assay for resolving parentages in dogs. *Anim Genet* 30:148–149.
- Mellersh C, Holmes N, Binns M, and Sampson J, 1994. Dinucleotide repeat polymorphisms at four canine loci (LEI 003, LEI 007, LEI 008 and LEI 015). *Anim Genet* 25:125.
- Mellersh CS, Hitte C, Richman M, Vignaux F, Priat C, Jouquand S, Werner P, Andr  ae C, DeRose S, Patterson DF, Ostrander EA and Galibert F, 2000. An integrated linkage-radiation hybrid map of the canine genome. *Mammal Genome* 11:120–130.
- Mellersh CS, Langston AA, Acland GM, Fleming MA, Ray K, Wiegand NA, Francisco LV, Gibbs M, Aguirre G, and Ostrander EA, 1997. A linkage map of the canine genome. *Genomics* 46:326–336.
- Ostrander EA, Sprague GF Jr, and Rine J, 1993. Identification and characterization of dinucleotide repeat (CA)_n markers for genetic mapping in dog. *Genomics* 16:207–213.
- Ostrander EA, Mapa FA, Yee M, and Rine J, 1995. One hundred and one simple sequence repeat-based markers for the canine genome. *Mammal Genome* 6:192–195.
- Primmer CR and Mathews ME, 1993. Canine tetra-nucleotide repeat polymorphism at VIAS-D10 locus. *Anim Genet* 24:332.
- SAS Institute, 1995. SAS user's guide: statistics, version 6.12. Cary, NC: SAS Institute.
- Sutton MD, Holmes NG, Brennan FB, Binns MM, Kelly EP, and Duke EJ, 1998. A comparative genetic analysis of the Irish greyhound population using multilocus DNA fingerprinting, canine single locus minisatellites and canine microsatellites. *Anim Genet* 29:168–172.
- Swofford D and Selander RB, 1989. BIOSYS-1: a computer program for the analysis of allele variation in population genetics and biochemical systematics, release 1.7. Urbana: Illinois Natural History Survey.
- Tautz D, 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res* 17:6463–6471.
- Thomas R, Holmes NG, Fischer PE, Dickens HF, Breen M, Sampson J, and Binns MM, 1997. Eight canine microsatellites. *Anim Genet* 28:153–154.
- Zajc I, Mellersh CS, and Sampson J, 1997. Variability of canine microsatellites within and between different dog breeds. *Mammal Genome* 8:182–185.
- Zajc I and Sampson J, 1999. Utility of canine microsatellites in revealing the relationships of pure bred dogs. *J Hered* 90:104–107.

**Mammalian orthologous PCR of the putative TM4 of the
Nramp1 gene and molecular characterisation of this region in
dogs**

Altet, L., Francino, O., and Sánchez, A.

1999

Archives of Animal Breeding **42**: 126-129

Arch. Tierz., Dummerstorf 42 (1999) Special Issue, 126-129

Unitat de Genètica, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain

L. ALTET, O. FRANCINO and A. SÁNCHEZ

Mammalian orthologous PCR of the putative TM4 of the *NRAMP1* gene and molecular characterisation of this region in dogs (Orthologe PCR der putativen TM4 Region des *NRAMP1* Gens bei Säugetieren und die molekulare Charakterisierung dieser Region bei Hunden)

Summary

Orthologous gene-specific PCR primers have been designed to amplify the putative transmembrane domain (TM) 4 of the *Nramp1* gene in mammals. Sequencing of the dog PCR fragment showed to be *Nramp1* gene and it was used as a probe for Southern blot analysis, confirming the specific amplification of this gene also in other species. In order to analyse the relationship between *Nramp* and Leishmaniosis in dogs, a PCR-RFLP protocol has been optimised to look for TM4 polymorphism. Results showed a conserved Gly¹⁶⁹ residue in all animals tested and only two intronic polymorphisms.

Zusammenfassung

Für die Amplifikation der putativen Transmembrandomäne (TM) 4 des *Nramp1*-Gens bei Säugetieren wurden orthologe Gen-spezifische Primer entwickelt. Mit der Sequenzierung eines PCR-Fragments vom Hund konnte die Spezifität des *Nramp1*-Gens nachgewiesen werden. Dieses PCR-Produkt wurde als Sonde für Southern-Blot-Hybridisierungen genutzt, die eine spezifische Amplifikation dieses Gens auch in anderen Spezies gezeigt hat. Für die Analyse der Beziehung zwischen *Nramp* und Leishmaniosis bei Hunden wurde ein PCR-RFLP-Protokoll optimiert, um TM4 Polymorphismen zu finden. Die Ergebnisse zeigten einen konservierten Gly¹⁶⁹ Rest und nur zwei Polymorphismen im Intron-Bereich des Gens.

The *Bcg/Ity/Lsh* locus determines the natural resistance or susceptibility to infection with antigenically unrelated pathogens such as *Mycobacterium*, *Salmonella* and *Leishmania* in mouse. It is involved in macrophage activation resulting in the destruction of intracellular parasites early during infection (SCHURR et al., 1990). By positional cloning, a candidate gene for *Bcg/Ity/Lsh* locus has been isolated and mapped in the proximal portion of the mouse chromosome 1. This gene, only expressed in reticuloendothelial organs and in mature macrophages derived from them, has been designated *Nramp1* for Natural Resistant-Associated Macrophage Protein (VIDAL et al., 1993). It is composed by 15 exons which span 11.5 Kb and it encodes an integral highly hydrophobic membrane protein, composed of 12 putative transmembrane domains (TM), with a transport motif conserved both in eukaryotic and prokaryotic organisms (GOVONI et al., 1995). Although the precise function of the *Nramp* protein is still unknown, it has attracted a great deal of interest due to a single non-conservative amino acid substitution within the predicted TM4 (Gly¹⁶⁹→Asp¹⁶⁹) has been demonstrated in absolute association with the susceptible phenotype in mouse (MALO et al., 1994 and GOVONI et al., 1995). We present here orthologous gene-specific PCR primers to amplify this region in mammals and a PCR-RFLP protocol to detect the mouse mutation as a first approach to look for polymorphisms involved in disease susceptibility.

Primers have been designed based on conserved coding regions from all the *Nramp1* sequences available up to the moment: human (CELLIER et al., 1994), sheep (BRUNER et al., 1994), chicken (HU et al., 1995), bovine (FENG et al., 1996), rat (GE et al., 1996), pig (TUGLE et al., 1997), deer (MATHEWS and CROWFORD, 1998), bubalus (HASHAD et al., unpublished) and bison (FENG et al., unpublished). They have been placed in exons 5 and 7 surrounding the region where the mouse mutation is located (exon 6). The primer sequence for exon 5 is *NRAMPE5-F* (5'-TCCTCTGGCTGACCAT(CT)GAGCT-3') and for exon 7 is

NRAMPE7-R (5'-CTCATAGCC(AG)AAGGTCAA(AG)GCCAT-3'). PCR amplification was tested in several species such as dog, donkey, horse, goat, rabbit, guinea pig, cat and dolphin, with unknown sequence of the gene until the moment, and human, mouse, pig, sheep and cow, used as control. DNA was extracted from peripheral blood leukocytes. PCR was carried out in 50 µl final reaction mixture containing PCR buffer (x1), 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM of each dNTP, 0.2 µM of each primer, 1.25 U of Taq polymerase and 80-100 ng of DNA. Thermocycling conditions were: 3' at 94° C followed by 35 cycles at 94° (30"), 58° (30") and 72° (1') with a final extension of 5' at 72°. A specific band was obtained for all the species analysed with the exception of cat where the extra band could correspond to a PCR artefact product or to the detection of more than one *Nramp* gene, as it has been previously described in mouse or human (VIDAL et al., 1995; GRUENHEID et al., 1995). The existence of this gene has not been previously described in most of the species analysed, such as dog, donkey, horse, goat, rabbit, guinea pig, cat and dolphin.

In order to confirm the specific amplification of the *Nramp1* gene, the dog PCR fragment (994bp) was cloned into the plasmid vector pTZ-18U and sequenced (GenBank Accession Number: AF091049) using the dideoxy method with fluorescent terminators in an automated DNA sequencer (ABI-PRISM™ 310, PE Applied Biosystems). It shares up to 97% of nucleotide identity with all the exon sequences available confirming the specific amplification of the canine *Nramp1* gene. At amino acid level only three changes have been found comparing with the mouse sequence that did not modify the net charge of the protein.

The specific amplification of the *Nramp1* gene in the other species has been confirmed by Southern blot analysis using the dog PCR fragment as a probe under maximum stringent conditions. *Nramp* has homologous genes in many phylogenetically distant organisms uncovering a common membrane-associated structural unit that has been highly conserved during evolution and which show remarkable sequence conservation within the TM domains suggesting a common mechanistic aspect of transport (reviewed by CELLIER et al., 1996).

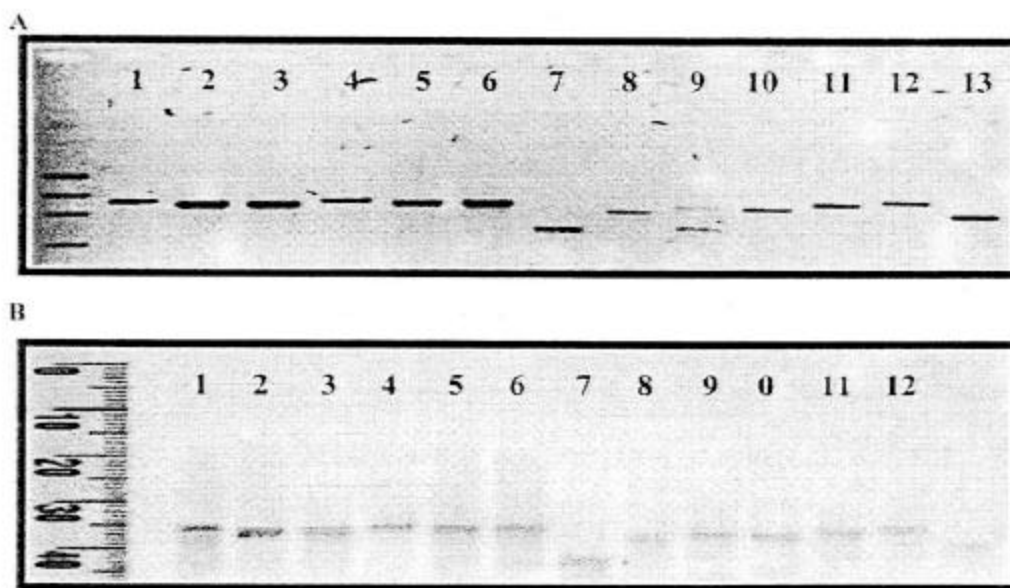


Fig.: (A) PCR amplification of the putative TM4 in different species: (1) dog, (2) donkey, (3) horse, (4) cow, (5) sheep, (6) goat, (7) rabbit, (8) guinea pig, (9) cat, (10) pig, (11) human, (12) dolphin and (13) mouse. (B) Southern blot of the previous PCR bands and hybridisation with the dog *Nramp* PCR fragment as probe.

So, these orthologous gene-specific PCR primers allow the specific amplification of the putative TM4 of the *Nramp1* gene in mammals. This could be used as a first approach in the search of genes responsible for disease susceptibility, but also to map this gene as a type I marker for the direct comparison between gene maps of divergent species (Fig.).

The Mediterranean area is an endemic region of leishmania disease in dogs. In order to analyse the relationship between *Nramp1* gene polymorphism and canine Leishmaniosis, a PCR-RFLP protocol was developed to detect the TM4 mutation that has been associated to infection susceptibility in mouse. The presence of Asp¹⁶⁹ instead of Gly¹⁶⁹ is due to a G to A transversion in exon 6 of *Nramp1* gene, which originates a polymorphic site for the restriction enzyme BseG I. The PCR-RFLP protocol was tested in 88 unrelated dogs of different breeds: 26 Rottweilers, 33 Iberian Hound, 8 Labrador Retriever, 15 Golden Retriever and 7 West Highland White Terrier.

The Gly¹⁶⁹ residue of the *Nramp1* gene is conserved in all dogs analysed as it is in human, cattle, sheep and pig. Two intron mutations were found, resulting in two different restriction patterns: 765/229 ; 765/35/194. Curiously the second pattern only appeared in Rottweiler breed. We are currently characterising the whole canine *Nramp1* gene, since searching for polymorphism in other regions of the gene is required to study the role of *Nramp1* in determining leishmania susceptibility in dogs.

References

- BRUNER, RM.; HENKE, M.; GUERIN, G.; GOLDAMMER, T.; SEYFERT, HM.; SCHWERIN, M.:
The macrophage expressed variant of the bovine lysozyme-encoding gene maps to chromosome 5q23. *Mammalian Genome* 5(12) (1994), 834-835
- CELLIER, M.; GOVONI, G.; VIDAL, S.; KWAN, T.; GROULX, N.; LIU, J.; SANCHEZ, F.; SKAMENE, E.; SCHURR, E.; GROS, P.:
Human natural resistance-associated macrophage protein: cDNA cloning, chromosomal mapping, genomic organisation, and tissue-specific expression. *Journal of Experimental Medicine* 180(5) (1994), 1741-1752
- CELLIER, M.; BELOUCHI, A.; GROS, P.:
Resistance to intracellular infections: comparative genomic analysis of *Nramp*. *Trends in Genetics* 12(6) (1996), 201-204
- FENG, J.; LI, Y.; HASHAD, M.; SCHURR, E.; GROS, P.; ADAMS, LG.; TEMPLETON, JW.:
Bovine natural resistance associated macrophage protein 1 (*Nramp1*) gene. *Genome Research* 6(10) (1996), 956-964
- GE, L.; REMMERS, EF.; DU, Y.; WILDER, RL.:
Genomic cloning and genetic mapping of the rat *Nramp1* (*Bcg*) gene on chromosome 9. *Mammalian Genome* 7 (1996), 856-857
- GRUENHEID, S.; CELLIER, M.; VIDAL, S.; GROS, P.:
Identification and characterization of a second mouse *Nramp* gene. *Genomics* 25(2) (1995), 514-525
- GOVONI, G.; VIDAL, S.; CELLIER, M.; LEPAGE, P.; MALO, D.; GROS, P.:
Genomic structure, promoter sequence, and induction of expression of the mouse *Nramp1* gene in macrophages. *Genomics* 27 (1995), 9-19
- HU, J.; BUMSTEAD, N.; BURKE, D.; PONCE DE LEON, FA.; SKAMENE, E.; GROS, P.; MALO, D.:
Genetic and physical mapping of the natural resistance-associated macrophage protein 1 (*NRAMP1*) in chicken. *Mammalian Genome* 6(11) (1995), 809-815
- MALO, D.; VOGAN, K.; VIDAL, S.; HU, J.; CELLIER, M.; SCHURR, E.; FUKS, A.; BUMSTEAD, N.; MORGAN, K.; GROS, P.:
Haplotype mapping and sequence analysis of the mouse *Nramp* gene predict susceptibility to infection with intracellular parasites. *Genomics* 23 (1994), 51-61
- MATTHEWS, GD.; CRAWFORD, AM.:
Cloning, sequencing and linkage mapping of the *NRAMP1* gene of sheep and deer. *Animal Genetics* 29 (1998), 1-6
- SCHURR, E.; BUSCHMAN, E.; MALO, D.; GROS, P.; SKAMENE, E.:
Immunogenetics of Mycobacterial infections : Mouse-Human homologies. *The Journal of Infectious Diseases* 161 (1990), 634-639

- TUGGLE, CK.; SCHMITZ, CB.; GINGERICH-FEIL, D.:
Cloning of a pig full-length natural resistance associated macrophage protein (NRAMP1) cDNA.
Journal of Animal Science 75 (1997), 277
- VIDAL, SM.; MALO, D.; VOYAN, K.; SKAMENE, E.; GROS, P.:
Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation a candidate for Bcg. *Cell* 73 (1993),
469-485
- VIDAL, S.; BELOUCHI, AM.; CELLIER, M.; BEATTY, B.; GROS, P.:
Cloning and characterization of a second human NRAMP gene on chromosome 12q13. *Mammalian
Genome* 6(4) (1995), 224-230

Corresponding author's address

LAURA ALTET
Unitat de Genètica
Facultat de Veterinària
Universitat Autònoma de Barcelona
08193 Bellaterra (Barcelona), Spain

**Mapping and sequencing of the canine *NRAMP1* gene and
identification of mutations in leishmaniasis-susceptible dogs**

Altet, L., Francino, O., Solano-Gallego, L., Renier, C., and Sánchez, A.

2002

Infection and Immunity **70**: 2763-2771

Mapping and Sequencing of the Canine *NRAMP1* Gene and Identification of Mutations in Leishmaniasis-Susceptible Dogs

Laura Altet,^{1*} Olga Francino,¹ Laia Solano-Gallego,² Corinne Renier,³ and Armand Sánchez¹

Departament de Ciència Animal i dels Aliments¹ and Departament de Farmacologia, Terapèutica i Toxicologia,² Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain, and UPR 41 CNRS, Recombinaisons Génétiques, Faculté de Médecine, 35043 Rennes Cédex,³ France³

Received 2 August 2001/Returned for modification 15 November 2001/Accepted 28 January 2002

The *NRAMP1* gene (*Slc11a1*) encodes an ion transporter protein involved in the control of intraphagosomal replication of parasites and in macrophage activation. It has been described in mice as the determinant of natural resistance or susceptibility to infection with antigenically unrelated pathogens, including *Leishmania*. Our aims were to sequence and map the canine *Slc11a1* gene and to identify mutations that may be associated with resistance or susceptibility to *Leishmania* infection. The canine *Slc11a1* gene has been mapped to dog chromosome CFA37 and covers 9 kb, including a 700-bp promoter region, 15 exons, and a polymorphic microsatellite in intron 1. It encodes a 547-amino-acid protein that has over 87% identity with the *Slc11a1* proteins of different mammalian species. A case-control study with 33 resistant and 84 susceptible dogs showed an association between allele 145 of the microsatellite and susceptible dogs. Sequence variant analysis was performed by direct sequencing of the cDNA and the promoter region of four unrelated beagles experimentally infected with *Leishmania infantum* to search for possible functional mutations. Two of the dogs were classified as susceptible and the other two were classified as resistant based on their immune responses. Two important mutations were found in susceptible dogs: a G-rich region in the promoter that was common to both animals and a complete deletion of exon 11, which encodes the consensus transport motif of the protein, in the unique susceptible dog that needed an additional and prolonged treatment to avoid continuous relapses. A study with a larger dog population would be required to prove the association of these sequence variants with disease susceptibility.

Natural resistance or susceptibility to several antigenically unrelated pathogens, such as *Mycobacterium*, *Salmonella*, and *Leishmania*, has been associated with the locus *Bcg/Ity/Lsh* in mice (43). The resistant phenotype (*Bcg^r*) results in macrophage activation producing the destruction of intracellular pathogens early during infection (43). Positional cloning revealed that the *Bcg/Ity/Lsh* locus corresponds to a gene encoding an ion transporter protein, designated natural resistance-associated macrophage protein (NRAMP1) (52) and referred to here with the new nomenclature, solute carrier family 11 member 1 (*Slc11a1*).

The *Slc11a1* protein is composed of 12 putative transmembrane (TM) domains, an extracellular glycosylated loop, and a transport motif conserved among other transporter proteins in both eukaryotic and prokaryotic organisms (52, 21). A nonconservative amino acid substitution (G169A) in the TM4 domain has been associated with a susceptible phenotype in mice (52, 31). Within macrophages, *Slc11a1* has been located in late endocytic compartments and is acquired by the phagosomal membrane after phagocytosis (22). The protein drives divalent metals out of the phagosome, controlling the replication of intracellular pathogens by altering the intravacuolar environment (18). This behavior could also provide an explanation for the observed pleiotropic effects on macrophage function that

have been attributed to the *Slc11a1* gene, suggesting a role in infectious and autoimmune disease susceptibility (5).

Slc11a1 has attracted a great deal of interest and has been characterized in different species in a search for polymorphisms involved in disease susceptibility. For instance, a functional repeat polymorphism in the promoter region of the human *Slc11a1* gene was found to drive gene expression, conferring protection against or susceptibility to juvenile rheumatoid arthritis (42) or multiple sclerosis (25). Moreover, a single base change in intron 4 (14) and a 4-bp deletion in the 3' untranslated region (UTR) (40) were significantly associated with tuberculosis in humans. Recently, a microsatellite in the 3' UTR also was demonstrated to affect the expression of the bovine *Slc11a1* gene and to control the in vitro replication of *Brucella abortus* (3). Finally, an amino acid substitution (G696A) in chicken *Slc11a1* was found only in chicken cell lines susceptible to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (24).

In southern European countries, leishmaniasis is an endemic and zoonotic disease caused by the protozoan parasite *Leishmania infantum*. This parasitic infection in this area is important not only to veterinary medicine, because dogs are considered the main reservoir (4), but also because of its zoonotic aspects. Human leishmaniasis, which traditionally affected young children and infants, is now a common complicating factor in adults infected with human immunodeficiency virus or receiving immunosuppressive drugs (2, 15).

In dogs, leishmaniasis is a systemic disease with a variety of clinical signs, including nonpruritic skin lesions (such as exo-

* Corresponding author. Mailing address: Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain. Phone: (34) 93 5812087. Fax: (34) 93 5812106. E-mail: Laura.Altet@uab.es.

TABLE 1. Mammalian orthologous and dog-specific primers designed to amplify the canine *Slc11a1* gene and cDNA

Primer ^a	Location	Sequence (5' → 3')
NRPROM-F	Promoter	CACCTTCTGCCTTTCCAAATGTTTCACA
NRPROM3-F	Promoter	TCTCATAGTTTATCTTACCTGC
NRPROMD-F ^b	Promoter	CCTCTCAGCTAGTCTGAGCC
NRPROM2-R ^b	Promoter	CAGCTGATCTCAGCTGTCCTC
NRPROM3-R ^b	Promoter	AGCTACTCAGCACATGCTTC
NRMICRI1-F ^b	Intron 1	GAGTCTGCTTGAGATTCTCTC
NRMICRI1-R ^b	Intron 1	TATCACCTCCACCCTTCAAAC
NRE2-F	Exon 2	CCTACCTRAGTGAGAAGATCC
NRI2E2-R ^b	Exon 2-intron 2 boundary	GGTTTCCAGCATTCTACCGGTTTC
NRE6I6-F ^b	Exon 6-intron 6 boundary	CCTTGACAACTACGGTGGGT
NRI6-R ^b	Intron 6	CGAAGAAACAGAAGCCCAAG
NRE7-R	Exon 7	CTCATAGCCRAAGGTCAARGCCAT
NRE7-F	Exon 7	GTTGCGGAAGCTGGAAGCCTT
NRE9-F	Exon 9	GAGAAGCCAACATGTACTTCCT
NRE9-R	Exon 9	GCTTGTAGAAGGCCTGCCCAA
NRE10-F	Exon 10	TTCAACATCTGTGCCAACAGCA
NRE10-R	Exon 10	TGCTGTTGGCACAGATGTTGAA
NRE11-R2 ^b	Exon 11	CAAACGTGTCCTCGGTAGGTGCC
NR3'UTR-R ^b	Exon 15	CACATCAGGAAGCCCATACAG

^a F, forward; R, reverse.^b Dog specific.

liative dermatitis and ulcerations), local or generalized lymphadenopathy, loss of weight, poor appetite, ocular lesions, epistaxis, lameness, renal failure, and diarrhea (45). In this parasitic process, infection is not synonymous with disease. The prevalence of *Leishmania* infection (65%) in an area of endemicity is higher than the seroprevalence (20%) and the prevalence of disease (10%) (11, 47). The immune response in dogs is humoral and cellular, resulting in a wide array of responses: the cellular immune response is protective against *L. infantum*, whereas a strong humoral immune response correlates with disease susceptibility (11, 35, 46).

Based on in vitro and in vivo studies, it is widely accepted that macrophages, where *Slc11a1* is expressed, play a central role in the control of the parasite (1, 48). Moreover, as previously described for *L. donovani* infection, the early outcome of *L. infantum* infection in mice is under the control of the *Slc11a1* gene (28). All of these issues suggest that *Slc11a1* is a strong candidate gene for natural resistance or susceptibility to *Leishmania* infection in dogs. We have addressed this issue by mapping and sequencing the canine *Slc11a1* gene and analyzing sequence variants that could be associated with disease susceptibility in four dogs experimentally infected with *L. infantum*. A microsatellite located in intron 1 of the gene was used in a case-control study to provide evidence of the association with *Leishmania* infection in dogs.

MATERIALS AND METHODS

Study animal. We characterized the canine *Slc11a1* gene in a healthy Rottweiler.

The case-control study was performed with 33 healthy dogs of different breeds that showed a *Leishmania*-specific cellular immune response by means of positive delayed-type hypersensitivity (DTH) to leishmanin (resistant dogs) and 84 dogs of different breeds with patent leishmaniasis diagnosed by a positive *Leishmania*-specific PCR result for bone marrow samples (39) collected from veterinary clinics (susceptible dogs).

Sequence variant analysis was done with samples from four beagles experimentally infected with *L. infantum*. These dogs were inoculated intravenously with 5×10^7 promastigotes of *L. infantum* (MCAN/ES/92/BCN-83/MON-1) diluted in 0.5 ml of saline solution and were kept in the Animalarium at the

Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona. They were monitored for 5 years, during which time clinical, hematological, biochemical, serological, and parasitological control analyses were performed under the auspices of the Universitat Autònoma de Barcelona animal care committee. Once infection was confirmed and serologic results were positive, dogs were treated when protein and gamma globulin concentrations reached abnormally high values (>7 g/dl). All dogs were subjected to treatment with meglumine antimoniate (20 mg of Sb⁵⁺/kg of body weight every 12 h for 20 days) (38, 50) and to a second treatment with liposome-encapsulated meglumine antimoniate (9.8 mg of Sb⁵⁺/kg every 24 h for 20 days) (51). One dog was treated again with liposome-encapsulated meglumine antimoniate and allopurinol (10 mg every 12 h for 8 months).

Specific *L. infantum* humoral and cellular immune responses. Specific *L. infantum* humoral and cellular immune responses were assessed as described elsewhere (17) 5 years after experimental infection. Briefly, the humoral response was analyzed by an enzyme-linked immunosorbent assay for detecting specific anti-*Leishmania* immunoglobulin G1 (IgG1) and IgG2 antibodies. The cellular response was analyzed by determining DTH to leishmanin, by a lymphocyte proliferation assay (LPA), and by determining in vitro gamma interferon (IFN- γ) production. The LPA and the determination of IFN- γ production were carried out after incubation of samples with phytohemagglutinin (PHA) or leishmanial soluble antigen (LSA).

Sequencing and mapping of the canine *Slc11a1* gene. Genomic DNA was isolated from peripheral blood as described elsewhere (41). The canine *Slc11a1* gene was PCR amplified from different overlapping fragments corresponding to the promoter (promoter 1), exon 2 to exon 7 (E2-E7), exon 7 to exon 10 (E7-E10), exon 9 to exon 11 (E9-E11), and exon 10 to the 3' UTR (E10-E15). Mammalian orthologous gene-specific PCR primers are shown in Table 1. PCR conditions and thermocycling profiles are shown in Table 2. Amplification of the 3' UTR from cDNA was accomplished with an internal primer from the oligo(dT) used in the reverse transcription (RT) reaction (see below). PCR products of the expected sizes were isolated from agarose gels by using a QIAquick gel extraction kit (Qiagen) and were cloned into the PCR 2.1-TOPO vector (TOPO TA cloning kit; Invitrogen). Two independent clones of each fragment were sequenced by using the dideoxy method (BigDye terminator cycle sequencing ready reaction kit, version 2.0; Applied Biosystems) with fluorescent terminators and an automated DNA sequencer (ABI-PRISM; Applied Biosystems).

We used canine *Slc11a1*-specific primers (NRE6I6-F and NRI6-R) to amplify a 179-bp fragment in the RHDF5000 dog whole-genome radiation hybrid panel (53, 54) as previously described (37). PCR conditions and thermocycling profiles are shown in Table 2 (E6-I6). Based on a pairwise analysis with a logarithm of odds ratio score threshold of >8.0 , the typing data generated for the *Slc11a1* marker were then incorporated into the integrated radiation hybrid (RH)-linkage map (34) by using the Multimap package (32). Distances (D), calculated as $D = -\ln(1 - \Theta)$, where Θ is the breakage frequency, are expressed in centiRays 5000 (cR5000), where 5000 is the radiation dose used to generate the RH panel.

TABLE 2. PCR conditions and thermocycling profiles used for canine *Slc11a1* sequencing and polymorphism analysis

Region	Primers	MgCl ₂ concn (mM)	Primer concn (μM)	Conditions for:						No. of cycles	Enzyme(s) ^a
				Denaturation		Annealing		Extension			
				°C	s	°C	s	°C	s		
Promoter 1	NRPROM-F–NRI2E2-R	1.50	0.2	94	30	55	30	72	60	35	A
	NRPROM3-F–NRPROM2-R	1.50	0.2	94	30	54	30	72	60	35	A
Promoter 2	NRPROMD-F–NRPROM3-R	1.50	0.2	94	30	53	30	72	60	35	A
	NRPROMD-F–NRPROM2-R	1.50	0.2	94	30	53	30	72	60	35	A
E2–E7	NRE2-F–NRE7-R	2.25	0.3	92	10	58	30	68	240	10	B
				92	10	58	30	68	240 ^b	25	
E2–E9	NRE2-F–NRE9-R	1.50	0.2	94	30	53	30	72	60	35	A
E7–E15	NRE7-F–NRE3'UTR-R	1.50	0.2	94	30	55	30	72	60	35	A
E6–I6	NRE6I6-F–NRI6-R	2.00	0.3	94	30	63 ^c	30	72	30	20	D
				94	30	53	30	72	30	10	
E7–E10	NRE7-F–NRE10-R	1.50	0.3	94	15	55	30	68	480	35	C
E9–E11	NRE9-F–NRE11-R2	1.50	0.3	94	15	55	30	68	480	35	C
E10–E15	NRE10-F–NR3'UTR-R	1.50	0.3	94	15	55	30	68	480	35	C
Microsatellite	NRMICRI1-F–NRMICR1-R	1.50	0.2	94	30	55	30	72	30	25	A
Intron 10	NRE10-F–NRE11-R2	1.50	0.2	95	30	55	30	72	45	35	E

^a Enzymes and commercial kits: A, *Taq* polymerase (Invitrogen); B, Expand long-template PCR system (system 3; *Taq* and *Pwo* polymerases) (Roche); C, Platinum *Pfx* DNA polymerase (with enhancer solution ×1) (Invitrogen); D, AmpliTaq Gold (Applied Biosystems); and E, GC-Rich PCR amplification system (0.5 M GC rich resolution solution and *Taq* and *Tgo* polymerases).

^b Plus 20 s per cycle.

^c Minus 0.5°C per cycle.

In this panel, the correspondence between cR5000 and a physical distance has been estimated to be 1 cR5000 for 166 kb. A multipoint analysis was carried out to order the markers belonging to the group in a comprehensive manner, and the intermarker distances were calculated.

Sequence variant analysis. Different tissues were used for RNA isolation. Blood and spleen or liver were extracted postmortem and stored at –80°C until RNA isolation. Peripheral blood mononuclear cells were isolated from heparinized venous blood samples by standard Ficoll-Hypaque (Histopaque 1.077; Sigma, St. Louis, Mo.) density gradient centrifugation as described elsewhere (7). Total RNA was isolated by using Trizol reagent (GibcoBRL-Life Technologies) as specified by the manufacturer. RT-PCR was carried out with a 20-μl final reaction mixture containing 1 μg of total RNA, 1 mM each deoxynucleoside triphosphate, 2 μM oligo(dT) primer, and 200 U of Moloney murine leukemia virus RT (Amersham Life Science). cDNA amplification was accomplished with two overlapping fragments: exon 2 to exon 9 (E2–E9) and exon 7 to exon 15 (E7–E15). PCR conditions and thermocycling profiles are shown in Table 2. PCR products were isolated, cloned, and sequenced as described above.

A seminested PCR was used to amplify the promoter region (promoter 2). A 1-μl sample of the first PCR product (NRPROMD–F and NRPRM3–R) was used as a template to perform the second PCR (NRPROMD–F and NRPRM2–R). PCR products were isolated, cloned, and sequenced as described above.

The microsatellite located in intron 1 was amplified by using dog-specific primers NRMICRI1-F (fluorescence labeled) and NRMICRI1-R. PCR conditions and thermocycling profiles are shown in Table 2. PCR products were analyzed by capillary electrophoresis with an ABI 3100 genetic analyzer (Applied Biosystems), and labeled PCR products were automatically sized relative to the internal standard (PRISM GeneScan-350 TAMRA; Applied Biosystems) with GeneScan analysis software, version 3.5 (Applied Biosystems). Intron 10 amplification was performed as shown in Table 2 by using a GC-rich PCR amplification system (Roche) and a 50-μl final reaction mixture containing 0.5 M GC-rich resolution solution and 2 U of a *Taq* and *Tgo* DNA polymerase mix, under the manufacturer's conditions.

Computation and statistical analysis. Allele frequencies of the intron 1 microsatellite of the canine *Slc11a1* gene were analyzed by using a two-by-two chi-square test with 1 df.

A neighbor-joining relationship tree for mammalian *Slc11* cDNA sequences, both *Slc11a1* and *Slc11a2*, was created with the assumption that distance is equal to the number of nucleotide differences and with a bootstrap value of 1,000 by using MEGA software, version 2.0 (26).

Nucleotide sequence accession number. The canine *Slc11a1* gene characterized has been deposited under GenBank accession number AF091049.

RESULTS

Sequencing and mapping of the canine *Slc11a1* gene. Mammalian orthologous gene-specific primers were designed to accomplish the complete sequencing of the canine *Slc11a1* gene. The sequences of the primers were designed based on conserved coding regions from all *Slc11a1* sequences from vertebrate species available up to that time: human (6, 12), sheep (9), mouse (21), cow (16, 23), rat (19), pig (49), deer (33), buffalo (M. Hashad et al., unpublished), and bison (J. Feng et al., unpublished). Primer sequences are shown in Table 1. The canine *Slc11a1* gene includes 15 exons and encompasses 9 kb (Fig. 1). Both the sequence and the genomic organization of the coding regions are highly conserved in relation to those of the *Slc11a1* genes from other mammals (Fig. 2). Intron-exon boundaries were determined by comparison of the entire genomic sequence with the beagle cDNA and the mouse gene (21). Intronic regions conform perfectly to the

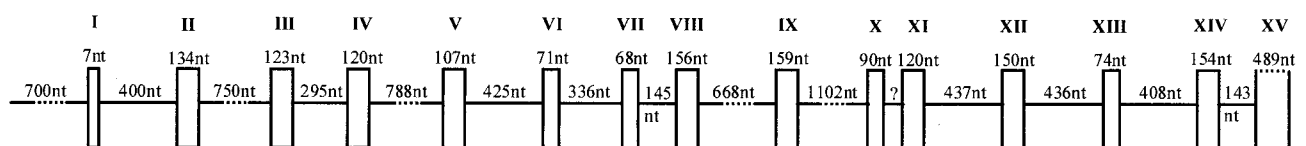
FIG. 1. Genomic structure of the canine *Slc11a1* gene. nt, nucleotides.



FIG. 3. Sequence analysis. (A) Promoter and 5' UTR of the canine *Slc11a1* gene from nucleotide 1 to the translational start codon (position 689). Putative binding sites for transcription factors are indicated with a line above (sense strand) or below (antisense strand) the consensus sequence. (B) G-rich polymorphism of the promoter regions from beagles and a Rottweiler. GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor.

the second treatment and were negative for detection of parasite DNA in bone marrow by PCR after 5 years. In susceptible dogs, the disease evolved gradually and became chronic after the second treatment, and a third long treatment was admin-

istered to dog S1 to avoid continuous relapses. The results of immunological tests are shown in Table 3.

Sequence variant analysis. *Slc11a1* sequence variants were analyzed at different levels: cDNA, promoter, and microsatellite. cDNA sequences obtained from the experimentally infected beagles were compared with the Rottweiler genomic sequence. Interestingly, two *Slc11a1* cDNAs were coamplified in dog S1: one of the expected size and the other one shorter. The shorter fragment was explained by the complete deletion of exon 11, which includes TM8 and most of the consensus transport motif of the protein. We analyzed this sample at the genomic level (data not shown); after PCR amplification from exon 10 to the 3' UTR, we found a single band and no evidence

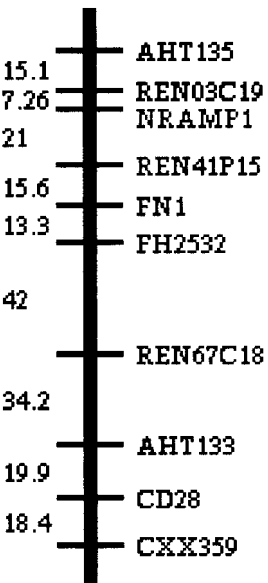


FIG. 4. *Slc11a1* mapped to canine RH syntenic group 11.

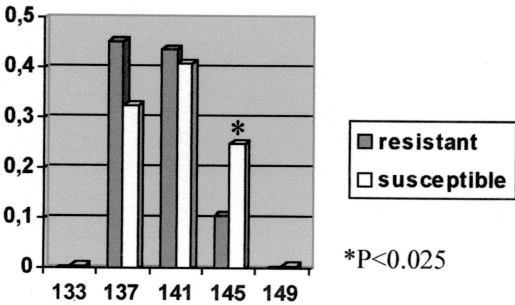


FIG. 5. Allelic frequencies of the intron 1 microsatellite. x axis, basepairs of alleles; y axis, allelic frequency.

TABLE 3. Assessment of resistance or susceptibility to infection by a range of immunological tests^a

Dog	OD ₄₉₂ for:			DTH response (mm)	OD ₄₅₀ in LPA with:			IFN- γ (IU/ml) with:		
	IgG	IgG2	IgG1		UPBMC	PHA	LSA	UPBMC	PHA	LSA
R1	0.929	1.138	0.123	22	0.133	0.916	1.266	80	160	320
R2	0.922	1.294	0.140	15	0.152	1.330	1.600	80	160	640
S1	2.285	3.000	0.513	0	0.100	1.090	0.098	20	40	0
S2	1.560	2.296	0.124	0	0.112	0.512	0.178	0	20	0

^a OD₄₅₀, optical density at 450 nm; UPBMC, unstimulated peripheral blood mononuclear cells.

of genomic deletion. Once we sequenced the exon-intron boundaries for intron 10, we found no mutation at the GT-AG donor-acceptor splice sites. However, both bands were also coamplified in two independent RT-PCRs from liver and spleen RNAs from the same animal (Fig. 6). We also found five single-nucleotide polymorphisms that resulted in amino acid substitutions. Four of them were located within the TM domains, and the other one, located in exon 10, produced the loss of an N-glycosylation site. Alignment of the five proteins is shown in Fig. 7.

Differences were also observed between susceptible and resistant animals in the promoter region. There is a G-rich region (positions 310 to 330) in the susceptible animals that is disrupted by G-to-A substitutions in different places in the resistant animals or in the Rottweiler dog sequence (Fig. 3B). The loss of a potential SP-1 binding site in dog R1 and both the gain and the loss of an AP-2 binding site were observed in dog R2 (positions 226 and 328, respectively). The latter dog also had an A-to-G substitution at position 405; this substitution did not modify any transcriptional binding site.

We also analyzed the polymorphism of the (TAAA)₉₋₁₁ microsatellite located in intron 1. Both susceptible animals were homozygous (allele 141), and dogs R1 and R2 were heterozygous (alleles 137/141 and 141/145, respectively).

DISCUSSION

In this study, we sequenced and mapped the canine *Slc11a1* gene as a strong candidate gene for leishmaniasis on the basis of studies with its murine homologue. The canine *Slc11a1* gene has been assigned to linkage group SRH11 located in chromosome CFA37 (8, 37), which includes at least two genes (*FN1*

and *CD28*) that have been mapped either to human chromosome 2q35 or mouse chromosome 1. The conserved syntenic group of the fragment delineated by *Slc11a1* and *CD28* can be assumed for dogs, humans, and mice.

In mice, the early outcome of *L. infantum* infection is under the control of the *Slc11a1* gene, which regulates the intraphagosomal replication of parasites inside the macrophage (28). In addition, *Slc11a1* regulates macrophage activation and has multiple pleiotropic effects involved in antigen processing and presentation (27). *Slc11a1* has a relevant function in the modulation of the subsequent immune response that could be predominantly cellular or humoral and that is of great importance in resistance or susceptibility to leishmaniasis (11, 35, 46). To the best of our knowledge, there are no reports describing the genetic factors that could influence *Leishmania* infection in dogs. However, the high degree of conservation of amino acids and structural motifs between the dog and mouse *Slc11a1* proteins suggests that they may have a similar role in the progression of the disease. As observed in humans (10), one should not expect an absolute association between *Slc11a1* and *Leishmania* infection, as in the mouse model, but a significant association between canine *Slc11a1* polymorphism and a susceptible phenotype in dogs.

In order to analyze the association between the canine *Slc11a1* gene and leishmaniasis, we performed a case-control study with resistant and susceptible dogs. Significant differences were observed for allele 145 of the intron 1 microsatellite between the two populations. These results suggest an association between *Slc11a1* and leishmaniasis, indicating a role of this gene in disease susceptibility. Sequence variants analyzed in four beagles experimentally infected with *L. infantum* could

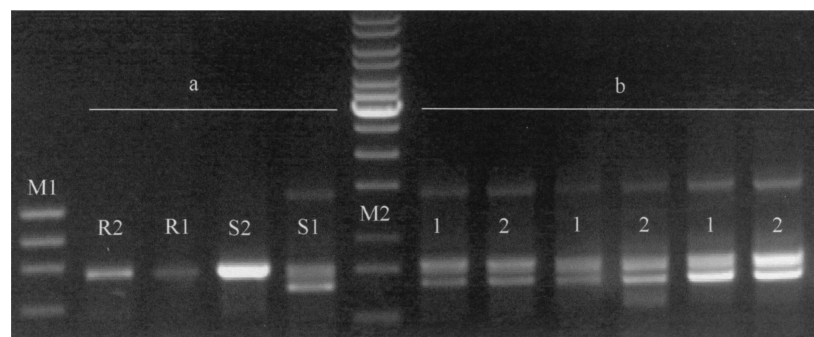


FIG. 6. mRNA alternative splicing in dog S1. (a) PCR amplification from exon 9 to the 3' UTR of cDNAs from the four beagles experimentally infected with *L. infantum*. R1 and R2 are resistant dogs, and S1 and S2 are susceptible dogs. (b) PCR amplification of the same region of dog S1 from three different RNA extractions. Two independent RT-PCRs of each RNA extraction are shown (lanes 1 and 2). Lane M1, ϕ X174 *Hae*III; M2, 1-kb ladder.

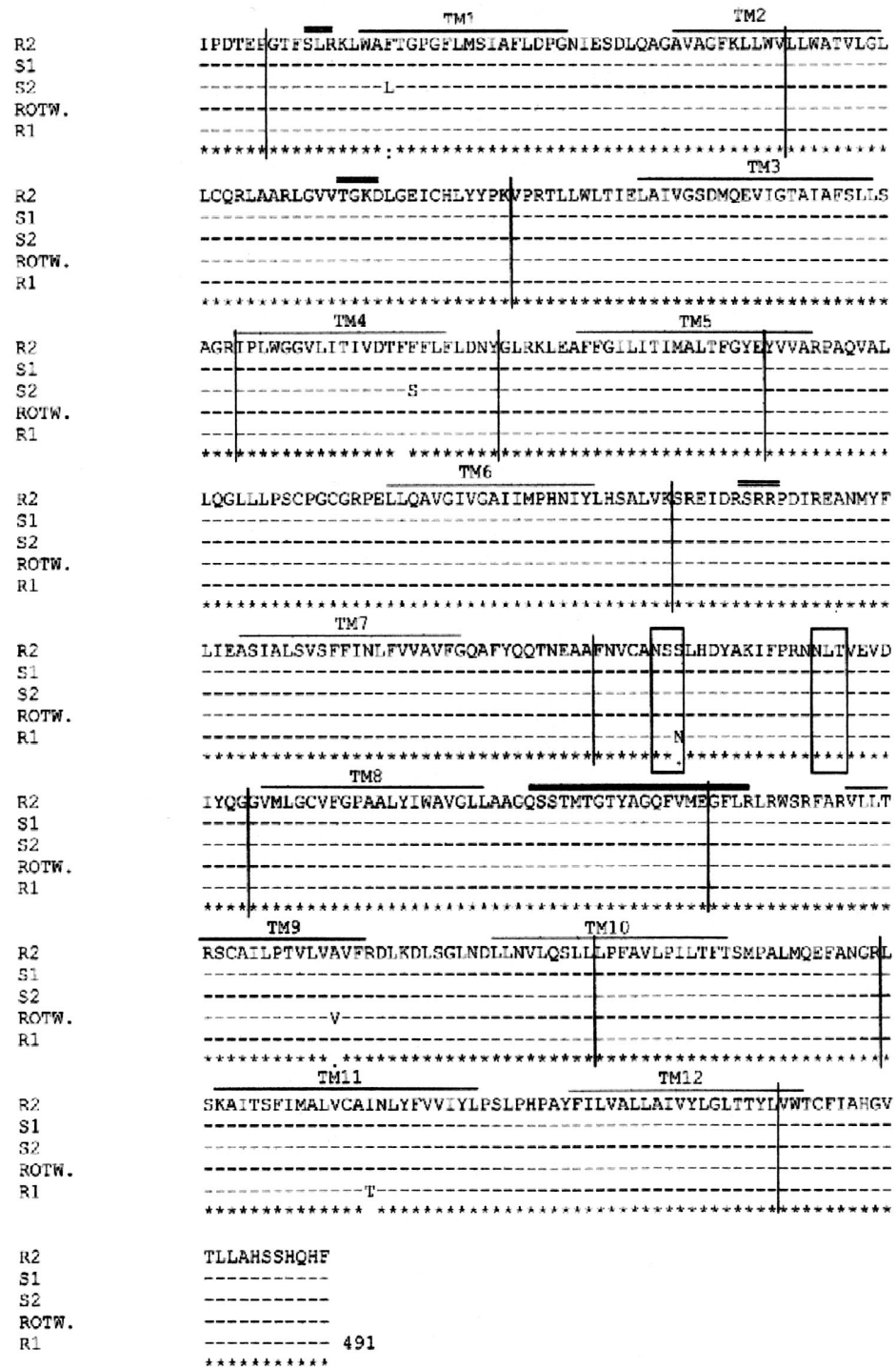


FIG. 7. Multiple alignment of the *Slc11a1* proteins from the Rottweiler (ROTW.) and the four beagles experimentally infected with *L. infantum*. For dog S1, the normal allele is shown. TM domains are indicated by thin overlining, and the consensus transport motif of the protein is indicated by thick overlining. Potential N-glycosylation sites are boxed, and potential phosphorylation sites for protein kinase C are indicated by double overlining. Exons are separated by vertical lines.

be associated with possible functional mutations related to their susceptible or protective immune responses. One of the susceptible beagles (S1) had a complete deletion of exon 11 in one of the *Slc11a1* alleles which resulted in the elimination of

TM8 and the consensus transport motif of the protein. Since no mutation was observed at the genomic level, including the GT-AG donor-acceptor intron 10 splicing sites, we suggest that the deletion of exon 11 could be caused by alternative mRNA

splicing. Intron 10 has complementary terminal repeats (5'-G GGGCCCCCG-3') which are canine specific and which could confer a complex secondary structure resulting in alternative mRNA splicing. Alternative splicing has been described for the human *Slc11a1* and *Slc11a2* genes, but in no case was the region of the consensus transport motif of the protein included (29, 30). The loss of the consensus transport motif caused by this deletion could produce a lack of function of the mutated protein, resulting in a higher level of proliferation of the parasite inside the macrophages of susceptible dogs. It is important to note that this dog was the only one that needed a third, sustained treatment to avoid continuous relapses.

We also described five amino acid substitutions, four located in the TM domains of the protein. The most significant mutations were F179S (TM4), I476T (TM11), and S323N (exon 10). The F179S amino acid substitution in TM4 of dog S2 implies a nonconservative change from a hydrophobic to a polar residue. Although this is a region that contains several polar residues (13), this substitution is located in the same TM domain in which the mouse mutation (G169A) was described to be located and resulted in the lack of function of the protein (21, 31). Moreover, this change has never been described for other mammals and has been observed only in *Slc11a1* orthologues from plants and prokaryotic organisms. The second amino acid substitution, I476T in TM11 of dog R1, represents a polar change in one of the most hydrophobic regions of the protein (13). Dog R1 also had an S323N substitution in exon 10 that results in the loss of one of the N-glycosylation sites; this substitution has also been described for buffalo and cow *Slc11a1* proteins.

The canine *Slc11a1* promoter region has been found to possess nine consensus IFN- γ binding sites and one potential binding site for LPS (NF-IL-6), consistent with the regulation of expression previously described (20). *Slc11a1* gene expression can be regulated during macrophage activation by cytokines and LPS. Furthermore, lymphocytes from resistant *Leishmania*-infected dogs have been found to produce IFN- γ upon parasite-specific stimulation and to lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex-restricted manner (36), leading to a cellular protective immune response. Although no polymorphism has been found at the IFN- γ and NF-IL-6 binding sites, different immune responses have been described for resistant and susceptible animals analyzed. Resistant dogs demonstrated *Leishmania*-specific cellular immunity due to their ability to produce IFN- γ , lymphocyte proliferation, and positive DTH. The only polymorphism common to the susceptible animals was the G-rich region in the promoter, which is located close to the region where the human microsatellite has been described to be located. Different alleles in the human dinucleotide microsatellite have been associated with a different ability to drive gene expression and has been correlated with infectious versus autoimmune disease susceptibility (44). A microsatellite located in the 3' UTR of the bovine *Slc11a1* gene has also been associated with different gene expression controlling the in vitro replication of *B. abortus* (3, 23). All these data suggest that the G-rich region of the *Slc11a1* promoter could also have an effect on gene expression.

In conclusion, the characterization of the canine *Slc11a1* gene, the association between the canine *Slc11a1* gene and disease susceptibility, and the description of new sequence

variants will be useful in the elucidation of the genetic factors involved in canine leishmaniasis. However, in order to determine whether each sequence variant described is associated with *Leishmania* susceptibility in dogs, a larger population-based analysis would be required to prove the functional association of *Slc11a1* with the disease.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a grant from the Real Sociedad Canina Española.

We are grateful to Marcel Amills for critical review of the manuscript, Atilio Aranguren for MEGA computation analysis, and Oscar Ramirez for helping us with the statistical analysis.

REFERENCES

- Alexander, J., and D. G. Russell. 1992. The interaction of *Leishmania* species with macrophages. *Adv. Immunol.* **31**:175–254.
- Alvar, J., C. Cañavate, B. Gutierrez-Solar, M. Jiménez, F. Laguna, R. López-Vélez, R. Molina, and J. Moreno. 1997. *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**:298–319.
- Barthel, R., J. Feng, J. A. Piedrahita, D. N. McMurray, J. W. Templeton, and L. G. Adams. 2001. Stable transfection of the bovine *NRAMP1* gene into murine RAW264.7 cells: effect on *Brucella abortus* survival. *Infect. Immun.* **69**:3110–3119.
- Bettini, S., and L. Gradoni. 1986. Canine leishmaniasis in the Mediterranean area and its implications for human leishmaniasis. *Insect Sci. Appl.* **7**:241–245.
- Blackwell, J. M. 1996. Structure and function of the natural-resistance-associated macrophage protein (Nramp1), a candidate protein for infectious and autoimmune disease susceptibility. *Mol. Med. Today* **2**:205–211.
- Blackwell, J. M., C. H. Barton, J. K. White, S. Searle, A. M. Baker, H. Williams, and M. A. Shaw. 1995. Genomic organization and sequence of human NRAMP gene: identification and mapping of a promoter region polymorphism. *Mol. Med.* **1**:194–205.
- Böyum, A. 1968. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **21**:77–89.
- Breen, M., R. Thomas, M. M. Binns, N. P. Carter, and C. F. Langford. 1999. Reciprocal chromosome painting reveals detailed regions of conserved synteny between the karyotype of the domestic dog (*Canis familiaris*) and human. *Genomics* **61**:145–155.
- Bruner, R. M., M. Henke, G. Guerin, T. Goldammer, H. M. Seyfert, and M. Schwerin. 1994. The macrophage expressed variant of the bovine lysozyme-encoding gene maps to chromosome 5q23. *Mamm. Genome* **5**:834–835.
- Buu, N., F. Sánchez, and E. Schurr. 2000. The Bcg host-resistance gene. *Clin. Infect. Dis.* **31**:S81–S85.
- Cabral, M., J. E. O'Grady, S. Gomes, J. C. Sousa, H. Thompson, and J. Alexander. 1998. The immunology of canine leishmaniasis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. *Vet. Parasitol.* **76**:173–180.
- Cellier, M., G. Govoni, S. Vidal, T. Kwan, N. Groulx, J. Liu, F. Sanchez, E. Skamene, E. Schurr, and P. Gros. 1994. Human natural resistance-associated macrophage protein: cDNA cloning, chromosomal mapping, genomic organisation, and tissue-specific expression. *J. Exp. Med.* **180**:1741–1752.
- Cellier, M., G. Privé, A. Belouchi, T. Kwan, V. Rodrigues, W. Chia, and P. Gros. 1995. Nramp defines a family of membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:10089–10093.
- Cervino, A. C., S. Lakiss, O. Sow, and A. V. Hill. 2000. Allelic association between the *NRAMP1* gene and susceptibility to tuberculosis in Guinea-Conakry. *Ann. Hum. Genet.* **64**:507–512.
- Dedet, J. P., and F. Pratlong. 2000. *Leishmania*, *Trypanosoma* and monoxenous trypanosomatids as emerging opportunistic agents. *J. Eukaryot. Microbiol.* **47**:37–39.
- Feng, J., Y. Li, M. Hashad, E. Schurr, P. Gros, L. G. Adams, and J. W. Templeton. 1996. Bovine natural resistance associated macrophage protein 1 (*Nramp1*) gene. *Genome Res.* **6**:956–964.
- Ferrer, L., L. Solano-Gallego, M. Arboix, and J. Alberola. Evaluation of the specific immune response in dogs infected by *Leishmania infantum*. *Adv. Vet. Dermatol.*, in press.
- Forbes, J. R., and P. Gros. 2001. Divalent-metal transport by NRAMP proteins at the interface of host-pathogen interactions. *Trends Microbiol.* **9**:397–407.
- Ge, L., E. F. Remmers, Y. Du, and R. L. Wilder. 1996. Genomic cloning and genetic mapping of the rat *Nramp1* (Bcg) gene on chromosome 9. *Mamm. Genome* **7**:856–857.
- Govoni, G., S. Gauthier, F. Billia, N. N. Iscove, and P. Gros. 1997. Cell-specific and inducible *Nramp1* gene expression in mouse macrophages in vitro and in vivo. *J. Leukoc. Biol.* **62**:277–286.

21. Govoni, G., S. Vidal, M. Cellier, P. Lepage, D. Malo, and P. Gros. 1995. Genomic structure, promoter sequence, and induction of expression of the mouse *Nramp1* gene in macrophages. *Genomics* 27:9–19.
22. Gruenheid, S., E. Pinner, M. Desjardins, and P. Gros. 1997. Natural resistance to infection with intracellular pathogens: the *Nramp1* protein is recruited to the membrane of the phagosome. *J. Exp. Med.* 185:717–730.
23. Horin, P., I. Rychlik, J. W. Templeton, and L. G. Adams. 1999. A complex pattern of microsatellite polymorphism within the bovine *NRAMP1* gene. *Eur. J. Immunogenet.* 26:311–313.
24. Hu, J., N. Bumstead, P. Barrow, G. Sebastiani, L. Olien, K. Morgan, and D. Malo. 1997. Resistance to salmonellosis in the chicken is linked to *NRAMP1* and *TNC*. *Genome Res.* 7:693–704.
25. Kotze, M. J., J. N. P. de Villiers, R. N. Rooney, J. J. Grobbelaar, E. P. G. Mansvelt, C. S. H. Bouwens, J. Carr, I. Stander, and L. du Plessis. 2001. Analysis of the *NRAMP1* gene implicated in iron transport: association with multiple sclerosis and age effects. *Blood Cells Mol. Dis.* 27:44–53.
26. Kumay, S., K. Tamura, I. Jakobsen, and M. Nei. 2001. MEGA 2: molecular evolutionary genetics analysis software. Arizona State University, Tempe.
27. Lang, T., E. Prina, D. Sibthorpe, and J. Blackwell. 1997. *Nramp1* transfection transfers Ity/Lsh/Bcg-related pleiotropic effects on macrophage activation: influence on antigen processing and presentation. *Infect. Immun.* 65:380–386.
28. Leclercq, V., M. Lebastard, Y. Belkaid, J. Louis, and G. Milton. 1996. The outcome of the parasitic process initiated by *Leishmania infantum* in laboratory mice: a tissue-dependent pattern controlled by the Lsh and MHC loci. *J. Immunol.* 157:4537–4545.
29. Lee, P. L., T. Gelbart, C. West, C. Halloran, and E. Beutler. 1998. The human *Nramp2* gene: characterization of the gene structure, alternative splicing, promoter region and polymorphisms. *Blood Cells Mol. Dis.* 24:199–215.
30. Liu, J., T. M. Fujiwara, N. T. Buu, F. O. Sánchez, M. Cellier, A. J. Paradis, D. Frappier, E. Skamene, P. Gros, K. Morgan, and E. Schurr. 1995. Identification of polymorphisms and sequence variants in the human homologue of the mouse natural resistance-associated macrophage protein gene. *Am. J. Hum. Genet.* 56:845–853.
31. Malo, D., K. Vogan, S. Vidal, J. Hu, M. Cellier, E. Schurr, A. Fuks, N. Bumstead, K. Morgan, and P. Gros. 1994. Haplotype mapping and sequence analysis of the mouse *Nramp* gene predict susceptibility to infection with intracellular parasites. *Genomics* 23:51–61.
32. Matisse, T. C., M. Perlin, and A. Chakravarti. 1994. Automated construction of genetic linkage maps using an expert system (MultiMap): a human genome linkage map. *Nat. Genet.* 6:384–390.
33. Matthews, G. D., and A. M. Crawford. 1998. Cloning, sequencing and linkage mapping of the *NRAMP1* gene of sheep and deer. *Anim. Genet.* 29:1–6.
34. Mellersh, C. S., C. Hitte, M. Richman, F. Vignaux, C. Priat, S. Jouquand, P. Werner, C. André, S. DeRose, D. F. Patterson, E. A. Ostrander, and F. Galibert. 2000. An integrated linkage-radiation hybrid map of the canine genome. *Mamm. Genome* 11:120–130.
35. Pinelli, E., R. Killick-Kendrick, J. Wagenaar, W. Bernadina, G. Del Real, and J. Ruitenbergh. 1994. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect. Immun.* 62:229–235.
36. Pinelli, E., V. Rutten, and E. J. Ruitenbergh. 1999. Cellular immune responses in canine leishmaniasis, p. 60–65. In R. Killick-Kendrick (ed.), *Canine leishmaniasis: an update*. Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum.
37. Priat, C., C. Hitte, F. Vignaux, C. Renier, Z. Jiang, S. Jouquand, A. Chéron, C. André, and F. Galibert. 1998. A whole genome radiation hybrid map of the dog genome. *Genomics* 54:361–378.
38. Riera, C., J. E. Valladares, M. Gállego, M. J. Aisa, S. Castillejo, R. Fisa, N. Ribas, J. Carrió, J. Alberola, and M. Arboix. 1999. Serological and parasitological follow-up in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum* and treated with meglumine antimoniate. *Vet. Parasitol.* 84:33–47.
39. Roura, X., A. Sánchez, and L. Ferrer. 1999. Diagnosis of canine leishmaniasis by a polymerase chain reaction technique. *Vet. Rec.* 144:262–264.
40. Ryu, S., Y. K. Park, G. H. Bai, S. J. Kim, S. N. Park, and S. Kang. 2000. 3' UTR polymorphisms in the *NRAMP1* gene are associated with susceptibility to tuberculosis in Koreans. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 4:577–580.
41. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
42. Sanjeevi, C. B., E. N. Miller, P. Dagadghao, I. Rumba, A. Shtauvere, A. Denisova, D. Clayton, and J. M. Blackwell. 2000. Polymorphism at *NRAMP1* and *D2S1471* loci associated with juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 43:1397–1404.
43. Schurr, E., E. Buschman, D. Malo, P. Gros, and E. Skamene. 1990. Immunogenetics of mycobacterial infections: mouse-human homologies. *J. Infect. Dis.* 161:634–639.
44. Searle, S., and J. M. Blackwell. 1999. Evidence for a functional repeat polymorphism in the promoter of the human *NRAMP1* gene that correlates with autoimmune versus infectious disease susceptibility. *J. Med. Genet.* 36:295–299.
45. Slappendel, R. J., and L. Ferrer. 1998. Leishmaniasis, p. 450–458. In C. E. Greene (ed.), *Infectious diseases of dog and cat*. The W. B. Saunders Co., Philadelphia, Pa.
46. Solano-Gallego, L., J. Llull, G. Ramos, C. Riera, M. Arboix, J. Alberola, and L. Ferrer. 2000. The Ibizian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. *Vet. Parasitol.* 90:37–45.
47. Solano-Gallego, L., P. Monell, M. Arboix, J. Alberola, and L. Ferrer. 2001. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *J. Clin. Microbiol.* 39:560–563.
48. Solbach, W., H. Moll, and M. Rölinghoff. 1991. Lymphocytes play the music but macrophage calls the tune. *Immunol. Today* 12:4–6.
49. Tuggle, C. K., C. B. Schmitz, and D. Gingerich-feil. 1997. Cloning of a pig full-length natural resistance associated macrophage protein (*NRAMP1*) cDNA. *J. Anim. Sci.* 75:277.
50. Valladares, J. E., C. Riera, J. Alberola, M. Gállego, M. Portús, C. Cristófol, C. Franquelo, and M. Arboix. 1998. Pharmacokinetics of meglumine antimoniate after administration of a multiple dose in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum*. *Vet. Parasitol.* 75:33–40.
51. Valladares, J. E., C. Riera, P. González-Ensenyat, A. Díez-Cascón, G. Ramos, L. Solano-Gallego, M. Gállego, M. Portús, M. Arboix, and J. Alberola. 2001. Long term improvement in the treatment of canine leishmaniasis using an antimony liposomal formulation. *Vet. Parasitol.* 97:15–21.
52. Vidal, S. M., D. Malo, K. Voyan, E. Skamene, and P. Gros. 1993. Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation a candidate for Bcg. *Cell* 73:469–485.
53. Vignaux, F., C. Hitte, C. Priat, J. C. Chuat, C. André, and F. Galibert. 1999. Construction and optimization of a dog whole genome radiation hybrid panel. *Mamm. Genome* 10:888–894.
54. Vignaux, F., C. Priat, S. Jouquand, C. Hitte, Z. Jiang, A. Chéron, C. Renier, C. André, and F. Galibert. 1999. Toward a dog radiation hybrid map. *J. Hered.* 90:62–67.

**Anàlisi del polimorfisme dels gens *DRB1* i *DQB1* del complex
principal d'histocompatibilitat del gos**

Introducció

Els gens de classe II del MHC codifiquen les proteïnes heterodimèriques de membrana que presenten els antigens processats als limfòcits T CD4+. En l'espècie canina s'ha descrit l'existència de dos gens A (*DRA* i *DQA*) (Sarmiento *et al.*, 1992; Wagner *et al.*, 1995), dos gens B (*DQB* i *DRB*) (Sarmiento *et al.*, 1993; Sarmiento & Storb, 1990) i dos pseudogens (*DRB2* i *DQB2*) (Wagner *et al.*, 1996a; Wagner *et al.*, 1998). Els gens *DRB* i *DQB* però, són els que presenten major variabilitat al·lèlica. Al moment de començar aquest treball hi havia descrits 20 al·lèls per al *DRB* (Francino *et al.*, 1997; Sarmiento *et al.*, 1990; Wagner *et al.*, 1996b) i 9 per al gen *DQB* (Polvi *et al.*, 1997; Sarmiento *et al.*, 1993).

El domini $\beta 1$ extracel·lular és el que presenta més elevat nivell de polimorfisme entre individus de la mateixa espècie que està concentrat en les zones hipervariables (HVRs) (Brown *et al.*, 1993). Aquest polimorfisme no solsament determina l'especificitat de la resposta immunitària, que està relacionada amb la resistència o susceptibilitat a determinades patologies, sinó que converteix aquests marcadors en òptims candidats per realitzar proves de paternitat i identificació individual. És necessari però, disposar d'un bon sistema de genotipat que permeti detectar, no tan sols tots els al·lèls descrits fins al moment, sinó també els nous al·lèls que vagin sorgint, per poder-los caracteritzar i avançar en l'estudi del polimorfisme existent en aquests loci. L'objectiu d'aquest estudi és analitzar el polimorfisme dels gens *DRB1* i *DQB1* del gos, per als quals s'han descrit 3 i 6 al·lèls nous respectivament.

Material i mètodes

Per tal d'analitzar el polimorfisme dels gens *DRB1* i *DQB1*, s'ha realitzat la tècnica de PCR-RFLP en el segon exó dels dos gens, que és el que codifica pel domini $\beta 1$ extracel·lular, seguint el protocol prèviament descrit per Francino i col·laboradors (Francino *et al.*, 1996; Francino *et al.*, 1997). Per dur a terme aquest anàlisi s'han

utilitzat deu famílies, composades de pare, mare i un descendent, de diferents races de gossos.

Els productes de PCR que presentaren nous patrons de RFLP han estat clonats mitjançant el PCR-Script AmpSK(+) Cloning Kit (Stratagene). Dos clons independents de cada patró han estat seqüenciats utilitzant el mètode dideoxi (BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit- PE Byosystems) amb terminadors fluorescents en un seqüenciador automàtic (ABI-PRISM 310, Applied Biosystems).

Resultats i discussió

El polimorfisme del segon exó dels gens *DRB1* i *DQB1* del gos s'ha analitzat per PCR-RFLP en deu famílies de diferents races, comprovant-se els seus patrons de segregació. L'anàlisi dels patrons de segregació és el que permet, en cadascun dels casos, l'assignació dels al·lels, definida per la combinació dels patrons obtinguts de la digestió de l'exó 2 amb diferents enzims de restricció. Aquesta combinació quan no es tenen famílies és més complicada d'assignar. D'altra banda l'anàlisi de segregació unit a l'alt nivell de polimorfisme que presenten aquests gens permet resoldre casos de paternitat (Figura 1).

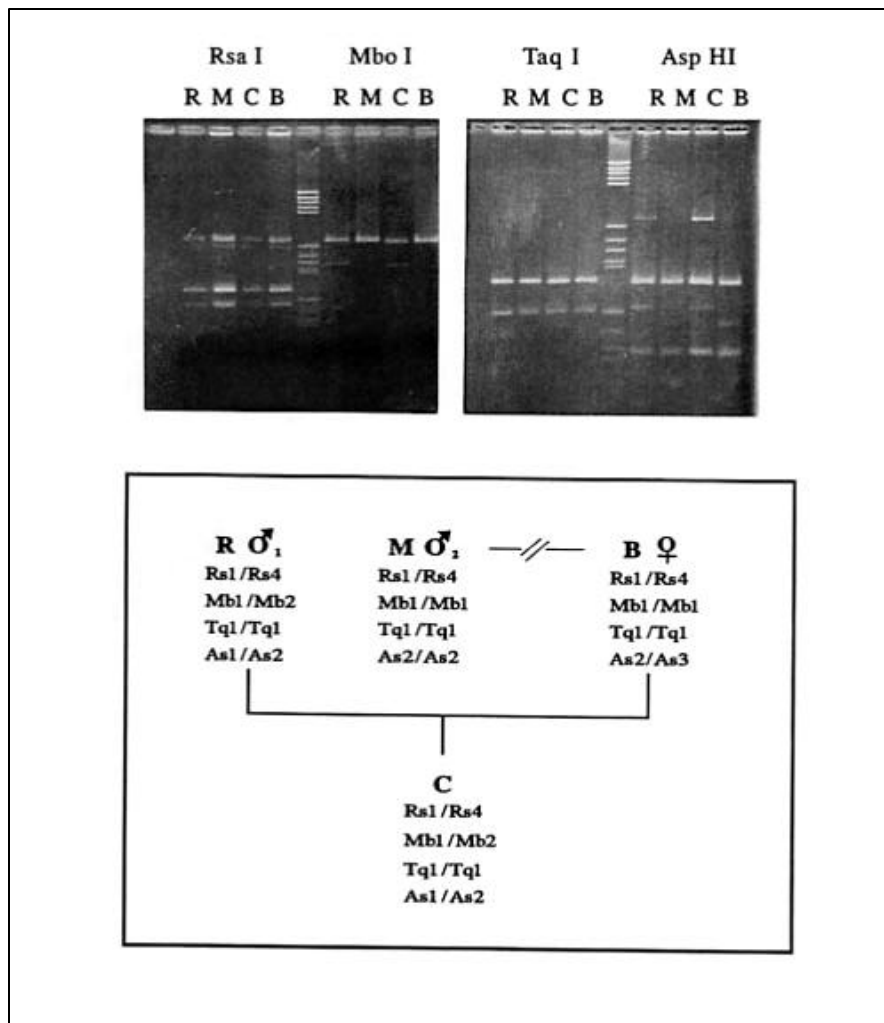
Els productes de PCR corresponents a nous patrons de RFLP han estat clonats i seqüenciats permetent identificar 3 nous al·lels per al gen *DRB1* (amb nombre d'accés al GenBank/EMBL: AF016910, AF016911 i AF016912) i 6 nous al·lels per al gen *DQB1* (amb nombre d'accés al GenBank/EMBL: AF016904, AF016905, AF016906, AF016907, AF016908 i AF016909). Les seqüències nucleotídiques han estat traduïdes a seqüències aminoacídiques i comparades amb les 20 seqüències DRB i les 9 seqüències DQB canines caracteritzades prèviament (Figures 2 i 3 respectivament).

Com es pot veure en la Figura 3, l'al·lel DQB1*0102 és idèntic a l'al·lel DQB1*0101 de la posició 14 a la 91, però incorpora 5 aminoàcids nous en la primera zona hipervariable. D'igual manera, l'al·lel DQB1*0203 és idèntic als al·lels DQB1*0201 i DQB1*0202 en

les mateixes posicions i l'al·lel DQB1*0303 és idèntic als al·lels DQB1*0301 i DQB1*0302 prèviament descrits. Aquest fet pot plantejar el dubte d'estar repetint alguna seqüència, ja que fins al moment les diferents seqüències

Figura 1. Anàlisi de segregació dels patrons de PCR-RFLP per al gen *DRB1*.

L'assignació de l'al·lel corresponent del gen *DRB1* es fa mitjançant la combinació del patró de digestió de quatre enzims de restricció (RsaI, MboI, TaqI i AspHI) sobre l'exó 2 del gen. En la figura es pot veure com l'anàlisi de segregació dels patrons permet descartar un cas de falsa paternitat.



disponibles dels al·lels per al gen *DQB1* tenen una longitud heterogènia, dificultant l'assignació de nous al·lels. És per això i per la contínua aparició de noves seqüències, que es va creure necessària la formació d'un comitè de nomenclatura per definir les normes per l'acceptació i estandarització de nous al·lels i gens del MHC caní, així com per assignar nom a totes les seqüències existents fins al moment. El treball que incorpora aquest compendi de nomenclatura es mostra en l'annex 1. Recentment s'ha publicat el segon treball del comitè de nomenclatura per al MHC caní, centrat bàsicament en els gens de classe I i en la nomenclatura dels gens del MHC d'altres cànids (Kennedy *et al.*, 2001).

És interessant destacar l'elevat nivell de polimorfisme observat en els diferents al·lels d'un mateix gen, arribant a nivells de divergència de fins al 17.9% i 18.8% en els dominis $\beta 1$ codificats pels gens *DQB1* i *DRB1* respectivament.

Els residus polimòrfics s'agrupen principalment en les regions hipervariables. Tal com es pot veure en l'al·lel *DQB1*0901*, que presenta un canvi únic (L→V) a la posició 85, aquests canvis aminoacídics no solen ser conservatius, conferint un elevat grau de variabilitat en les proteïnes codificades en el lloc d'unió de l'antigen. Sembla ser que el polimorfisme d'aquesta regió està dirigit per selecció positiva i podria ser el responsable de l'especificitat per pèptids de diferent estructura (Hughes & Yeager, 1998).

D'altra banda, cal destacar que en un estudi realitzat posteriorment, on es varen genotipar 44 gossos no emparentats de la raça Rottweiler, es varen detectar nivells de polimorfisme molt baixos per al gen *DQB1* (Altet *et al.*, 1997). En aquesta població únicament es varen observar dos dels set patrons de restricció descrits per a l'enzim de restricció *Rsa I*, amb unes freqüències molt equilibrades, mentre que en la població control analitzada, formada només per 19 gossos de diferents races, van aparèixer cinc dels set patrons de restricció existents. Aquesta disminució de la variabilitat

podria ser conseqüència de l'homogeneïtat genètica present en les races pures de gossos degut a l'alta consaguïnitat de les poblacions (Mellersh & Ostrander, 1997), o a un possible predomini de certs patrons, i per tant d'al·lels concrets, en algunes races canines que podria estar relacionada amb la diferent resistència o susceptibilitat que presenten les diferents races a determinades malalties relacionades amb el sistema immunitari.

Referències

- Altet, L., Francino, O. & Sánchez, A. (1997).** Utilización de marcadores polimórficos para identificación y pruebas de paternidad en poblaciones consanguíneas. *ITEA* **18**, 302-304.
- Brown, J. H., Jardetzky, T. S., Gorga, J. C. & al., e. (1993).** Three dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DRB1. *Nature* **364**, 33-39.
- Francino, O., Altet, L., Amills, A. & Sánchez, A. (1996).** Characterization of the polymorphism in the DRB and DQB genes of the canine MHC. *Animal Genetics* **27**, 49.
- Francino, O., Amills, M. & Sánchez, A. (1997).** Canine Mhc DRB1 genotyping by PCR-RFLP analysis. *Animal Genetics* **28**, 41-45.
- Hughes, A. L. & Yeager, M. (1998).** Natural selection at major histocompatibility complex loci of vertebrates. *Annual Reviews of Genetics* **32**, 415-435.
- Kennedy, L. J., Altet, L., Angles, J. M., Barnes, A., Carter, S. D., Francino, O., Gerlach, J. A., Happ, G. M., Ollier, W. E. R., Polvi, A., Thomson, W. & Wagner, J. L. (2000).** Nomenclature for factors of the Dog Major Histocompatibility system (DLA), 1998: first report of the ISAG DLA Nomenclature Committee. *Animal Genetics* **31**, 52-61.

- Kennedy, L. J., Angles, J. M., Barnes, A., Carter, S. D., Francino, O., Gerlach, J. A., Happ, G. M., Ollier, W. E. R., Thomson, W. & Wagner, J. L. (2001).** Nomenclature for factors of the major histocompatibility system (DLA), 2000: second report of the ISAG DLA Nomenclature Committee. *Animal Genetics* **32**, 193-199.
- Mellersh, C. S. & Ostrander, E. A. (1997).** The canine genome. *Advances in Veterinary Medicine* **40**, 191-216.
- Polvi, A., Gerden, O. A., Elwood, C. M., Sorensen, S. H., Batt, R. M., Mäki, M. & Partanen, J. (1997).** Canine major histocompatibility complex genes DQA and DQB in Irish setter dogs. *Tissue Antigens* **49**, 236-243.
- Sarmiento, U. M., DeRose, S., Sarmiento, J. I. & Storb, R. (1992).** Allelic variation in the DQ subregion of the canine major histocompatibility complex: I. DQA. *Immunogenetics* **35**, 416-420.
- Sarmiento, U. M., DeRose, S., Sarmiento, J. I. & Storb, R. (1993).** Allelic variation in the DQ subregion of the canine major histocompatibility complex: II. DQB. *Immunogenetics* **37**, 148-152.
- Sarmiento, U. M., Sarmiento, J. I. & Storb, R. (1990).** Allelic variation in the DR subregion of the canine major histocompatibility complex. *Immunogenetics* **32**, 13-19.
- Sarmiento, U. M. & Storb, R. (1990).** Nucleotide sequence of a dog DRB cDNA clone. *Immunogenetics* **31**, 396-399.
- Wagner, J. L., Burnett, R. C. & Storb, R. (1996a).** Molecular analysis of the DLA DR subregion. *Tissue Antigens* **48**, 549-553.
- Wagner, J. L., Burnett, R. C., Works, J. D. & Storb, R. (1996b).** Molecular analysis of DLA-DRBB1 polymorphism. *Tissue Antigens* **48**, 554-561.

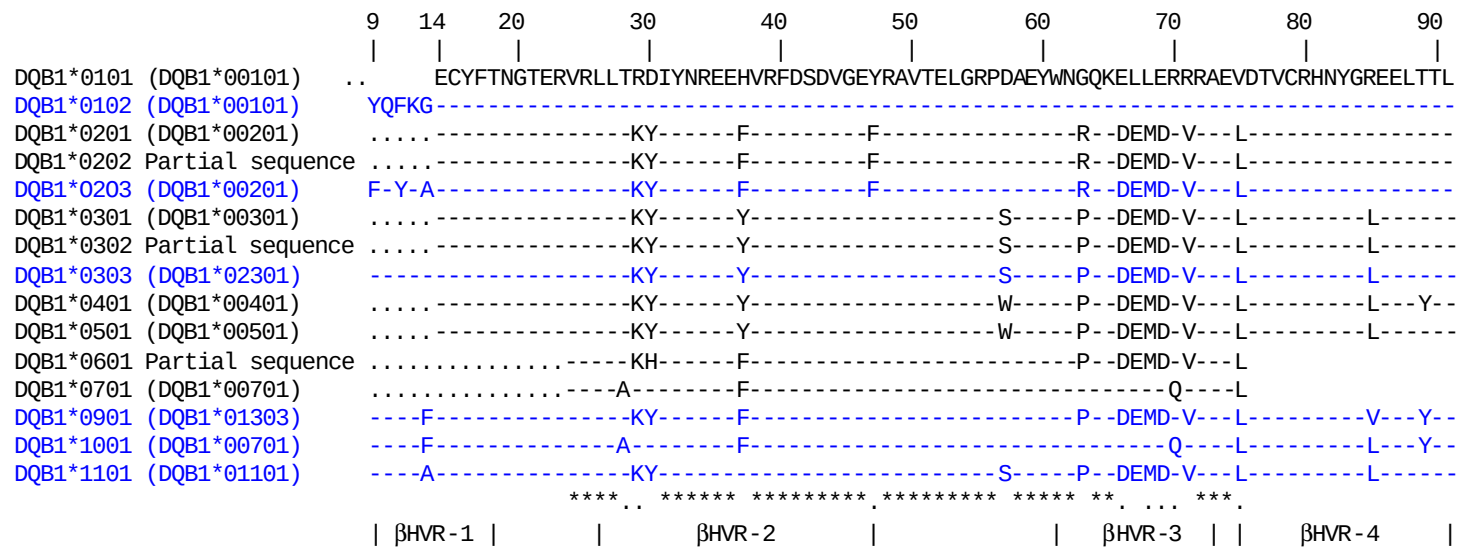
Wagner, J. L., DeRose, S. A., Burnett, R. C. & Storb, R. (1995). Nucleotide sequence and polymorphism analysis of canine DRA cDNA clones. *Tissue Antigens* **45**, 284-287.

Wagner, J. L., Hayes-Lattin, B., Works, J. D. & Storb, R. (1998). Molecular analysis and polymorphism of the DLA-DQB genes. *Tissue Antigens* **52**, 242-250.

Figura 2. Aliniament de les seqüències aminoacídiques del domini b1 de les seqüències DRB1 canines. En blau es mostren els nous al·lels descrits en aquest treball. A la dreta de les seqüències es mostra el nom segons la nomenclatura actual (Kennedy et al. 2000).

	8	20	30	40	50	60	70	80	
DRB1*DW3									(DRB1*00102)
DRB1*DW4	LEVAKSECYFTNGTERTVRVFVERYIHNREEFVRFSDSVGFEFRAVTELGRPVAESWNGQKEILEQERATVDTYCRHNYGVI								
DRB1*D9	-----Y-----								
DRB1*D4	-----A-----N-----Y---D---R--F--RK- -A-----								
DRB1*D7	EYQF-P-H-	-H-	-H-	-H-	-H-	-H-	-H-	-H-	(DRB1*00401)
DRB1*D6	--A-H-	-H-	-Y---	-Y---	-Y---	-D-Y-	P--L-	R-G- -A-----G	(DRB1*00701)
DRB1*D8	--A-H-	-H-	-Y---	-Y---	-Y---	-D-Y-	P--L-	R-G- -A-----G	(DRB1*00601)
DRB1*DW8	VKMY-A-H-	-YLM-D-Y-	-H-P-	-Y-	-D-Y-	-R-K-	-A-	-G	(DRB1*00801)
DRB1*DW1	--MV-F-H-	-LLV-D-Y-	-H-P-	-Y-	-D-Y-	-L--R-	-E--V-----	(DRB1*01501)	
DRB1*D10	--MV-F-H-	-YLA-D-Y-	-IL-	-Y-	-I----	R--R-	A-----	(DRB1*00201)	
DRB1*D11	VYQF-P-H-	-Y-P-	-L-----	-R-----	-R-----	-R-----	-R-G	(DRB1*010012)	
DRB1*D11	VKMF-A-H-	-LLA-S-Y-	-RD-	-R--L--R-	-A-----	-R-G	(DRB1*01101)		
DRB1*D2A	--MV-F-H-	-YLA-D-Y-	-IL-	-Y-	-I----	R--R-	-A-----	(DRB1*00202)	
DRB1*D13	VYQF-P-H-	-D--R--L--	-A-----	-R-G	(DRB1*01301)				
DRB1*D14	--ML-----	-N-----	-Y-----	-D-Y-	P--L-	RA-A-----	G	(DRB1*01401)	
DRB1*D17	VKMF-A-H-	-LA-S-Y-	-Y-----	-RD-	-R--L-	RA-A-----	(DRB1*01701)		
DRB1*D18	-----H-	-Y-----	-D--R--L-	RK-E-----	(DRB1*01801)				
DRB1*D19	VKMF-A-H-	-LA-S-Y-	-Y-----	-RD-	-R--L-	RR-E-----	(DRB1*01901)		
DRB1*D20	-KMV-F-H-	-L--D-Y---	-Y-----	-Y-----	S--R--F--R-	E--V-----	G	(DRB1*02001)	
DRB1*D21	VKMF-A-H-	-LLA-S-Y-	-RD-	-R--L--R-	PA-----	-R-G	(DRB1*02101)		
DRB1*D22	VYQF-P-H-	-Y-----	-D-----	(DRB1*02201)					
DRB1*D23	--MV-F-H-	-LLV-D-Y-	-H-----	-Y-----	-D--R--L--R-	E--V-----	(DRB1*03001)		
DRB1*D24	--MV-F-H-	-LLV-D-Y-	-H-----	-Y-----	-D-Y-----	L--R-E--V-----	Partial sequence		
DRB1*D25	VYQF-P-H-	-Y-----	-L-----	(DRB1*010011)					
	* * *	*****	. * * ****	. *****	. *****	** ** *	*, *, *	*** ***** *	
	βHVR-1	βHVR-2	βHVR-3						

Figura 3. Aliniament de les seqüències aminoacídiques del domini b1 de les seqüències DQB1 canines. En blau es mostren els nous al·lels descrits en aquest treball. Entre parèntesi es mostra el nom segons la nomenclatura actual (Kennedy et al. 2000).



discusió

Els resultats exposats en aquest treball pretenen ser una aportació en l'avenç de la genètica canina, iniciant l'estudi dels factors genètics que poden influir en la leishmaniosi. Per dur a terme aquesta tasca, i tenint en compte l'estat encara precari de la genòmica canina, s'ha realitzat la identificació i caracterització de possibles gens candidats. En aquest apartat discutirem com la identificació i caracterització estructural de gens candidats a nivell molecular és un primer pas necessari per portar a terme posteriors treballs d'associació que permetin esbrinar la implicació del gen en la malaltia i la seva funció.

1. Anàlisi de marcadors

L'alta homogeneïtat genètica present en les diferents races de gossos, degut a l'insistent manteniment dels estàndards de raça per part dels criadors, sovint assegura que un petit nombre de gens poden ser la causa d'una determinada malaltia en una raça concreta, essent un material molt valuós per al seu estudi (Wayne & Ostrander, 1999). A aquesta particularitat encara es pot afegir la possibilitat de tenir extenses famílies, sovint complicat en estudis humans, i la possibilitat de fer creuaments dirigits per augmentar la informativitat en qualsevol estudi de lligament o d'associació que es vulgui dur a terme. El problema de les famílies en el món dels gossos però, és la fiabilitat de les mateixes, ja que fins i tot els criadors més disciplinats poden errar en l'anotació d'algunes dades. A més, s'ha de remarcar que no existeix cap control de les genealogies per part dels clubs o de les institucions cinològiques corresponents, anul·lant qualsevol credibilitat dels pedigrís existents.

L'utilització de microsatèl·lits per resoldre disputes de paternitat s'ha demostrat eficaç en l'espècie canina (Binns *et al.*, 1995; Fredholm & Wintero, 1996; Zajc *et al.*, 1994; Zajc & Sampson, 1996). L'homogeneïtat genètica present en les diferents races, tant aventatjosa per l'estudi de malalties però, pot disminuir els alts nivells de

polimorfisme d'aquests marcadors, sobretot quan es volen analitzar extenses famílies amb certs nivells de consanguinitat. És per això que ens varem interessar en analitzar el polimorfisme de 10 microsatèl·lits en una família de tres generacions formada per 360 Rottweilers amb uns nivells màxims de consanguinitat del 16% (R). Els resultats varen ser comparats amb dues poblacions formades per gossos de pura raça no emparentats (Golden retriever –G– i Labrador retriever –L–) i una població mixta formada per 95 gossos de 24 races diferents (P), el tipus de poblacions que s'havia utilitzat fins al moment en la genètica canina per analitzar nivells de polimorfisme i freqüències al·lèliques de diferents microsatèl·lits.

Deu microsatèl·lits poden considerar-se insuficients per dur a terme identifications individuals i proves de paternitat en poblacions consanguínies. De fet, Sutton i col·laboradors descriuen la necessitat d'utilitzar dos sistemes de genotipat diferents per tal de resoldre aquest tipus d'anàlisis en aquestes poblacions (Sutton *et al.*, 1998). És interessant destacar però, que els valors de l'índex de polimorfisme (PIC) obtinguts pels 10 microsatèl·lits analitzats en la població consanguínia R no mostraren diferències significatives envers les poblacions d'animals no emparentats G i L. A més, els valors obtinguts resultaren similars als obtinguts prèviament per Zajc i col·laboradors analitzant 19 microsatèl·lits en tres poblacions d'animals de pura raça no emparentats (Zajc *et al.*, 1997; Zajc & Sampson, 1999). Els resultats confirmen que deu microsatèl·lits són suficients per realitzar aquests tipus de proves i que els microsatèl·lits emprats presenten uns nivells de polimorfisme en la població consanguínia similars als obtinguts per aquests i d'altres microsatèl·lits en poblacions d'animals no relacionats de pura raça.

D'altra banda, sí que existí una diferència significativa dels valors de PIC entre la població mixta (P) i les tres poblacions d'animals de pura raça (R, G i L). Com ja havíem esmentat a la introducció, els treballs publicats fins al moment d'anàlisi de

microsatèl·lits en poblacions de gossos no emparentats d'una sola raça mostren una disminució de la variabilitat respecte aquells que analitzen poblacions mixtes de gossos (Fredholm & Wintero, 1995; Zajc *et al.*, 1997; Sutton *et al.*, 1998; Morera *et al.*, 1999; Zajc & Sampson, 1999). En aquestes poblacions mixtes és present una gran heterogeneïtat genètica ja que estan formades per individus de diferents races amb al·lels característics per cadascun dels marcadors que resulten en uns valors de PIC elevats, en el nostre cas de 0.70. És doncs important remarcar que les dades de polimorfisme d'aquestes poblacions heterogènies no poden ser extrapolades a races concretes. Amb l'anàlisi dels mateixos marcadors les nostres poblacions de pura raça varen tenir uns valors de PIC que oscil·laven entre 0.03 i 0.69, i només un 40% d'aquests foren superiors a 0.50. La diferència d'aquests valors entre la població P i les poblacions G, L i R radica principalment en el nombre d'al·lels present, mentre que el diferent valor existent entre les poblacions de pura raça per a cada marcador radica en la distribució de les freqüències al·lèliques més que en la presència d'al·lels concrets, fenomen que ja havia estat descrit prèviament (Fredholm & Wintero, 1995; Zajc *et al.*, 1997).

Curiosament, tot i que s'ha descrit que els microsatèl·lits amb al·lels més grans, normalment els tetranucleòtids, presenten una inestabilitat superior generant més fàcilment nous al·lels (Francisco *et al.*, 1996), en el nostre cas, el microsatèl·lit més llarg analitzat no fou el més polimòrfic en cap de les poblacions.

Aquests resultats remarquen la necessitat de descriure freqüències al·lèliques de diferents microsatèl·lits en cadascuna de les races de gossos, evitant estereotips o extrapolacions de resultats d'altres treballs. Només així es podrà escollir un panell de marcadors altament polimòrfics per resoldre casos d'identificació individual i control de paternitats útil per a les diferents races.

Analitzant els resultats en conjunt veiem que tot i que la població consanguínea presenta una reducció del polimorfisme quan es compara amb la població mixta, aquest és similar al polimorfisme existent en les poblacions d'animals no emparentats de pura raça analitzades en aquest treball i en d'altres, concloent que els 10 microsatèl·lits analitzats són suficients per resoldre casos d'identificació individual i control de paternitats en extenses famílies amb un cert grau de consanguinitat.

Aquest sistema d'identificació individual i test de paternitat ha estat optimitzat per ser dut a terme d'una manera senzilla al laboratori, ja que des de 1996 es realitza d'una manera rutinària en el Servei Veterinari de Genètica Molecular de la nostra Unitat. Els deu microsatèl·lits s'amplifiquen mitjançant dues reaccions múltiples de PCR i són analitzats posteriorment amb un sistema semiautomatitzat d'electroforesi capil·lar. Fins la data d'avui han estat analitzats aproximadament 1000 animals que engloben disputes esporàdiques de paternitat, alguna identificació individual aïllada i majoritàriament gossos de diferents criadors que de manera regular identifiquen els seus animals per dur un control inequívoc dels seus pedigrís. Això dóna un valor afegit als cadells que venen al verificar els seus progenitors, però bàsicament, amb la recent aparició del primer mapa genètic caní (Breen, et al., 2001), constitueixen un material genètic molt valuós per a l'estudi de les diferents patologies que puguin estar segregant en cadascun dels pedigrís. L'alta homogeneïtat genètica de les diferents races de gossos que hem comentat anteriorment, junt amb l'obtenció d'extenses famílies verificades genèticament i un mapa genètic suficientment dens de marcadors com per cobrir tot el genoma accelerarà molt la identificació de gens responsables de diferents malalties, en molts casos similars a les d'altres mamífers, incloent l'home.

2. Gens candidats a la leishmaniosi canina.

La manca del mapa genètic al començar aquest estudi ens va obligar a analitzar els possibles factors genètics involucrats en la diferent resistència o susceptibilitat a la leishmaniosi canina basant-nos en l'estratègia de gens candidats. Com hem comentat a la introducció aquesta estratègia es basa en aprofitar els coneixements ja existents en altres espècies on l'estudi genètic està més avançat. És en ratolí, donat la facilitat d'obtenir línies isogèniques i consanguínies, on s'ha demostrat que la primera barrera de resistència innata o natural vers el paràsit *L.infantum* està sota el control del gen *Nramp1*, mentre que la progressió de la malaltia està sota la influència dels gens del MHC (Leclercq *et al.*, 1996).

2.1. *Nramp1*: caracterització genètica i proteica.

El gen *Nramp1* bombeja ions metàl·lics fora del fagolisosoma, imprescindibles per la supervivència del paràsit, impedit la seva replicació dins el macròfag (Jabado *et al.*, 2000). La immunitat natural, a part de ser la primera línia de defensa en els animals superiors, juga també un paper fonamental activant i instruint la resposta immunitària específica posterior (Song *et al.*, 2000). De fet, la gran quantitat de funcions cel·lulars que requereixen d'ions com a cofactors podria explicar els múltiples efectes pleiotròpics que se li han atribuït a aquest gen i que regulen l'activació del macròfag i la seva capacitat de processar i presentar els antígens (Blackwell *et al.*, 2000). Aquests efectes pleiotròpics tenen un paper rellevant en la modulació de la subseqüent resposta immunitària en el gos, que pot ser predominantment cel·lular o humoral, i que juga un paper fonamental en la diferent resistència o susceptibilitat a la leishmaniosi (Pinelli *et al.*, 1994; Cabral *et al.*, 1998; Solano-Gallego *et al.*, 2000).

El macròfag juga un paper fonamental en el control del paràsit en la leishmaniosi canina (Solbach *et al.*, 1991; Alexander & Russell, 1992). Un dels mecanismes que té el macròfag per lluitar contra el paràsit són els radicals lliures d'oxigen (O^- i H_2O_2) i l'òxid nítric que actuen com a potents agents antimicrobials (Bogdan & Röllinghoff, 1999; Pinelli *et al.*, 2000). Una disminució dels metalls pesats dins el fagosoma pot perjudicar els microorganismes intracel·lulars, ja que aquests ions són cofactors essencials per als enzims superòxid dismutasa i catalases, mecanismes de defensa dels patògens contra els radicals lliures d'oxigen (Agranoff & Krishna, 1998). D'altra banda, els efectes pleiotròpics descrits per al gen *Nramp1* inclouen el control d'aquestes formes reactives de l'oxigen (Denis *et al.*, 1988; Barton *et al.*, 1995) i la regulació de l'expressió de l'enzim iNOS i el control del fluxe de L-arginina, ambdós components necessaris per l'alliberació d'òxid nítric (Barton *et al.*, 1995).

El macròfag també juga un paper clau com a cèl·lula presentadora d'antigen (APC), determinant si la resposta immunitària cel·lular conferirà protecció vers el paràsit o permetrà que el patògen sobrevisqui a l'interior de la cèl·lula, essent un dels factors determinants els nivells d'expressió de les molècules del MHC (Solbach *et al.*, 1991). Com ja hem comentat a la introducció, un altre dels efectes del gen *Nramp1* és el control de l'expressió de les molècules de classe II del MHC (Kaye & Blackwell, 1989; Lang *et al.*, 1997).

Per tant, el *Nramp1* ens semblà un atractiu gen candidat, no només basant-nos en l'associació prèviament descrita en ratolí, sinó també basant-nos en la seva funció i la seva possible implicació en el control de la infecció, si aquesta funció es mantingués. L'existència de gens *Nramp1* en organismes filogenèticament tant distanciat, amb uns nivells de conservació estructural de la proteïna mantinguts al llarg de l'evolució, suggereixen aquesta funció comú (Cellier *et al.*, 1995).

La identificació i caracterització del gen *Nramp1* caní, centrada primerament en la regió on havia estat localitzada la mutació del ratolí responsable de la diferent susceptibilitat a diferents microorganismes intracel·lulars (Malo *et al.*, 1994), es va dur a terme mitjançant *primers* interespecífics dissenyats a partir de zones conservades de les regions codificants dels gens *Nramp1* disponibles en aquell moment. Aquests *primers*, degut a l'elevat nivell de conservació existent entre els diferents gens de la família *Nramp1*, ens van permetre identificar la presència d'aquest gen, no només en gos sinó en d'altres espècies on la seva existència era desconeguda fins al moment, com és el cas de l'ase, la cabra, el conill, el conill d'índies, el gat i el dofí, augmentant encara més la família de gens *Nramp1* descrits. L'amplificació específica del gen *Nramp1* en aquestes espècies fou demostrada mitjançant anàlisi d'hibridació utilitzant com a sonda el fragment de gos, prèviament seqüenciat. Els resultats obtinguts validen la utilització d'aquests *primers* ortòlegs de PCR, tant els utilitzats per aquesta primera aproximació com els dissenyats posteriorment per caracteritzar tot el gen, com una primera eina d'anàlisi del polimorfisme del gen *Nramp1* com a possible candidat responsable de la susceptibilitat a diferents malalties en diferents espècies de mamífers. L'amplificació del gen en diferents espècies animals permet alhora la utilització del *Nramp1* com a marcador de tipus I per dur a terme l'anàlisi comparatiu entre els genomes de diferents espècies animals (CATS, de *Comparative Anchor Tagged Sequences*), permetent avançar en el mapa genètic del gos, i d'altres espècies amb poca informació disponible, gràcies a la recerca de sintènies amb espècies que tenen un mapa genètic més dens i per tant més informatiu, com pot ser el de l'home o el ratolí (Lyons *et al.*, 1997; O'Briens *et al.*, 1993).

Gràcies a la col·laboració amb el laboratori de Recombinacions Genètiques de la Facultat de Medicina de Rennes, França, membres també del DogMap, el *Nramp1* caní va ser posicionat en el mapa genètic del gos. Utilitzant un panell de cèl·lules híbrides

irradiades (Vignaux *et al.*, 1999a; Vignaux *et al.*, 1999b), el *Nramp1* fou assignat al grup de lligament SRH11, localitzat al cromosoma CFA37 (Priat *et al.*, 1998; Breen *et al.*, 1999b), que inclou dos gens (*FN1* i *CD28*) que han estat posicionats també al cromosoma 2q35 en l'home i al cromosoma 1 en ratolí. Per tant, es pot assumir un grup de sintènia, delimitat pel gens *Nramp1* i *CD28*, conservat entre el gos, l'home i el ratolí, que pot ajudar a identificar i posicionar en gos altres gens localitzats ja en aquesta regió en algunes de les altres dues espècies, avançant així en el projecte DogMap.

Per tal d'identificar la presència en gos del canvi aminoacídic responsable de la disfunció del gen en ratolí, varem posar a punt un sistema de PCR-RFLP que identificava la transversió nucleotídica, G → A, que origina aquest canvi. El protocol de PCR-RFLP va ser analitzat en 88 gossos de cinc races diferents. Els resultats (Taula 1) ens permeteren localitzar una mutació intrònica, curiosament raça específica, i verificar que el residu Gly¹⁶⁹ està conservat en tots els gossos analitzats al igual que ho està en home, vaca, ovella i porc, remarcant la necessitat de cercar polimorfismes en altres regions del gen per determinar el vertader paper del gen *Nramp1* en la susceptibilitat a la leishmaniosi canina. De fet, tal i com s'observa en humans, no esperem una absoluta associació entre el *Nramp1* i la leishmaniosi, però sí una associació estadísticament significativa entre algun polimorfisme del gen i la susceptibilitat a la malaltia (Buu *et al.*, 2000).

La caracterització complerta del gen *Nramp1* caní s'extén 9 Kb que comprenen 700 parells de bases de regió promotora i 5' no codificant, 15 exons, l'últim dels quals engloba la regió 3' no codificant, i un microsatèl·lit, del tipus tetranucleòtid (TAAA)_n, localitzat a l'intró 1. La seqüència complerta del gen ha estat dipositada al GeneBank amb el nombre d'accés AF091049.

Taula 1. Anàlisi de l'exó 5 a l'exó 7 del gen *Nramp1* caní per PCR-RFLP.

RAÇA	N	sense mutació	Htz	amb mutació
Rottweiler	26	3	12	11
Podenc ibizenc	33	33		
Labrador retriever.	8	8		
Golden retriever	15	15		
West highland white T.	7	7		

Htz: heterozigot; sense mutació i amb mutació es refereix a la mutació intrònica identificada en el *Nramp1* caní.

El promotor no conté una clàssica TATA *box* que ens permetés localitzar l'origen de transcripció, però té un possible element iniciador, present sovint en gens sense TATA *box*, localitzat a la posició -180 del codó d'inici. Aquesta regió també conté diversos llocs de reconeixement per factors de transcripció involucrats en l'expressió teixit-específica o associats a la resposta específica del macròfag provocada per la inducció de diferents agents activadors. Entre aquests factors de transcripció s'inclouen 9 llocs de reconeixement per a l'IFN- γ i un per al LPS bacterià (NF-IL-6), que concorden amb l'activació de l'expressió prèviament descrita en ratolí per aquest gen (Govoni *et al.*, 1995). D'altra banda, estudis *in vitro* realitzats en porc, demostren que aquesta activació no es produeix de manera directa, sinó que les vies de les Proteïncinases mitogen-activades (MAPK) intervenen en la inducció de l'expressió del gen *Nramp1* en resposta a mediadors proinflamatoris com el TNF- α , IL-1 β i LPS (Zhang *et al.*, 2000a). L'activació de les vies MAPK provoquen la fosforilació i activació de diferents factors de transcripció, que inclouen la proteïna activadora 1 (AP1), el factor nuclear (NF) i la interleucina 6 (IL-6), que activen un gran ventall de gens que intervenen en la resposta immunitària i inflamatòria. El promotor del *Nramp1* caní

conté també diversos llocs de reconeixement pels factors de transcripció activats per aquesta via, suggerint una possible inducció similar de l'expressió del gen.

El gen *Nramp1* caní codifica per una proteïna de 547 aminoàcids amb una identitat de fins al 87% amb les proteïnes Nramp1 prèviament descrites en diferents espècies de vertebrats, conservant la mateixa estructura. La proteïna està formada per 12 dominis transmembrana (TM), 3 llocs de fosforilació per a la proteïna quinasa C (PKC), 2 llocs de glicosilació situats a l'exó 10 i el motiu consens de transport localitzat entre els dominis TM8 i TM9, codificats pels exons 11 i 12 respectivament. La conservació d'aquests motius estructurals de la proteïna denoten una funció comú del conjunt de proteïnes de la mateixa família (Cellier *et al.*, 1995), així com una regulació similar d'aquesta funció. Estudis *in vitro* per exemple, revelen que la PKC afecta la supervivència intracel·lular del paràsit *L. donovani* post-infecció, mentre que no afecta la seva fagocitosi per part del macròfag (St-Denis *et al.*, 1999). Aquest fet podria estar lligat de manera directa amb la fosforilació post-traducciona que requereix la proteïna madura del Nramp1 com a un important mecanisme de regulació de la seva funció (Vidal *et al.*, 1996). D'altra banda, estudis *in vitro* demostren que la diferent activitat bacteriostàtica que presenten els macròfags provinents de ratolins genèticament resistents o susceptibles està relacionada amb la diferent activitat de la PKC que presenten, desencadenant una resposta més o menys eficient a l'IFN- γ (Oliver *et al.*, 1998). D'igual manera, aquesta proteïna requereix d'una extensa glicosilació post-traducciona (Vidal *et al.*, 1996), fet que explicaria la conservació dels llocs de glicosilació.

2.2. El gen *Nramp1*: anàlisi de polimorfisme i identificació de mutacions.

Un cop caracteritzat el *Nramp1* caní, i amb l'intenció de discernir el possible paper d'aquest gen en la susceptibilitat a la leishmaniosi canina, es va dur a terme un estudi de casos-contròls, en 33 gossos resistents i 84 gossos susceptibles, on s'analitzà el microsatèl·lit, localitzat a l'intró 1 del gen, com a marcador. Els gossos resistents mostraven una resposta cel·lular específica vers el paràsit *L. infantum*, mentre que els gossos susceptibles tenien leishmaniosi diagnosticada mitjançant una PCR específica per detectar el paràsit en moll d'os.

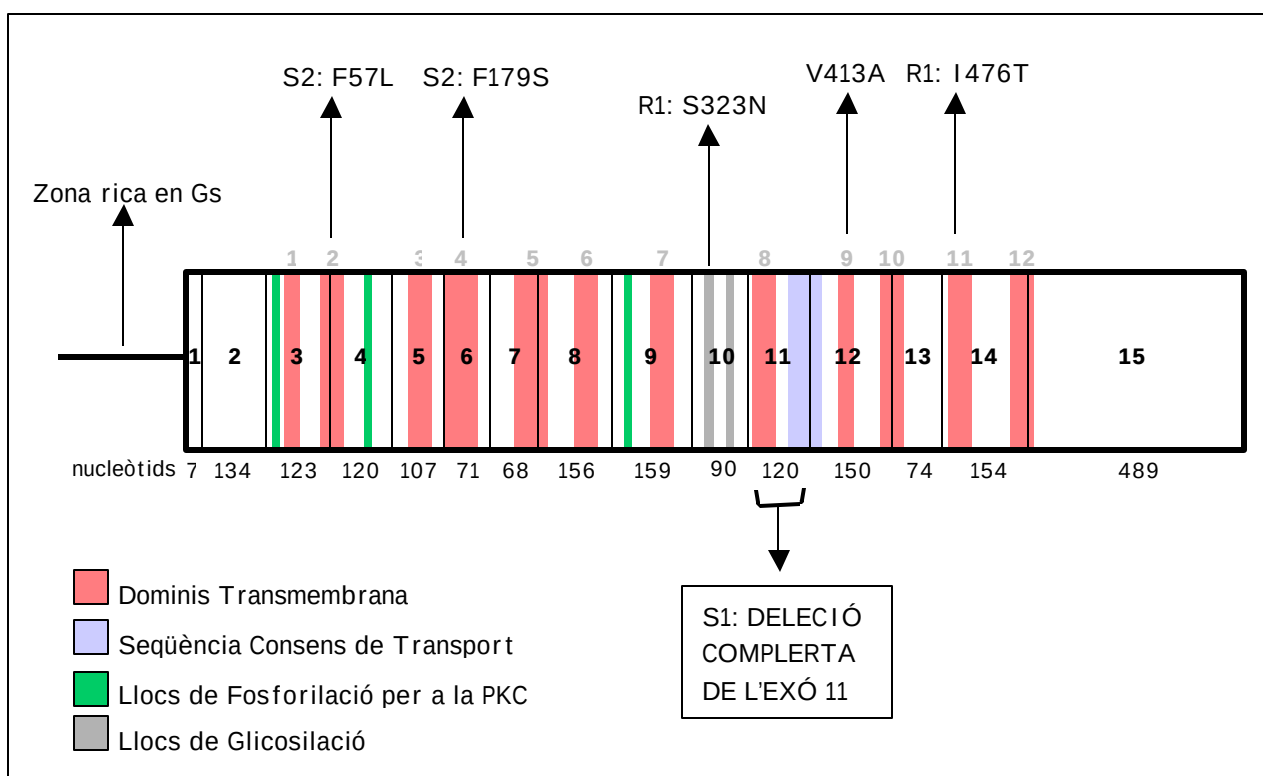
Un dels al·lels detectats pel microsatèl·lit mostrà una diferència significativa de la seva freqüència entre ambdues poblacions. A més, aquest mateix al·lel només s'observà en homozigosi en la població susceptible amb l'excepció d'un sol gos de la població resistent. La manca de distribució aleatòria dels diferents al·lels del microsatèl·lit suggereix una associació entre el gen *Nramp1* caní i la leishmaniosi, indicant la possible implicació d'aquest gen en la susceptibilitat a la malaltia.

La identificació de mutacions amb una possible implicació funcional es dugué a terme mitjançant seqüenciació directa del cDNA i la regió promotora de quatre Beagles infectats experimentalment amb *L. infantum*. Dos dels gossos foren classificats com a resistents (R1 i R2) i dos com a susceptibles (S1 i S2) en funció de la seva resposta immunitària, que fou predominantment cel·lular o humoral respectivament. Les variants de seqüència identificades es resumeixen esquemàticament en la Figura 1.

La mutació més significativa identificada fou en un dels gossos susceptibles (S1), on es produí la coamplificació de dos cDNAs, el més petit dels quals corresponia a una deleció completa de l'exó 11, que inclou el TM 8 i la major part de la seqüència consens de transport de la proteïna. Donat que no s'observà cap mutació a nivell genòmic, incloent els llocs de reconeixement intró-exó, suposem que aquesta deleció

pot ser causada per un *splicing* alternatiu. De fet, l'intró 10 presenta repeticions terminals complementàries entre si (GGGC-/CCCG), específiques del gos, que podrien

Figura 1. Esquema de les mutacions identificades en els quatre Beagles infectats experimentalment. Les mutacions identificades són respecte la seqüència prèviament caracteritzada en gos en un Rottweiler sa. Els diferents exons del cDNA estan separats per línies verticals negres i enumerats. El seu respectiu tamany es mostra a la part inferior de cada exó en nucleòtids. Els diferents canvis nucleotídics identificats provoquen en tots els casos un canvi aminoacídic que es mostra a la part superior de la seqüència. En colors es mostren els diferents motius estructurals proteics.



provocar una estructura secundària complexa donant lloc a aquest *splicing* alternatiu. Per aquesta mateixa raó ens fou impossible de seqüenciar completament aquest intró. Altres *splicings* alternatius s'han descrit per al *NRAMP1* i *NRAMP2* humans, però en cap cas inclouen la regió de la seqüència consens de transport (Liu *et al.*, 1995; Lee *et*

et al., 1998). Tot i que aquest animal continui tenint un al·lel sencer per al *Nramp1*, la pèrdua, en un dels al·lells, del motiu consens de transport, que segurament deu donar lloc a la pèrdua total de la funció de la proteïna, li redueix la possibilitat de controlar la replicació intracel·lular dels paràsits. De fet, aquest animal és l'únic que va requerir un tercer tractament per evitar les contínues recaigudes que patia. Seqüències parcials de l'intró 10 deixen entreveure que aquestes repeticions terminals podrien ser polimòrfiques en el seu nombre. Una seqüència completa d'aquest intró és el primer pas indispensable per posar a punt un sistema de genotipat que ens permeti analitzar poblacions més extenses d'individus susceptibles i resistent i poder veure la freqüència amb que aquesta deleció es produeix.

Altres mutacions identificades inclouen cinc polimorfismes nucleotídics senzills (SNPs) que en tots els casos provocaren una substitució aminoacídica dins de la proteïna. Quatre d'aquests canvis aminoacídics estan localitzats dins de dominis transmembrana i el cinqué està codificat per l'exó 10. Els més significatius a destacar són: F179S (TM4), I476T (TM11) i S323N (exó10).

El primer canvi aminoacídic, F179S, es troba en l'animal S2 i implica un canvi no conservatiu d'un residu hidrofòbic apolar a un residu polar. Tot i que aquesta regió presenta una gran quantitat de residus polars (Cellier *et al.*, 1995), està localitzada en el mateix TM on havia estat descrita la mutació del ratolí (Malo *et al.*, 1994) que implica una pèrdua total de la funció de la proteïna (Vidal *et al.*, 1996). D'altra banda, aquest canvi no s'ha descrit en cap altre mamífer, observant-se tan sols en *Nramp1* ortòlegs de plantes i organismes procariotes.

El segon canvi aminoacídic, I476T, localitzat al TM11 ens sembla interessant perquè implica un canvi polar en una de les regions més hidrofòbiques de la proteïna (Cellier *et al.*, 1995), podent tenir alguna implicació estructural. El darrer canvi a destacar es produeix en el gos R1, està codificat per l'exó 10 i representa la pèrdua d'un dels llocs

de glicosilació de la proteïna. Tot i que s'ha demostrat que la proteïna madura requereix d'una glicosilació post-traducciona (Vidal *et al.*, 1996), i que aquest motiu està conservat en la majoria d'espècies animals, aquesta substitució s'ha descrit també en búfal i vaca.

També s'han identificat variants de seqüència entre animals susceptibles i resistents en la regió promotora. La més significativa, i l'única comú en ambdós gossos susceptibles, és una zona rica en Gs, localitzada entre les posicions 310 i 330 de la seqüència, que està interrompuda per substitucions $G \rightarrow A$, en diferents llocs d'aquesta regió, en els gossos resistents i en el Rottweiler utilitzat per caracteritzar tot el gen. Altres mutacions detectades inclouen la pèrdua d'un lloc de reconeixement pel factor de transcripció SP-1, en el gos R1, i la pèrdua i el guany d'un lloc de reconeixement pel factor de transcripció AP-2, per al gos R-2.

Els limfòcits dels gossos resistents infectats amb *Leishmania* s'ha demostrat que produeixen IFN- γ després d'una estimulació específica del paràsit provocant una lisi dels macròfags infectats d'una manera depenent del MHC, donant lloc a una resposta cel·lular protectora (Pinelli *et al.*, 1999). Tot i que s'han identificat nou llocs de reconeixement per a l'IFN- γ en el promotor del *Nramp1* caní, no hem detectat cap polimorfisme entre els animals resistents i susceptibles en aquests llocs de reconeixement. D'altra banda els animals resistents i susceptibles presentaren diferents respostes immunitàries, essent els resistents els que mostraren una resposta immunitària cel·lular *Leishmania* específica donada la seva habilitat de produir IFN- γ , l'existència de proliferació limfocitària i una resposta positiva al test intradèrmic amb leishmanina. L'única mutació comú de la regió promotora present en ambdós animals susceptibles és la zona rica en Gs, posicionada curiosament prop de la regió on ha estat localitzat el microsatèl·lit humà (Blackwell *et al.*, 1995). Per a aquest

microsatèl·lit s'han caracteritzat diferents al·lels amb una diferent capacitat de dirigir l'expressió del gen, relacionant-se amb la susceptibilitat a malalties autoimmunes i infeccioses (Searle & Blackwell, 1999). En boví, també s'ha identificat un microsatèl·lit, localitzat en aquest cas en la regió 3' no traduïda, que també s'ha associat amb una diferent expressió del gen controlant la replicació *in vitro* de la bacteria *B. abortus* (Horín *et al.*, 1999; Barthel *et al.*, 2001). Aquestes dades suggereixen que aquesta zona rica en Gs del promotor del *Nramp1* caní podria tenir algun efecte sobre l'expressió gènica, essent una de les responsables de la diferent resposta immunitària detectada.

Analitzant tots els resultats en conjunt, la caracterització del gen *Nramp1* caní, l'associació descrita entre aquest gen i la susceptibilitat a la malaltia i la descripció de variants de seqüència pot ajudar en l'estudi dels factors genètics involucrats en la leishmaniosi canina. D'altra banda, per determinar la relació de cadascuna de les variants detectades amb la susceptibilitat a la malaltia, es requereix un estudi d'associació en poblacions més extenses per provar una relació funcional entre el gen i la leishmaniosi.

2.3. Caracterització del MHC caní.

El complex principal d'histocompatibilitat s'ha descrit com una de les regions responsables de la progressió de la leishmaniosi visceral en el ratolí, tant la causada pel paràsit *L. donovani*, com pel paràsit *L. infantum* (Bradley, 1977; DeTolla *et al.*, 1980; Blackwell *et al.*, 1980; Blackwell, 1982; Leclercq *et al.*, 1996). Estudis d'associació realitzats en l'home mostren però una controvèrsia de resultats. Mentre que uns demostren una lleugera associació d'aquest locus amb la leishmaniosi visceral (Blackwell *et al.*, 1997; Singh *et al.*, 1997), altres estudis de casos control no mostren

associació entre les molècules de classe II, ni de classe III del MHC i la leishmaniosi visceral causada pel paràsit *L. infantum* (Meddeb-Garnaoui *et al.*, 2001). Tot i la contradicció de les dades presents fins al moment, la implicació d'aquesta regió en la diferent resposta immunitària que desencadena l'hoste vers la infecció, i tenint en compte la importància d'aquesta en la diferent resistència o susceptibilitat que confereix al gossos infectats (Pinelli *et al.*, 1994; Ferrer *et al.*, 2002), els gens de classe II del MHC caní ens semblaren uns altres candidats a analitzar.

La major part del polimorfisme de les molècules de classe II està localitzat als dominis extracel·lulars amino terminals, agrupat en regions hipervariables en la zona d'unió amb l'antígen (Brown *et al.*, 1993). A més, sembla ser que el polimorfisme d'aquesta regió està dirigit per selecció positiva, afavorint els canvis aminoacídics no conservatius i augmentant així el ventall de pèptids antigènics que si poden unir (Hughes & Yeager, 1998). Això s'ha traduït en la identificació de diferents gens amb un elevat nombre d'al·lels per a cadascun d'ells en moltes espècies (Little & Parham, 1999; Richman *et al.*, 2001)

L'estat incipient en que es trobava la genètica canina al començar aquest estudi mostrava uns nivells de polimorfisme inferiors en el gos, amb tan sols quatre gens de classe II descrits (Sarmiento & Storb, 1990; Sarmiento *et al.*, 1992; 1993; Wagner *et al.*, 1995). Tot i ser els gens *DRB* i *DQB* els que presentaven major variabilitat al·lèlica, només s'havien descrit 20 al·lels per al gen *DRB* i 9 per al gen *DQB* (Sarmiento & Storb, 1990; Sarmiento *et al.*, 1993; Wagner *et al.*, 1996d; Francino *et al.*, 1997; Polvi *et al.*, 1997). Es per això que varem centrar els esforços en analitzar el polimorfisme dels gens *DRB1* i *DQB1* del gos, ja que un primer pas indispensable per portar a terme qualsevol estudi d'associació entre els diferents al·lels dels gens de classe II del MHC caní i la leishmaniosi és una òptima caracterització dels diferents al·lels existents.

L'anàlisi del polimorfisme del gens *DRB1* i *DQB1* es portà a terme en deu famílies de diferents races mitjançant una tècnica de PCR-RFLP sobre l'exó 2 dels gens, que és el que codifica pel domini extracel·lular $\beta 1$. Aquesta tècnica, posada a punt en la nostra mateixa unitat (Francino *et al.*, 1996; Francino *et al.*, 1997), permetia identificar els al·lels descrits fins aquell moment (9 per al gen *DRB* i 4 per al *DQB*) mitjançant la combinació dels patrons de digestió de diverses enzimes de restricció. Els productes de PCR corresponents a nous patrons de restricció foren clonats i seqüenciats permetent identificar 3 nous al·lels per al gen *DRB1* i 6 nous al·lels per al gen *DQB1*. L'assignació dels al·lels però requeria de l'anàlisi de segregació del diferents patrons de restricció. Aquest fet donava un valor afegit a aquests gens per a ser utilitzats com a marcadors polimòrfics per resoldre disputes de paternitat, però tenia la limitació de la dificultat, i en molts casos impossibilitat, de genotipar individus no relacionats. Aquest mateix problema també es descriu en la tècnica d'anàlisi de polimorfisme basada en l'anàlisi de microsatèl·lits situats en la regió del MHC que, a banda de permetre l'estudi de l'herència del diferents haplotips, no permetia genotipar individus no relacionats perquè no podia identificar el genotip de cadascun dels loci (Wagner *et al.*, 1996a).

D'altra banda, la identificació de nous al·lels quedava restringida a aquells que implicaven canvis en les dianes de restricció dels enzims utilitzats, limitant l'anàlisi del polimorfisme i incorporant la possibilitat d'estar anomenant amb un mateix nom dos al·lels diferents que mostren un mateix patró de restricció.

Per últim, quan la tècnica es va posar a punt només hi havia descrites 9 variants al·lèliques per al gen *DRB1* i 4 per al gen *DQB1* (Sarmiento & Storb, 1990; Sarmiento *et al.*, 1990; 1993), permetent la diferenciació de tots el al·lels amb 4 i 2 enzims de restricció respectivament. Amb la incorporació de nous al·lels hauriem d'incorporar nous enzims per tal de permetre una diferenciació inequívoca de tots els al·lels,

augmentat els costos de la tècnica i la dificultat d'assignar la combinació dels diferents patrons de restricció de manera adient.

En un intent de posar a punt un sistema de genotipat relativament senzill, que permetés identificar, no tant sols els al·lels ja descrit sinó els nous que pogueren anar apareixent, i que permetés el genotipat d'individus no relacionats entre si, necessari per tal de dur a terme estudis d'associació de casos-control, surgiren diferents tècniques de laboratori (Wagner *et al.*, 1998b ; Kennedy *et al.*, 1999; Hedrick *et al.*, 2000).

Per tal d'aportar una nova estratègia intentarem posar a punt un sistema descrit pel genotipat del HLA, basat en la tècnica d'anàlisi de conformació de fragments de doble cadena (DSCA, de *Double-Strand Conformation Analysis*) (Argüello *et al.*, 1998). El problema amb que ens trobarem és que no poguerem optimitzar les condicions descrites per gels de poliacrilamida en l'aparell d'electroforesi capil·lar, permetent diferenciar un nombre tant elevat d'al·lels.

La major part dels treballs descrits fins al moment identificaren nous al·lels per cadascun dels gens estudiats, *DRB1* i *DQB1*. La gran varietat de tècniques utilitzades, tot i basar-se la gran majoria en l'amplificació del segon exó dels gens, donaren lloc a la caracterització heterogènia d'al·lels, en molts casos donant lloc a al·lels repetits. Així doncs, alguns dels al·lels que varem descriure per al gen *DQB1*, per exemple, resultaren ser idèntics a al·lels prèviament descrits des de les posicions aminoacídiques 14 a la 91, però incorporaven en cadascun d'ells cinc aminoàcids nous en la primera zona hipervariable. Aquesta heterogeneïtat, així com l'aparició constant de noves variant al·lèliques, va crear la necessitat de formar un comitè de nomenclatura que estandaritzés els gens del MHC caní i totes les seves variants al·lèliques. En l'actualitat hi ha 36 al·lels descrits per al gen *DQB1* i 52 al·lels per al gen *DRB1* entre

el gos i altres cànids salvatges. Els aliniaments aminoacídics d'aquests al·lels per al gen *DQB1* i *DRB1* es mostren en les Figures 2 i 3 respectivament.

L'elevat nombre d'al·lels present en l'espècie canina, posat de manifest en els diferents treballs realitzats amb diverses races de gossos, no es manté quan s'analitzen individus d'una raça pura en concret, com es demostra en un estudi que varem realitzar de genotipat dels gens de classe II del MHC en la raça Rottweiler (Altet *et al.*, 1997). Aquesta dràstica disminució del polimorfisme intra-raça segurament és deguda a l'alta homogeneïtat genètica present en les diferents races de gossos, atès els elevats nivells de consanguinitat (Mellersh & Ostrander, 1997) i pot respondre a la diferent susceptibilitat que presenta cadascuna de les races de gossos a patologies concretes relacionades amb el sistema immunitari.

L'existència de tants al·lels, així com la seva estandarització, ha permès la creació d'una llibreria específica de gos, que mitjançant un software, permet l'assignació dels diferents al·lels prèvia seqüenciació directa de PCR del segon exó dels gens (Kennedy *et al.*, 2001). Aquest sistema de genotipat és ràpid i senzill i permetrà, d'ara endavant, la realització d'estudis d'associació, amb una assignació inequívoca dels al·lels presents i detectant tots els polimorfismes existents.

Continuació de la Figura 2.

DQB1*03101	---	F---	----	----	----	KY	Y---	----	----	S---	P--	DEMD-	V---	L----	----	L----	----
DQB1*03201	---	F---	---	F----	----	KY	F---	----	----	----	---	R--	DEMD-	V---	L----	----	----
DQB1*03301	---	---	A----	----	----	S	L----	----	F----	V---	---	---	---	K--	A--	R----	----
DQB1*03401	---	F---	---	A----	----	---	---	----	----	---	---	---	---	---	---	---	----
DQB1*03501	---	---	---	F----	----	A----	---	----	----	---	---	---	Q----	---	L----	----	---
DQB1*00101	DFVYQ	FKGECYFTNG	TERVRLLTRD	IYNREEHVRF	DSDVGEYRAV	TELGRPDAEY	WNGQKELLER	RRAEVDTVCR	HNYGREELTT	LQRR	---	---	---	---	---	---	---

Figura 3. Aliniament aminoacídic del DLA-DRB1 (www.pcweb.liv.uk/ALANRAD/Mirg/MIRGhome.html). En gris es mostren les zones hipervariables. En vermell es mostren les seqüències descrites en aquest treball. En negreta es mostren les seqüències de cànids salvatges.

	--HVR 1--					---HVR 2---					----HVR 3-----					
	10	20	30	40	50	60	70	80	90							
DRB1*00101	HFLEV	AKSECYFTNG	TERVRFVERY	IHNREEFVRF	DSDVGEYRAV	TELGRPVAES	WNGQKEILEQ	ERATVDTYCR	HNYGVIESFT	VQRR						
DRB1*00102	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----						
DRB1*00201	--M	V-F-H----	----	YLA-D	-Y---IL-	----	-I---	--R-----	R--A-----	-----A----						
DRB1*00202	--M	V-F-H----	----	YLA-D	-Y---IL-	----	-I---	--R-----	R--A-----	-----A----						
DRB1*00301	----	----	----	----	----	----	-D---	--R--L-R	K--A-----	-----A----						
DRB1*00401	--VYQ	F-P-H----	----	H-----	----	----	-D---	-----L---	-----A----	-----A----						
DRB1*00501	--M	L-F-H----	----	----	----	----	-D---	--R--L---	--A-----	---R-G----						
DRB1*00601	----	--A-H----	----	----	-Y---Y-	----	-D-Y	--P--L-R	A--A-----	---G-----						
DRB1*00701	----	--A-H----	----	----	-Y-----	----	-D-Y	--P--L-G	G--A-----	---G-----						
DRB1*00801	--VKM	Y-A-H----	----	YLM-D	-Y-----	----	RD-Y	-----R	K--A-----	---R-G----						
DRB1*00802	--VKM	Y-A-H----	----	YLM-D	-Y-----	----	RD-Y	-----R	K--A-----	-----A----						
DRB1*00901	----	----	----	----	----	----	-D---	--R--F-R	K--A-----	-----A----						
DRB1*010011	**VYQ	F-P-H----	----	----	----	----	----	----	----	----					****	****
DRB1*010012	**VYQ	F-P-H----	----	----	----	----	----	----	----	----					****	****
DRB1*01101	--VKM	F-A-H----	----	LLA-S	-Y-----	----	RD---	--R--L---	R--A-----	---R-G----						
DRB1*01201	--VRM	Y-A-H----	----	LA-S	-Y-----	----	RD---	--R--L-R	R--E-----	-----A----						
DRB1*01301	--VYQ	F-P-H----	----	----	----	----	-D---	--R--L---	--A-----	---R-G----						
DRB1*01401	--M	L-----	----	----	----	----	-D-Y	--P--L-R	A--A-----	---G-----						
DRB1*01501	--M	V-F-H----	----	LLV-D	-Y---H-	----	-D-Y	-----L---	R--E--V-	-----A----						
DRB1*01502	--M	V-F-H----	----	LLV-D	-Y---H-	----	-D-Y	-----L---	R--E--V-	-----A----						
DRB1*01503	--M	V-F-H----	----	LLV-D	-Y---H-	----	-D-Y	-----L---	R--E-----	-----A----						
DRB1*01601	----	--A-H----	----	----	----	----	-D---	--R--L-R	K--E-----	-----A----						
DRB1*01701	--VKM	F-A-H----	----	LA-S	-Y-----	----	RD---	--R--L-R	A--A-----	-----A----						
DRB1*01801	----	-----H----	----	----	----	----	-D---	--R--L-R	K--E-----	-----A----						
DRB1*01901	--VRM	Y-A-H----	----	LA-S	-Y-----	----	RD---	--R--L-R	R--E-----	-----A----						
DRB1*02001	--KM	V-F-H----	----	L---D	-Y---Y-	----	-S---	--R--F---	R--E--V-	---G-----						
DRB1*02101	--VKM	F-A-H----	----	LLA-S	-Y-----	----	RD---	--R--L---	R-PA-----	---R-G----						
DRB1*02201	--VYQ	F-P-H----	----	----	----	----	-D---	-----E---	-----A----	-----A----						
DRB1*02301	--M	L-F-H----	----	----	----	----	-D---	--R--L---	--A-----	---R-G----						
DRB1*02401	----	L-----	----	----	----	----	RD---	--R--L-R	K--E-----	---R-G----						
DRB1*02501	----	L-F-H----	----	L-----	-Y---A-	----	RD---	--R--L---	R--A-----	---R-G----						
DRB1*02601	--M	L-----	----	----	----	----	-D-Y	--R--L-R	K--E-----	-----A----						
DRB1*02701	--VYQ	F-A-H----	----	----	----	----	RD---	-----A----	-----A----	-----A----						
DRB1*02801	----	--A-H----	----	----	-Y-----	----	-D-Y	--P--L-R	A--A-----	---G-----						

Continuació de la Figura 3.

DRB1*02901	--VKM	Y-A--H----	----	YLM-D	-Y----N-	--	-----F--	-----	RD---	-----	R	K--A	-----	-----A	----
DRB1*03001	**--M	V-F--H----	----	LLV-D	-Y----H-	--	-----F--	-----	-D---	--R---	L---	R--E--V--	-----	****	****
DRB1*03101	--KM	V-F--H----	----	YLM-D	-Y-----	--	-----F--	-----	RD---	-----	L---	K--A	-----	-----A	----
DRB1*03201	--VYQ	F-P--H----	----			--	-----F--	-----		-----			-----V--	-----	
DRB1*03301	--M	L-F--H----	----	YLV-D	-Y----H-	--	-----F--	-----	-D--Y	--R---	L--R	R--E	-----	---R-G	----
DRB1*03501	--VKM	F-A--H----	----	LLA-S	-Y-----	--	-----F--	-----	RD---	--R---	F---	R--A	-----	---R-G	----
DRB1*03601	--M	L----H----	----		-----N-	--	-----F--	-----	RD---	--R---	L--R	K--E	-----	-----	
DRB1*03701	----	--A--H----	----		-Y---Y-	--	-----F--	-----	-D---	--P---	L--R	A--A	-----	----G-	----
DRB1*03801	--M	V-F--H----	----	LLV-D	-Y----H-	--	-----F--	-----	-D--Y	-----	L--R	R--E--V--	-----	---R-	----
DRB1*03901	--VYQ	F-P--H----	----			--	-----F--	-----		-----			-----	-----	
DRB1*04001	--KM	V-F--H----	----	L--D	-Y---Y-	--	-----F--	-----	-S--Y	-----		R--E--V--	-----	-----A	----
DRB1*04101	--M	L-F--H----	----	YLM-D	-Y----N-	--	-----F--	-----	RD---	-----	L---	K--A	-----	-----A	----
DRB1*04201	--M	L-F--H----	----	YLV-D	-Y----N-	--	-----F--	-----	-D--Y	-----	L---	K--A	-----	-----A	----
DRB1*04301	--M	L-F--H----	----	YLV-D	-Y----H-	--	-----F--	-----	-D--Y	--R---	L--R	R--E--V--	-----	---R-G	----
DRB1*04401	----	-----	----	L----	-----N-	--	-----F--	-----	-D---	--R---	L---	R--A	-----	---R-G	----
DRB1*04501	--M	L-----	----		-----N-	--	-----F--	-----	-D---	-----	L--R	K--E	-----	----G-	----
DRB1*04601	--M	L-----	----		-----N-	--	-----F--	-----	-D---	--R---	L---	--A	-----	-----	
DRB1*04701	--KM	V-F--H----	----	YLM-D	-Y-----	--	-----F--	-----	RD---	-----	L--R	R--A	-----	-----	
DRB1*00101	HFLEV	AKSECYFTNG	TERVRFVERY	IHNREEFVRF	DSDVGEYRAV	TELGRPVAES	WNGQKEILEQ	ERATVDTYCR	HNYGVIESFT	VQRR					

conclusions

1. Les dades de polimorfisme obtingudes per als 10 microsatèl·lits analitzats en la població consanguínia de Rottweilers, confirmen que deu marcadors són suficients per realitzar proves d'identificació individual i control de paternitats en extenses famílies amb un cert grau de consanguinitat, ja que els nivells de polimorfisme obtinguts són similars als obtinguts en les poblacions de gossos no emparentats de pura raça.
2. S'han dissenyat uns *primers* ortòlegs de PCR per identificar i caracteritzar el gen *Nramp1* caní com a candidat de resistència o susceptibilitat a la leishmaniosi, que poden ser utilitzats com a primera aproximació d'anàlisi del polimorfisme d'aquest gen en d'altres espècies de mamífers, així com a marcadors de tipus I per a dur a terme un anàlisi comparatiu del genomes.
3. La caracterització complerta del *Nramp1* del gos, posicionat al cromosoma 37, s'extén 9 kb que comprenen la regió promotora, 15 exons i un microsatèl·lit polimòrfic situat a l'intró 1. El gen codifica per una proteïna de 547 aminoàcids que presenta una identitat de fins al 87% amb les proteïnes Nramp1 descrites en les diferents espècies de mamífers, conservant els motius estructurals. El residu G169 està conservat en el Nramp1 del gos.
4. La distribució de les freqüències al·lèliques del microsatèl·lit de gos situat a l'intró 1 del *Nramp1*, utilitzat com a marcador en un estudi de casos controls, suggereix una associació entre aquest gen i la susceptibilitat a la leishmaniosi canina.
5. La recerca de possibles mutacions funcionals en Beagles infectats experimentalment amb *Leishmania infantum* ha permès identificar dues mutacions importants en els gossos susceptibles: una zona rica en Gs a la regió promotora

possiblement involucrada en la diferent expressió del gen, i una deleció completa de l'exó 11, que conté el motiu consens de transport de la proteïna, en l'únic animal susceptible que ha necessitat un tercer tractament per evitar les continues recaigudes que patia.

6. S'ha dut a terme l'anàlisi del polimorfisme dels gens *DRB1* i *DQB1* per tal d'avançar en la caracterització del MHC del gos, un altre possible gen candidat de resistència o susceptibilitat a la leishmaniosi canina. S'han identificat i caracteritzat 6 nous al·lels per al gen *DRB1* i 3 per al gen *DQB1*.

El treball de recerca exposat en aquesta tesi està enmarcat dins del projecte internacional DogMap, que té com a objectiu la construcció del mapa genètic del gos, on es preten, entre d'altres fites, la recerca de gens candidats de resistència o susceptibilitat a malalties i en el nostre cas a la leishmaniosi canina.

La leishmaniosi, que és endèmica en l'àrea mediterrània, és una zoonosi causada pel paràsit *Leishmania infantum*, on el gos és el principal reservori. Aquesta malaltia no només és important en el gos, on la simptomatologia és sistèmica i molt variada, sinó que està guanyant molta importància en l'home, ja que ha esdevingut una de les coinfeccions principals en malalts del virus de la SIDA.

El món dels gossos aporta un material molt valuós per a l'estudi de malalties amb una component genètica. L'alta homogeneïtat genètica present en les diferents races de gossos, degut al manteniment dels estàndards racials, sovint assegura que un petit nombre de gens poden ser la causa d'una determinada patologia. A més, la possibilitat de tenir extenses famílies i de realitzar creuaments dirigits pot augmentar la informativitat de qualsevol estudi de lligament o d'associació que es vulgui dur a terme. El problema de les famílies en el món dels gossos és la fiabilitat de les mateixes, ja que no existeix cap tipus de control sobre les genealogies, anul·lant qualsevol credibilitat dels pedigris existents. És per això que un dels objectius d'aquesta tesi fou posar a punt un sistema d'identificació individual i control de paternitats en extenses famílies amb un cert grau de consanguinitat.

Per tal d'assolir aquest objectiu analitzarem el polimorfisme i les freqüències al·lèliques de 10 microsatèl·lits en una família de 3 generacions formada per 360 Rottweilers amb un coeficient màxim de consanguinitat del 16% i ho compararem amb dos tipus diferents de poblacions de gossos: una formada per animals no relacionats de raça pura i una altra formada per individus no relacionats d'una barreja de races i

creuaments. Tot i que la població consanguínia mostrà una reducció del polimorfisme respecte la població mixta de gossos, aquests nivells foren similars als existents en les poblacions d'animals no emparentats de pura raça d'aquest treball i d'altres amb que es compararen els resultats, concloent que els 10 microsatèl·lits analitzats són suficients per resoldre aquests tipus de proves en extenses famílies amb un cert grau de consanguinitat.

L'alta homogeneïtat genètica present en les diferents races de gossos, junt amb l'obtenció d'extenses famílies verificades genèticament i un mapa genètic de l'espècie suficientment dens de marcadors com per cobrir tot el genoma, és un material molt valuós per a la identificació de gens responsables de patologies amb una component genètica. La manca del mapa genètic al començar aquest estudi ens va obligar però, a analitzar els factors genètics involucrats en la diferent resistència o susceptibilitat a la leishmaniosi canina basant-nos en l'estratègia de gens candidats, que es fonamenta en aprofitar els coneixements ja existents en d'altres espècies on l'estudi genètic està més avançat.

En ratolí s'ha demostrat que la primera línia de defensa natural vers la leishmaniosi visceral està sota el control del gen *Nramp1*, mentre que la progressió de la malaltia està sota la influència dels gens del MHC.

El ***Nramp1***, que s'expressa únicament en els òrgans reticle endotelials i en els macròfags provinents d'ells, codifica per una proteïna transportadora de membrana formada per 12 dominis transmembrana (TM), un *loop* extracel·lular glicosilat i un motiu de transport conservat entre d'altres proteïnes transportadores, tant d'organismes eucariotes com de procariotes. Una substitució aminoacídica no conservativa en el TM4 (G → A) s'ha associat al fenotip susceptible a *Leishmania* en ratolí.

Dins del macròfag el *Nramp1* es situa en els darrers compartiments endocítics on s'afegeix després de la fagocitosi. La seva funció és l'extracció d'ions metàl·lics divalents fora del fagosoma, controlant així la replicació del paràsit i l'activació dels macròfags per a dur a terme la seva funció bacteriostàtica i bactericida.

Els gens de classe II del **MHC** codifiquen per proteïnes heterodimèriques de membrana que presenten els antígens exògens processats als limfocits col·laboradors CD4+, que poden cooperar amb els limfòcits B per produir anticossos i alliberar citocines que ajuden als macròfags en el procés de destrucció dels paràsits intracel·lulars.

Donat que el macròfag juga un paper fonamental en el control de la leishmaniosi canina i donat la importància que té la subseqüent resposta immunitària que es desencadena en la diferent resistència o susceptibilitat que mostren els gossos infectats, tant el *Nramp1*, com els gens de classe II del MHC ens semblaren òptims gens candidats a analitzar.

La caracterització del *Nramp1* es portà a terme mitjançant *primers* ortòlegs de PCR que, donat l'alt grau de conservació d'aquesta família de gens, poden ser utilitzats en d'altres espècies animals com una primera aproximació en la recerca de polimorfismes d'aquest gen com a candidat a la diferent resistència o susceptibilitat a patologies infeccioses i autoimmunes, així com a marcadors de tipus I per l'anàlisi comparatiu del genomes. El *Nramp1* caní, que ha estat localitzat al cromosoma 37 del gos, cobreix 9 Kb que comprenen 700 bp de la regió promotora i 5' no codificant, 15 exons i un microsatèl·lit polimòrfic localitzat a l'intró 1. Aquest gen codifica per un proteïna de 547 aminoàcids amb una identitat de fins al 87% amb les proteïnes *Nramp1* descrites en les diferents espècies de mamífers, conservant els mateixos motius estructurals. El residu G169 del TM4 està conservat en gos al igual que en d'altres espècies.

El microsatèl·lit situat a l'intró 1 s'utilitzà com a marcador per portar a terme un estudi de casos controls en 33 gossos resistents i 84 gossos susceptibles. La manca de distribució aleatòria d'un dels al·lels del microsatèl·lit suggereix una associació entre el gen *Nramp1* i la susceptibilitat a la leishmaniosi canina. La identificació de mutacions amb una possible implicació funcional es dugué a terme mitjançant seqüenciació directa del cDNA i la regió promotora de quatre Beagles infectats experimentalment amb *L. infantum*. Dos dels gossos foren classificats com a resistents (R1 i R2) i dos com a susceptibles (S1 i S2) en funció de la seva resposta immunitària, que fou predominantment cel·lular o humoral respectivament. Les variants de seqüència a destacar foren primerament una deleció completa de l'exó 11 en un dels al·lels del gos S1. Aquesta deleció és deguda segurament a un *splicing* alternatiu provocat per la complexa estructura secundària de l'intró 10 per l'existència de repeticions complementàries terminals específiques del gos. La pèrdua del motiu consens de transport localitzat en aquest exó, donant lloc a la pèrdua total de funció de la proteïna, possiblement li redueix la capacitat de controlar la replicació intracel·lular dels paràsits. De fet, aquest animal fou l'únic que requerí un tercer tractament per evitar les continues recaigudes que patia.

També es detectaren cinc canvis aminoacídics no conservatius, quatre dels quals estan localitzats en dominis transmembrana, mentre que el darrer està codificat per l'exó 10, on provoca una pèrdua d'un dels llocs de glicosilació.

Per últim s'identificà una zona rica en Gs en la regió promotora, comú en ambdós animals susceptibles, que està interrompuda per substitucions G → A en llocs aleatoris en els animals resistents. A més, aquesta zona està situada prop d'on havia estat localitzat el microsatèl·lit humà que s'ha demostrat que dirigeix una diferent expressió gènica en funció de l'al·lel present i que s'ha relacionat amb la diferent susceptibilitat a malalties infeccioses i autoimmunes.

És necessari dur a terme un estudi en poblacions més extenses per determinar en quina mesura cadascuna de les variants al·lèliques detectades està relacionada amb la susceptibilitat a la malaltia.

Pel que fa al segon gen candidat, i donat l'estat encara incipient en que es trobava la caracterització dels gens de classe II dels MHC en el gos, ens centràrem en l'anàlisi del polimorfisme present en els gens *DRB1* i *DQB1* on identificarem, mitjançant un sistema de PCR-RFLP, 3 i 6 nous al·lèls per a cadascun d'ells respectivament. La gran heterogeneïtat en la caracterització dels diferents al·lèls d'aquests gens i d'altres gens del MHC caní, que anaven augmentant amb celeritat, mostrà la necessitat de crear un comitè de nomenclatura que els estandaritzés (recollit a l'annex 1), permetent d'ara endavant, la realització d'estudis d'associació amb una assignació inequívoca dels al·lèls presents.

El trabajo de investigación expuesto en esta tesis se enmarca dentro del proyecto internacional DogMap que tiene como objetivo la construcción del mapa genético canino. En él pretende contribuir a la búsqueda de genes candidatos de resistencia o susceptibilidad a la leishmaniosis canina.

La leishmaniosis, que es endémica en el área mediterránea, es una zoonosis causada por el parásito *Leishmania infantum*, en la que el perro es el principal reservorio. Esta enfermedad no es sólo de gran transcendencia en el perro, si no que está ganando mucha importancia en el hombre ya que es una de las coinfecciones principales en enfermos del virus del SIDA.

El mundo del perro aporta un material muy valioso para el estudio de enfermedades con una componente genética. La elevada homogeneidad genética existente en las diferentes razas debido al mantenimiento de los estándares raciales a menudo asegura que un reducido número de genes pueda ser la causa de una determinada patología. Además, la posibilidad de tener extensas familias y de realizar cruces dirigidos puede aumentar la informatividad de cualquier estudio de ligamiento o de asociación que se quiera realizar. El problema de las familias en el mundo del perro es la fiabilidad de las mismas, ya que no existe ningún control sobre las genealogías, anulando cualquier credibilidad a los pedigríes oficiales existentes. Por este motivo uno de los objetivos de esta tesis fue poner a punto un sistema de identificación individual y control de paternidades en extensas familias con un cierto grado de consanguinidad.

Para conseguir este objetivo analizamos el polimorfismo y las frecuencias alélicas de 10 microsatélites en una familia de tres generaciones formada por 360 Rottweilers con un coeficiente máximo de consanguinidad del 16% y lo comparamos con dos tipos distintos de poblaciones de perros: una formada por animales no relacionados de pura

raza y otra formada por individuos no relacionados de diferentes razas y cruces. Aún mostrando la población consanguínea una disminución del polimorfismo respecto a la población mixta de perros, éstos niveles fueron similares a los obtenidos en las poblaciones de animales no emparentados de pura raza, tanto de este trabajo como de otros con los que fueron comparados los resultados, concluyendo que los 10 microsatélites analizados son suficientes para resolver este tipo de pruebas en extensas familias con un cierto grado de consanguinidad.

La elevada homogeneidad genética presente en las diferentes razas de perros, junto con la obtención de extensas familias verificadas genéticamente y un mapa genético de la especie suficientemente denso de marcadores como para cubrir todo el genoma, es un material muy valioso para la identificación de genes responsables de patologías de componente genética. Al no existir un mapa genético del perro al empezar este estudio, tuvimos que analizar los factores genéticos involucrados en la diferente resistencia o susceptibilidad a la leishmaniosis canina basándonos en la estrategia de genes candidatos, que se basa en aprovechar los conocimientos ya existentes en otras especies donde el estudio genético está más avanzado.

En ratón se ha demostrado que la primera línea de defensa natural de la leishmaniosis visceral está controlada por el gen *Nramp1*, mientras que la progresión de la enfermedad está controlada por los genes del MHC.

El ***Nramp1***, que se expresa únicamente en los órganos retículo-endoteliales y en los macrófagos provenientes de los mismos, codifica para una proteína transportadora de membrana formada por 12 dominios transmembrana (TM), un *loop* extracelular glicosilado y un motivo de transporte conservado en otras proteínas transportadoras, tanto de organismos eucariotas como procariotas. Una sustitución aminoacídica no

conservativa en el TM4 (G → A) se ha asociado al fenotipo susceptible a la *Leishmania* en ratón.

Dentro del macrófago el Nramp1 se sitúa en los últimos compartimentos endocíticos donde se une después de la fagocitosis. Su función es la extracción de iones metálicos divalentes fuera del fagosoma, controlando así la replicación del parásito, y la activación de los macrófagos para llevar a cabo su función bacteriostática y bactericida.

Los genes de clase II del MHC codifican para proteínas heterodiméricas de membrana que presentan los antígenos exógenos procesados a los linfocitos cooperadores CD4+, que pueden cooperar con los linfocitos B para producir anticuerpos y liberar citoquinas que ayuden a los macrófagos en el proceso de destrucción de los parásitos intracelulares.

Dado que el macrófago juega un papel fundamental en el control de la leishmaniosis canina y la importancia que tiene la respuesta inmune que se desencadena en la diferente resistencia o susceptibilidad que muestran los perros infectados, tanto el *Nramp1* como los genes de clase II del MHC nos parecieron óptimos genes candidatos a analizar.

La caracterización del *Nramp1* se realizó mediante *primers* ortólogos de PCR que, dado el alto grado de conservación de esta familia de genes, pueden ser utilizados en otras especies animales como una primera aproximación en la búsqueda de polimorfismos de este gen como candidato a la diferente resistencia o susceptibilidad a patologías infecciosas y autoinmunes, así como a un marcador de tipo I para el análisis comparativo de los genomas. El *Nramp1* canino, que ha sido localizado en el cromosoma 37 del perro, se extiende 9 Kb que engloban 700 bp de la región promotora y 5' no codificante, 15 exones y un microsatélite polimórfico situado en el intrón 1. Este gen codifica para una proteína de 547 aminoácidos con una identidad de hasta el 87% con

las proteínas Nramp1 descritas en diferentes especies de mamíferos, conservando los mismos motivos estructurales. El residuo G169 del TM4 está conservado en perro al igual que en otras especies.

El microsatélite situado en el intrón 1 se utilizó como marcador para llevar a cabo un estudio de casos-controles en 33 perros resistentes y 84 perros susceptibles. La distribución no aleatoria de uno de los alelos del microsatélite sugiere una asociación entre el gen *Nramp1* y la susceptibilidad a la leishmaniosis canina. La identificación de mutaciones con una posible implicación funcional se llevó a cabo mediante secuenciación directa del cDNA y de la región promotora de cuatro Beagles infectados experimentalmente con *L. infantum*. Dos de los perros fueron clasificados como resistentes (R1 y R2) y dos como susceptibles (S1 y S2) en función de su respuesta inmune, que fue predominantemente celular o humoral respectivamente. Las variantes de secuencia a destacar fueron en primer lugar una delección completa del exón 11 en uno de los alelos del perro S1. Esta delección es debida seguramente a un *splicing* alternativo provocado por la compleja estructura secundaria que adquiere el intrón 10 debido a la existencia de repeticiones terminales complementarias específicas del perro. La pérdida del motivo consenso de transporte codificado por este exón, dando lugar a la pérdida total de función de la proteína, posiblemente le reduce la capacidad de controlar la replicación intracelular de los parásitos. De hecho, este animal fue el único que necesitó un tercer tratamiento para evitar las continuas recaídas que sufría.

También se detectaron cinco cambios aminoacídicos no conservativos, cuatro de los cuales están localizados en dominios transmembrana, mientras que el último está codificado por el exón 10, donde provoca la pérdida de uno de los sitios de glicosilación.

Por último, se identificó una zona rica en Gs en la región promotora, común en los dos animales susceptibles, que está interrumpida por sustituciones $G \rightarrow A$ en sitios aleatorios en los animales resistentes. Además, esta zona está situada cerca de donde se localiza el microsatélite humano que se ha demostrado que dirige una expresión génica diferencial en función del alelo presente y que se ha relacionado con la diferente susceptibilidad a enfermedades infecciosas y autoinmunes.

Es necesario llevar a cabo un estudio en poblaciones más extensas para determinar la relación de cada una de las variantes alélicas detectadas con la susceptibilidad a la enfermedad.

Por lo que respecta al segundo gen candidato, y debido al estado incipiente en que se encontraba la caracterización de los genes de clase II del MHC en perro, nos centramos en el análisis del polimorfismo presente en los genes *DRB1* y *DQB1* donde identificamos, mediante un sistema de PCR-RFLP, 3 y 6 nuevos alelos para cada uno de ellos respectivamente. La gran heterogeneidad en la caracterización de los distintos alelos de estos genes y otros genes del MHC canino, cuyo número iba aumentando con una gran celeridad, mostró la necesidad de crear un comité de nomenclatura que los estandarizase (recogido en el anexo 1) permitiendo, de ahora en adelante, la realización de estudios de asociación con una asignación inequívoca de los alelos presentes.

summary

This project is included in the international DogMap project created to perform the physical canine genetic map. Our aim was to contribute in the characterisation of candidate genes related with resistance or susceptibility to canine leishmaniosis.

Leishmaniosis, which is endemic in the Mediterranean basin, is a zoonosis caused by the parasite *Leishmania infantum* in which the dog is considered to be the main host. This disease is important not only in dog, in which clinical signs are systemic and vary widely, but also in humans where it has become a common complicating factor in adults infected with HIV.

Dog world presents a unique opportunity to study diseases with a genetic component. Genetic homogeneity within each breed, due to the constitution of breed standards, often ensures that a small number of genes will underlie a given disease. In addition, the possibility of having large families and performing directed crosses, increases the levels of statistical power for any canine linkage analysis or association study. The problem with dog families is their credibility since no control is made over official pedigrees by canine institutions. For this reason our first objective was addressed to implement a system for parentage testing and individual identification in large populations of closely related dogs.

We have analysed the polymorphism of a set of 10 microsatellites over three generations of 360 pedigree Rottweilers that reached a maximum inbreeding coefficient of 16%. Results were compared with pure-breed populations of unrelated animals and with one population constituted by unrelated dogs of mixed breeds. Although microsatellite polymorphism was reduced in the Rottweiler pedigree if compared to the mixed breed population, it was similar to the populations composed of unrelated pure-breed dogs, concluding that 10 microsatellites could be considered sufficient to solve this type of analysis in large populations of closely related dogs.

The high genetic homogeneity within each dog breed joined to the possibility of having larger families genetically verified and a genetic map with a sufficient density and coverage is a valuable material to search for genes responsible of diseases with a genetic component. Due to the lack of the canine genetic map at the beginning of this project, our aim was to search for genes responsible of the resistance or susceptibility to canine leishmaniosis based on the candidate gene strategy provided by the advanced genetic knowledge of other species.

Nramp1 gene has been described in mouse as the determinant of natural resistance or susceptibility to *Leishmania* infection, while MHC genes have been described to be responsible for the disease progression.

The ***Nramp1*** gene, which is only expressed in reticuloendothelial organs and in mature macrophages derived from them, encodes an ion transporter protein composed of 12 transmembrane domains (TM), an extracellular glycosylated loop and a transport motif conserved among other transporter proteins in both eukaryotic and prokaryotic organisms. A nonconservative amino acid substitution (G → A) in the TM4 domain has been associated with susceptible *Leishmania* phenotype in mouse.

Within macrophages, Nramp1 protein has been located in late endocytic compartments and is acquired by the phagosomal membrane after phagocytosis. Protein drives divalent metals out of the phagosome, controlling the replication of intracellular parasites and the macrophage activation.

The **MHC** class II genes encode the heterodimeric cell surface proteins involved in binding and presenting processed antigenic peptides to CD4⁺ T lymphocytes which could cooperate with B lymphocytes for antibody production and cytokine secretion to help macrophages in intracellular parasites destruction.

Due to the central role that macrophages play in the control of *Leishmania* parasite in dogs, and due to the importance of the subsequent immune response produced in

infected dogs for their susceptibility or resistance phenotype, both the *Nramp1* and MHC class II seemed strong candidate genes to analyse.

Nramp1 characterisation was performed using orthologous gene-specific PCR primers that allow the specific amplification of this gene in mammals due to the high degree of conservation shown in this gene family. This could be used as a first approach in the search of genes responsible for disease susceptibility, but also to map this gene as a type I marker for direct comparison between genetic maps of divergent species. The canine *Nramp1* gene has been mapped to dog chromosome CFA37 and covers 9 kb, including 700 bp of the promoter and 5' UTR regions, 15 exons and a polymorphic microsatellite in intron 1. It encodes a 547 amino acid protein that has over 87% identity with the *Nramp1* proteins of different mammalian species and with the same structure as the other *Nramp1* proteins described up to date. The G169 residue in TM4 is conserved in the dog *Nramp1* protein as it is in other species.

We performed a case-control study with 33 resistant and 84 susceptible dogs and the intron 1 microsatellite as a marker. Significant differences were observed for one allele of the microsatellite between the two populations suggesting an association between *Nramp1* gene and susceptibility to canine leishmaniosis. Sequence variant analysis was performed by direct sequencing of the cDNA and the promoter region of four Beagles experimentally infected with *L. infantum* to search for possible functional mutations. Two of the dogs were classified as susceptible (S1 and S2) and the other two were classified as resistant (R1 and R2) based on their predominant immune response, which was humoral and cellular respectively. Interestingly, one of the susceptible Beagles had a complete deletion of exon 11 in one of the *Nramp1* alleles, which resulted in the elimination of the consensus transport motif of the protein. Intron 10 has complementary terminal repeats which are canine specific and

which could confer a complex secondary structure resulting in alternative mRNA splicing. The loss of the consensus transport motif caused by this deletion could produce a lack of function of the mutated protein, resulting in a higher level of proliferation of the parasite inside the macrophages of the susceptible dogs. It is important to note that this dog was the only one that needed a third, sustained treatment to avoid continuous relapses.

We also described five amino acid substitutions, four located in the TM domains and the other one encoded by exon 10, which produces the loss of a glycosylation site.

Finally, there is a G-rich region in the promoter of the susceptible animals that is disrupted by G-to-A substitutions in different places in the resistant animals. In addition, this region is located close to the region where a microsatellite has been described in human. Different alleles of this microsatellite have been associated with a different ability to drive gene expression and have been correlated with infectious versus autoimmune disease susceptibility.

However, in order to determine whether each sequence variant described here is associated with *Leishmania* susceptibility in dogs, a larger population based analysis would be required to prove the functional association of *Nramp1* with the disease.

For the other candidate gene, we performed polymorphism analysis of the MHC class II genes, *DRB1* and *DQB1*. Based on a PCR-RFLP protocol, we identified 3 and 6 new alleles for each gene respectively. The high heterogeneity of the MHC genes characterisation showed the necessity of creating a Nomenclature committee for canine MHC (shown in annexe 1). Since now, it will allow to achieve association studies with a correct assignation of the alleles present in a population.

referències bibliogràfiques

- Abel, L. & Dessein, A. J. (1997).** The impact of host genetics on susceptibility to human infectious diseases. *Current Opinion in Immunology* **9**, 509-516.
- Abel, L. & Dessein, A. J. (1998).** Genetic epidemiology of infectious diseases in humans: design of population-based studies. *Emerging Infectious Diseases* **4**, 593-603.
- Abel, L., Sánchez, F. O., Oberti, J., Thuc, N. V., Van Hoa, L., Lap, V. D., Skamene, E., Lagrange, P. H. & Schurr, E. (1998).** Susceptibility to leprosy is linked to the human *NRAMP1* gene. *The Journal of Infectious Diseases* **177**, 133-145.
- Agranoff, D., Monahan, I. M., Mangan, J. A., Butcher, P. D. & Krishna, S. (1999).** *Mycobacterium tuberculosis* expresses a novel pH-dependent divalent cation transporter belonging to the *Nramp* family. *Journal of Experimental Medicine* **190**, 717-724.
- Agranoff, D. D. & Krishna, S. (1998).** Metal ion homeostasis and intracellular parasitism. *Molecular Microbiology* **28**, 403-412.
- Alexander, J. & Russell, D. G. (1992).** The interaction of *Leishmania* species with macrophages. *Advances in Immunology* **31**, 175-252.
- Altet, L., Francino, O. & Sánchez, A. (1997).** Utilización de marcadores polimórficos para identificación y pruebas de paternidad en poblaciones consanguíneas. *ITEA* **18**, 302-304.
- Argüello, J. R., Little, A.-M., Pay, A. L., Gallardo, D., Rojas, I., Marsh, S. G. E., Goldman, J. M. & Madrigal, J. A. (1998).** Mutation detection and typing of polymorphic loci through double-strand conformation analysis. *Nature Genetics* **18**, 192-194.
- Atkinson, P. G. P. & Barton, C. H. (1998).** Ectopic expression of *Nramp1* in COS-1 cells modulates iron accumulation. *FEBS Letters* **425**, 239-242.

- Atkinson, P. G. P., Blackwell, J. M. & Barton, H. (1997).** *Nramp1* locus encodes a 65 KDa interferon- γ -inducible protein in murine macrophages. *Biochemistry Journal* **325**, 779-786.
- Bairoch, A. (1993).** The PROSITE dictionary of sites and patterns in proteins, its current status. *Nucleic Acids Research* **21**, 3097-3103.
- Barendse, W., Armitage, S. M., Kossarek, L. M., Shalom, A., Kirkpatrick, B. M., Ryan, A. M., Clayton, D., Li, L., Neibergs, H. L., Zhang, N., Grosse, W. M., Weiss, J., Creighton, P., McCarthy, F., Ron, M., Teale, A. J., Fries, R., McGraw, R. A., Moore, S. S., Georges, M., Soller, M., Womack, J. E. & Hetzel, D. J. S. (1994).** A genetic linkage map of the bovine genome. *Nature Genetics* **6**, 223-235.
- Barthel, R., Feng, J., Piedrahita, J. A., McMurray, D. N., Templeton, J. W. & Adams, L. G. (2001).** Stable transfection of the bovine *NRAMP1* gene into murine RAW264.7 cells: effect on *Brucella abortus* survival. *Infection and Immunity* **69**, 3110-3119.
- Barthel, R., Piedrahita, J. A., McMurray, D. N., Payeur, J., Baca, D., Suarez Guemes, F., Perumaalla, V. S., Ficht, T. A., Templeton, J. W. & Adams, L. G. (2000).** Pathologic findings and association of *Mycobacterium bovis* infection with the bovine *NRAMP1* gene in cattle from herds with naturally occurring tuberculosis. *American Journal of Veterinary Research* **61**, 1140-1144.
- Barton, C. H., White, J. K., Roach, T. I. A. & Blackwell, J. M. (1994).** NH₂-terminal sequence of macrophage-expressed natural resistance-associated macrophage protein (*Nramp*) encodes a proline/serine-rich putative Src homology 3-binding domain. *Journal of Experimental Medicine* **179**, 1683-1687.
- Barton, C. H., Whitehead, S. H. & Blackwell, J. M. (1995).** *Nramp* transfection transfers *I ty/Lsh/Bcg*-related pleiotropic effects on macrophage activation:

- influence on oxidative burst and nitric oxide pathways. *Molecular Medicine* **1**, 267-679.
- Bellamy, R., Ruwende, C., Corrah, T., McAdam, K. P. W. J., Whittle, H. C., Hill, A. V. S. & Phil, D. (1998).** Variations in the *NRAMP1* gene and susceptibility to tuberculosis in west africans. *The New England Journal of Medicine* **338**, 640-644.
- Belouchi, A., Kwan, T. & Gros, P. (1997).** Cloning and characterization of the *osNramp* family from *Oryza sativa*, a new family of membrane proteins possibly implicated in the transport of metal ions. *Plant. Molecular Biology* **33**, 1085-1092.
- Bettini, S. & Gradoni, L. (1986).** Canine leishmaniasis in the Mediterranean area and its implications for human leishmaniasis. *Insect. Sci. Appl.* **7**, 241-245.
- Biggs, T. E., Baker, S. T., Botham, M. S., Dhital, A., Barton, C. H. & Perry, V. H. (2001).** *Namp1* modulates iron homeostasis in vivo and in vitro: evidence for a role in cellular iron release involving de-acidification of intracellular vesicles. *European Journal of Immunology* **31**, 2060-2070.
- Binns, M. M., Holmes, N. G., Marti, E. & Bowen, N. (1995).** Dog parentage testing using canine microsatellites. *Journal of Small Animal Practice* **36**, 493-497.
- Blackwell, J. M. (1982).** Genetic control of recovery from visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **76**, 147-151.
- Blackwell, J. M. (1996).** Structure and function of the natural-resistance-associated macrophage protein (*Nramp1*), a candidate protein for infectious and autoimmune disease susceptibility. *Molecular Medicine Today* **2**, 205-211.
- Blackwell, J. M. (1998).** Genetics of host resistance and susceptibility to intramacrophage pathogens: a study of multicase families of tuberculosis,

- leprosy and leishmaniasis in north-eastern Brazil. *International Journal for Parasitology* **28**, 21-28.
- Blackwell, J. M., Barton, C. H., White, J. K., Searle, S., Baker, A. M., Williams, H. & Shaw, M. A. (1995).** Genomic organization and sequence of the human *NRAMP* gene: identification and mapping of a promoter region polymorphism. *Molecular Medicine* **1**, 194-205.
- Blackwell, J. M., Black, G. F., Peacock, C. S., Miller, E. N., Sibthorpe, D., Gnananandha, D., Shaw, J. J., Silveira, F., Lins-Lainson, Z., Ramos, F., Collins, A. & Shaw, M.-A. (1997).** Immunogenetics of leishmanial and micobacterial infections: the Belem family study. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **352**, 1331-1345.
- Blackwell, J. M., Freeman, J. & Bradley, D. (1980).** Influence of H-2 complex on acquired resistance to *Leishmania donovani* infection in mice. *Nature* **283**, 72-74.
- Blackwell, J. M., Roach, T. I., Atkinson, S. E., Ajioka, J. W., Barton, C. H. & Shaw, M. A. (1991).** Genetic regulation of macrophage priming/activation: the *Lsh* gene story. *Immunology Letters* **30**, 241-248.
- Blackwell, J. M. & Searle, S. (1999).** Genetic regulation of macrophage activation: understanding the function of *Nramp1*. *Immunology Letters* **65**, 73-80.
- Blackwell, J. M., Searle, S., Goswami, T. & Miller, N. E. (2000).** Understanding the multiple functions of *Nramp1*. *Microbes and Infection* **2**, 317-321.
- Bogdan, C. & Röhlhoff, M. (1999).** How do protozoan parasites survive inside macrophages?. *Parasitology Today* **15**, 22-28.
- Bowcock, A. M., Ruiz-Linares, A., Tomfohrde, J., Minch, E., Kidd, J. R. & Cavalli-Sforza, L. L. (1994).** High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature* **368**, 455-457.

- Bradley, D. J. (1974).** Genetic control of natural resistance to *Leishmania donovani*. *Nature* **250**, 353-354.
- Bradley, D. J. (1977).** Regulation of *Leishmania* populations within the host II. Genetic control of acute susceptibility of mice to *Leishmania donovani* infection. *Clinical of Experimental Immunology* **30**, 130-140.
- Bradley, D. J. (1982).** Introduction, and genetics of susceptibility to *Leishmania donovani*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **76**, 143-146.
- Bradley, D. J., Taylor, B. A., Blackwell, J. M., Evans, E. P. & Freeman, J. (1979).** Regulation of *Leishmania* populations within the host III. Mapping of the locus controlling susceptibility to visceral leishmaniasis in the mouse. *Clinical of Experimental Immunology* **37**, 7-17.
- Breen, M., Jouquand, S., Renier, C., Mellersh, C. S., Hitte, C., Holmes, N. G., Chéron, A., Suter, N., Vignaux, F., Bristow, A. E., Priat, C., McCann, E., André, C., Boundy, S., Gitsham, P., Thomas, R., Bridge, W. L., Spriggs, H. F., Ryder, E. J., Curson, A., Sampson, J., Ostrander, E. A., Binns, M. M. & Galibert, F. (2001).** Chromosome-specific single-locus FISH probes allow anchorage of an 1800-marker integrated radiation-hybrid/linkage map of the domestic dog genome to all chromosomes. *Genome Research* **11**, 1784-1795.
- Breen, M., Langford, C. F., Carter, N. P., Holmes, N. G., Dickens, H. F., Thomas, R., Suter, N., Ryder, E. J., Pope, M. & Binns, M. M. (1999a).** FISH mapping and identification of canine chromosomes. *The Journal of Heredity* **90**, 27-30.
- Breen, M., Thomas, R., Binns, M. M., Carter, N. P. & Langford, C. F. (1999b).** Reciprocal chromosome painting reveals detailed regions of synteny between

- the karyotype of the domestic dog (*Canis familiaris*) and human. *Genomics* **61**, 145-155.
- Brown, J. H., Jardetzky, T. S., Gorga, J. C. & al., e. (1993).** Three dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DRB1. *Nature* **364**, 33-39.
- Bull, R. W., Vriesendorp, H. M., Cech, R., Grosse-Wilde, H., Bijma, A. M., Ladiges, W. L., Krumbacher, K., Doxiadis, I., Ejima, H., Templeton, J., Albert, E. D., Storb, R. & Deeg, H. J. (1987).** Joint report of the third international workshop on canine immunogenetics. II. Analysis of the serological typing of cells. *Transplantation* **43**, 154-161.
- Bussmann, V., Lantier, I., Frédérique, P., Patri, S., Nau, F., Gros, P., Elsen, J. M. & Lantier, F. (1998).** cDNA cloning, structural organization, and expression of the sheep *NRAMP1* gene. *Mammalian Genome* **9**, 1027-1031.
- Buu, N., Sánchez, F. & Schurr, E. (2000).** The Bcg host-resistance gene. *Clinical Infectious Diseases* **31**, S81-S85.
- Cabral, M., O'Grady, J. E., Gomes, S., Sousa, J. C., Thompson, H. & Alexander, J. (1998).** The immunology of canine leishmaniosi: strong evidence for a developing disease spectrum for asymptomatic dogs. *Veterinary Parasitology* **76**, 173-180.
- Cellier, M., Belouchi, A. & Gros, P. (1996).** Resistance to intracellular infections: comparative genomics analysis of *Nramp*. *Trends in Genetics* **12**, 201-204.
- Cellier, M., Govoni, G., Vidal, S., Kwan, T., Groulx, N., Liu, J., Sanchez, F., Skamene, E., Schurr, E. & Gros, P. (1994).** Human natural resistance-associated macrophage protein: cDNA cloning, chromosomal mapping, genomic organisation, and tissue-specific expression. *Journal of Experimental Medicine* **180**, 1741-1752.

- Cellier, M., Privé, G., Belouchi, A., Kwan, T., Rodrigues, V., Chia, W. & Gros, P. (1995).** Nramp defines a family of membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 10089-10093.
- Cellier, M., Shustik, C., Dalton, W., Rich, E., Hu, J., Malo, D., Schurr, E. & Gros, P. (1997).** Expression of the human *NRAMP1* gene in professional primary phagocytes: studies in blood cells and in HL-60 promyelocytic leukemia. *Journal of Leukocyte Biology* **61**, 96-105.
- Cervino, A. C., Lakiss, S., Sow, O. & Hill, A. V. (2000).** Allelic association between the *NRAMP1* gene and susceptibility to tuberculosis in Guinea-Conakry. *Ann. Hum. Genet.* **64**, 507-512.
- Cole, S. T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S. V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry III, C. E., Tekaia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Krogh, A., McLean, J., Moule, S., Murphy, L., Oliver, S., Osborne, J., Quail, M. A., Rajandream, M. A., Rogers, J., Rutter, S., Seeger, K., Skelton, S., Squares, S., Sqaes, R., Sulston, J. E., Taylor, K., Whitehead, S. & Barrell, B. G. (1998).** Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **393**, 537-544.
- Cole, S. T., Eiglmeir, K., Parkhill, J., James, K. D., Thomson, N. R., Wheeler, P. R., Honore, N., Ganier, T., Churcher, C., Harris, D., Mungall, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R. M., Devlin, K., Duthoy, S., Feltwell, T., Fraser, A., Hamlin, N., Holroyd, S., Hosnsby, T., Jagels, K., Lacroix, C., Maclean, J., Moule, S., Murphy, L., Oliver, Quail, M. A., Rajandream, M. -A., Rutherford, K. M., Rutter, S., Seeger, K., Simon, S., Simmonds, M., Skelton, J., Squares, R.,**

- Squares, S., Stevens, K., Taylor, K., Whitehead, S., Woodward, J. R. & Barrell, B. G. (2001).** Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature* **409**, 1007-1011.
- Comabella, M., Altet, L., Peris, F., Villoslada, P., Sánchez, A. & Montalbán, X. (2002).** Genetic analysis of NRAMP1 gene polymorphisms in multiple sclerosis patients. *Neurology*. Submitted.
- Cox, F. E. G. (1981).** Leishmaniasis and mouse genetics. *Nature* **291**, 111-112.
- Crocker, P. R., Blackwell, J. M. & Bradley, D. J. (1984).** Expression of the natural resistance Gene *Lsh* in resident liver macrophages. *Infection and Immunity* **43**, 1033-1040.
- Deeg, H. J., Raff, R. F., Grosse-Wilde, H., Bijma, A. M., Buurman, W. A., Doxiadis, I., Kolb, H. J., Krumbacher, K., Ladiges, W., Losslein, K. L., Schoch, G., Westbroek, D. L., Bull, R. W. & Storb, R. (1986).** Joint report of the third international workshop on canine immunogenetics. I. Analysis of homozygous typing cells. *Transplantation* **41**, 111-117.
- Deka, R., Jin, L., Shriver, M. D., Yu, L. M., DeCru, S., Hundrieser, J., Bunker, C. H., Ferrell, R. E. & Chakraborty, R. (1995).** Population genetics of dinucleotide (dC-dA)_n(dG-dT)_n polymorphisms in world populations. *American Journal of Human Genetics* **56**, 461-474.
- Denis, M., Forget, A., Pelletier, M. & Skamene, E. (1988).** Pleiotropic effects of the *Bcg* gene: III. Respiratory burst in *Bcg* congenic macrophages. *Clinical Experimental Immunology* **73**, 370-375.
- DeTolla, L. J., Semprevivo, L. H., Palczuk, N. C. & Passmore, H. C. (1980).** Genetic control of acquired resistance to visceral leishmaniasis in mice. *Immunogenetics* **10**, 353-361.
- Dorschner, M. O. & Phillips, R. B. (1999).** Comparative analysis of two *Nramp* loci from rainbow trout. *DNA Cell Biology* **18**, 573-583.

- Dosik, J. K., Barton, C. H., Holiday, D. L., Krall, M. M., Blackwell, J. M. & Mock, B. A. (1994).** An *Nramp*-related sequence maps to mouse chromosome 17. *Mammalian Genome* **5**, 458-460.
- D'Souza, J., Cheah, P. Y., Gros, P., Chia, W. & Rodrigues, V. (1999).** Functional complementation of the *malvolio* mutation in the taste pathway of *Drosophila melanogaster* by the human natural resistance-associated macrophage protein 1 (*Nramp*-1). *Journal of Experimental Biology* **202**, 1909-1915.
- Dutra, A. S., Mignot, E. & Puck, J. M. (1996).** Genetic localization and syntenic mapping by FISH in the dog. *Cytogenetics and Cell Genetics* **74**, 113-117.
- Evans, C. A., Harbuz, M. S., Ostefeld, T., Norrish, A. & Blackwell, J. M. (2001).** *Nramp1* is expressed in neurons and is associated with behavioural and immune responses to stress. *Neurogenetics* **3**, 69-78.
- Feng, J., Li, Y., Hashad, M., Schurr, E., Gros, P., Adams, L. G. & Templeton, J. W. (1996).** Bovine natural resistance associated macrophage protein 1 (*Nramp1*) gene. *Genome Research* **6**, 956-964.
- Ferrer, L., Solano-Gallego, L., Arboix, M. & Alberola, J. (2002).** Evaluation of the specific immune response in dogs infected by *Leishmania infantum*. In *Advances in Veterinary Dermatology*. In press.
- Forbes, J. R. & Gros, P. (2001).** Divalent-metal transport by NRAMP proteins at the interface of host-pathogen interactions. *TRENDS in Microbiology* **9**, 397-403.
- Formica, S., Roach, T. I. & Blackwell, J. M. (1994).** Interaction with extracellular matrix proteins influences *Lsh/Ity/Bcg* (candidate *Nramp*) gene regulation of macrophage priming/activation for tumor necrosis factor - alpha and nitrate release. *Immunology* **82**, 42-50.

- Francino, O., Altet, L., Amills, A. & Sánchez, A. (1996).** Characterization of the polymorphism in the DRB and DQB genes of the canine MHC. *Animal Genetics* **27**, 49.
- Francino, O., Amills, M. & Sánchez, A. (1997).** Canine Mhc DRB1 genotyping by PCR-RFLP analysis. *Animal Genetics* **28**, 41-45.
- Francisco, L. V., Langston, A. A., Mellersh, C. S., Neal, C. L. & Ostrander, E. A. (1996).** A class of highly polymorphic tetranucleotide repeats for canine genetic mapping. *Mammalian Genome* **7**, 359-362.
- Fredholm, M. & Wintero, A. K. (1995).** Variation of short tandem repeats within and between species belonging to the *Canidae* family. *Mammalian Genome* **6**, 11-18.
- Fredholm, M. & Wintero, A. K. (1996).** Efficient resolution of parentage in dogs by amplification of microsatellites. *Animal Genetics* **27**, 19-23.
- Gaudenz, G. (1999).** Approaches to canine hereditary disease mapping. In *9th Annual Congress of the European Society of Veterinary Internal Medicine*. Perugia, Italy. pp. 88-90.
- Ge, L., Remmers, E. F., Du, Y. & Wilder, R. L. (1996).** Genomic cloning and genetic mapping of the rat *Nramp1* (Bcg) gene on chromosome 9. *Mammalian Genome* **7**, 856-856.
- Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J. D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E. J., Mewes, H. W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H. & Oliver, S. G. (1996).** Life with 6000 genes. *Science* **274**, 546.
- Govoni, G., Gauthier, S., Billia, F., Iscove, N. N. & Gros, P. (1997).** Cell-specific and inducible *Nramp1* gene expression in mouse macrophages in vitro and in vivo. *Journal of Leukocyte Biology* **62**, 277-286.

- Govoni, G., Vidal, S., Cellier, M., Lepage, P., Malo, D. & Gros, P. (1995).** Genomic structure, promoter sequence, and induction of expression of the mouse *Nramp1* gene in macrophages. *Genomics* **27**, 9-19.
- Govoni, G., Vidal, S., Gauthier, S., Skamene, E., Malo, D. & Gros, P. (1996).** The *Bcg/Ity/Lsh* locus: genetic transfer of resistance to infections in C57BL/6J mice transgenic for the *Nramp*^{Gly169} allele. *Infection and Immunity* **64**, 2923-2929.
- Graham, A. M., Dollinger, M. M., Howie, S. E. M. & Harrison, D. J. (2000).** Identification of novel alleles at the polymorphic microsatellite repeat region in the human *NRAMP1* gene promoter: analysis of allele frequencies in primary biliary cirrhosis. *J. Med. Genet.* **37**, 150-152.
- Greenwood, C. M. T., Fujiwara, T. M., Boothroyd, L. J., Miller, M. A., Frappier, D., Fanning, E. A., Schurr, E. & Morgan, K. (2000).** Linkage of tuberculosis to Chromosome 2q35 loci, including *NRAMP1*, in a large aboriginal canadian family. *American Journal of Human Genetics* **67**, 405-416.
- Gros, P., Skamene, E. & Forget, A. (1981).** Genetic control of natural resistance to *Mycobacterium bovis* (BCG) in mice. *Journal of Immunology* **127**, 2417-2421.
- Gruenheid, S., Cellier, M., Vidal, S. & Gros, P. (1995).** Identification and characterization of a second mouse *Nramp* gene. *Genomics* **25**, 514-525.
- Gruenheid, S. & Gros, P. (2000).** Genetic susceptibility to intracellular infections: *Nramp1*, macrophage function and divalent cation transport. *Current Opinion in Microbiology* **3**, 43-48.
- Gruenheid, S., Pinner, E., Desjardins, M. & Gros, P. (1997).** Natural resistance to infection with intracellular pathogens: the *Nramp1* protein is recruited to the membrane of the phagosome. *Journal of Experimental Medicine* **185**, 717-730.

- Gunshin, H., Mackenzie, B., Berger, U. V., Gunshin, Y., Romero, M. F., Boron, W. F., Nussberger, S., Gollan, J. L. & Hediger, M. A. (1997).** Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* **388**, 482-488.
- Hammond, H. A., Jin, L., Zhong, Y., Caskey, C. T. & Chakraborty, R. (1994).** Evaluation of 13 short tandem repeat loci for use in personal identification applications. *American Journal of Human Genetics* **55**, 175-189.
- Hayashi, N., Ito, M., Horiike, S. & Taguchi, H. (2001).** Molecular cloning of a putative divalent-cation transporter gene as a new genetic marker for the identification of *Lactobacillus brevis* strains capable of growing in beer. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **55**, 596-603.
- Hedrick, P. W., Lee, R. N. & Parker, K. M. (2000).** Major histocompatibility complex (MHC) variation in the endangered Mexican wolf and related canids. *Heredity* **85**, 617-624.
- Hill, A. V. S. (1998).** Host genetics of infectious diseases: old and new approaches converge. *Emerging Infectious Diseases* **4**, 695-697.
- Hofmeister, A., Neibergs, H. L., Pokorny, R. M. & Galandiuk, S. (1997).** The natural resistance-associated macrophage protein gene is associated with Crohn's disease. *Surgery* **122**, 173-178.
- Holmes, N. G., Dickens, H. F., Parker, H. L., Binns, M. M., Mellersh, C. S. & Sampson, J. (1995).** Eighteen canine microsatellites. *Animal Genetics* **26**, 132-133.
- Holmes, N. G., Mellersh, C. S., Humphreys, S. J., Binns, M. M., Holliman, A., Curtis, R. & Sampson, J. (1993).** Isolation and characterization of microsatellites from the canine genome. *Animal Genetics* **24**, 289-292.

- Horín, P., Rychlík, I., Templeton, J. W. & Adams, L. G. (1999).** A complex pattern of microsatellite polymorphism within the bovine *NRAMP1* gene. *European Journal of Immunogenetics* **26**.
- Hu, J., Brumstead, N., Burke, D., Ponce de León, F. A., Skamene, E., Gros, P. & Malo, D. (1995).** Genetic and physical mapping of the natural resistance-associated macrophage protein 1 (*NRAMP1*) in chicken. *Mammalian Genome* **6**, 809-815.
- Hu, J., Bumstead, N., Barrow, P., Sebastiani, G., Olien, L., Morgan, K. & Malo, D. (1997).** Resistance to salmonellosis in the chicken is linked to *NRAMP1* and *TNC*. *Genome Research* **7**, 693-704.
- Hughes, A. L. & Yeager, M. (1998).** Natural selection at major histocompatibility complex loci of vertebrates. *Annual Reviews in Genetics* **32**, 415-435.
- Jabado, N., Jankowski, A., Dougaparsad, S., Picard, V., Grinstein, S. & Gros, P. (2000).** Natural resistance to intracellular infections: natural resistance-associated macrophage protein 1 (*NRAMP1*) functions as a pH-dependent manganese transporter at the phagosomal membrane. *Journal of Experimental Medicine* **192**, 1237-1247.
- Jeffreys, A. J., Turner, M. & Debenham, P. (1991).** The efficiency of multilocus DNA fingerprint probes for individualization and establishment of family relationships, determined from extensive casework. *American Journal of Human Genetics* **48**, 824-840.
- Karupiah, G., Hunt, N. H., King, N. J. & Chaudhri, G. (2000).** NADPH oxidase, *Nramp1* and nitric oxide synthase 2 in the host antimicrobial response. *Reviews of Immunogenetics* **2**, 387-415.
- Kawashima, T., Yamamoto, Y., Aramaki, H., Nunoshiba, T., Kawamoto, T., Watanabe, K., Yamazaki, M., Kanehori, K., Amano, N., Ohya, Y.,**

- Makino, K. & Suzuki, M. (1999).** Determination of the complete genomic DNA sequence of *Thermoplasma volvanium* GSSI. *Proc. Jpn. Acad.* **75**, 213-218.
- Kaye, P. M. & Blackwell, J. M. (1989).** Lsh, antigen presentation and the development of CMI. *Research Immunology* **140**, 810-815.
- Keenan, C. M., Hendricks, L. D., Lightner, L., Webster, H. K. & Johnson, A. J. (1984).** Visceral leishmaniasis in German shepherd dog. I. Infection, clinical disease, and clinical pathology. *Veterinary Parasitology* **21**, 74-79.
- Kehres, D. G., Zaharik, M. L., Finlay, B. B. & Maguire, M. E. (2000).** The NRAMP proteins of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* are selective manganese transporters involved in the response to reactive oxygen. *Molecular Microbiology* **36**, 1085-1100.
- Kennedy, L. J., Barnes, A., Carter, S. D., Bennett, D., Ollier, W. E. R. & Thomson, W. (2001).** Interbreed variation of DLA-DRB1, DQA1, DQB1 alleles and haplotypes in the dog. In *6th International Veterinary Immunology Symposium*. pp. 220. Edited by C. Fossum, E. Wattrang & G. V. Alm. Uppsala, Sweden.
- Kennedy, L. J., Carter, S. D., Barnes, A., Bell, S., Bennett, D., Ollier, B. & Thomson, W. (1999).** DLA-DRB1 polymorphism in dogs defined by sequence-specific oligonucleotide probes (SSOP). *Tissue Antigens* **53**, 184-189.
- Kishi, F. & Nobumoto, M. (1995).** Identification of natural resistance-associated macrophage protein in peripheral blood lymphocytes. *Immunology Letters* **47**, 93-96.
- Kotze, M. J., de Villiers, N. P., Rooney, R. N., Grobbelaar, J. J., Mansvelt, E. P. G., Bouwens, C. S. H., Carr, J., Stander, I. & du Plessis, L. (2001).** Analysis of the *NRAMP1* gene implicated in iron transport: association with multiple sclerosis and age effects. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* **27**, 44-53.

Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A. M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M. G., Bessieres, P., Bolotin, A., Borchert, S., Borriss, R., Bousier, L., Brans, A., Braun, M., Brignell, S. C., Bron, S., Brouillet, S., Bruschi, C. V., Caldwell, B., Capuano, V., Carter, N. M., Choi, S. K., Codani, J. J., Connerton, I. F., Cummings, N. J., Daniel, R. A., Denizot, F., Devine, K. M., Dusterhoft, A., Ehrlich, S. D., Emmerson, P. T., Entian, K. D., Errington, J., Fabret, C., Ferrari, E., Foulger, D., Fritz, C., Fujita, M., Fujita, Y., Fuma, S., Galizzi, A., Galleron, N., Ghim, S. Y., Glaser, P., Goffeau, A., Golightly, E. J., Grandi, G., Guiseppi, G., Guy, B. J., Haga, K., Haiech, J., Harwood, C. R., Henaut, A., Hilbert, H., Holsappel, S., Hosono, S., Hullo, M. F., Itaya, M., Jones, L., Joris, B., Karamata, D., Kasahara, Y., Klaerr-Blanchard, M., Klein, C., Kobayashi, Y., Koetter, P., Koningstein, G., Krogh, S., Kumano, M., Kurita, K., Lapidus, A., Lardinois, S., Lauber, J., Lazarevic, V., Lee, S. M., Levine, A., Liu, H., Masuda, S., Mauel, C., Medigue, C., Medina, N., Mellado, R. P., Mizuno, M., Moestl, D., Nakai, S., Noback, M., Noone, D., O'Reilly, M., Ogawa, K., Ogiwara, A., Oudega, B., Park, S. H., Parro, V., Pohl, T. M., Portetelle, D., Porwollik, S., Prescott, A. M., Presecan, E., Pujic, P., Purnelle, B., et al. (1997). The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390**, 249-256.

Kuroda, M., Ohta, T., Uchiyama, I., Baba, T., Yuzawa, H., Kobayashi, I., Cui, L., Oguchi, A., Aoki, K., Nagai, Y., Lian, J., Ito, T., Kanamori, M., Matsumaru, H., Maruyama, A., Murakami, H., Hosoyama, A., Mizutani-Ui, Y., Kobayashi, N., Sawano, T., Inoue, R., Kaito, C., Sekimizu, K., Hirakawa, H., Kuhara, S., Goto, S., Yabuzaki, J., Kanehisa, M., Yamashita, A., Oshima, K., Furuya, K., Yoshino, C., Shiba, T., Hattori,

- M., Ogasawara, N., Hayashi, H. & Hiramatsu, K. (2001).** Whole genome sequencing of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Lancet* **357**, 1225-1240.
- Lafuente, M. J., Gamo, F. J. & Gancedo, C. (1996).** DNA sequence analysis of a 10 624 bp fragment of the left arm of chromosome XV from *Saccharomyces cerevisiae* reveals a RNA binding protein, a mitochondrial protein, two ribosomal proteins and two new open reading frames. *Yeast* **12**, 1041-1045.
- Lang, T., Prina, E., Sibthorpe, D. & Blackwell, J. M. (1997).** *Nramp1* transfection transfers *Ity/Lsh/Bcg*-related pleiotropic effects on macrophage activation: influence on antigen processing and presentation. *Infection and Immunity* **65**, 380-386.
- Langston, A. A., Mellersh, C. S., Neal, C. L., Ray, K., Acland, G. M., Gibbs, M., Aguirre, G. D., Fournier, R. E. K. & Ostrander, E. A. (1997).** Contruction of a panel of canine-rodent hybrid cell lines for use in partitioning of the canine genome. *Genomics* **46**, 317-325.
- Leclercq, V., Lebastard, M., Belkaid, Y., Louis, J. & Milon, G. (1996).** The outcome of the parasitic process initiated by *Leishmania infantum* in laboratory mice. *The Journal of Immunology* **157**, 4537-4545.
- Lee, P. L., Gelbart, T., West, C., Halloran, C. & Beutler, E. (1998).** The human *Nramp2* gene: characterization of the gene structure, alternative splicing, promoter region and polymorphisms. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* **24**, 199-215.
- Lingaas, F., Sorensen, A., Juneja, R. K., Johansson, S., Fredholm, M., Wintero, A. K., Sampson, J., Mellersh, C., Curzon, A., Holmes, N. G., Binns, M. M., Dickens, H. F., Ryder, E. J., Gerlach, J., Bäumle, E. & Dolf, G. (1997).** Towards construction of a canine linkage map: establishment of 16 linkage groups. *Mammalian Genome* **8**, 217-221.

- Little, A. M. & Parham, P. (1999).** Polymorphism and evolution of HLA class I and II genes and molecules. *Reviews of Immunogenetics* **1**, 105-123.
- Liu, J., Fujiwara, T. M., Buu, N. T., Sánchez, F. O., Cellier, M., Paradis, A. J., Frappier, D., Skamene, E., Gros, P., Morgan, K. & Schurr, E. (1995).** Identification of polymorphisms and sequence variants in the human homologue of the mouse natural resistance-associated macrophage protein gene. *American Journal of Human Genetics* **56**, 845-853.
- Lyons, L. A., Laughlin, T. F., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Womack, J. E. & O'Brien, S. J. (1997).** Comparative anchor tagged sequences (CATS) for integrative mapping of mammalian genomes. *Nature Genetics* **15**, 47-56.
- Mackintosh, C. G., Qureshi, T., Waldrup, K., Labes, R. E., Dodds, K. G. & Griffin, J. F. T. (2000).** Genetic resistance to experimental infection with *Mycobacterium bovis* in red deer (*Cervus elaphus*). *Infection and Immunity* **68**, 1620-1625.
- Makino, K., Yokoyama, K., Kubota, Y., Yutsudo, C. H., Kimura, S., Kurokawa, K., Ishii, K., Hattori, M., Tatsuno, I., Abe, H., Iida, T., Yamamoto, K., Ohnishi, M., Hayashi, T., Yasunaga, T., Honda, T., Sasakawa, C. & Shinagawa, H. (1999).** Complete nucleotide sequence of the prophage VT2-Sakai carrying the verotoxin 2 genes of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 derived from the Sakai outbreak. *Genes Genet. Syst.* **74**, 227-239.
- Malo, D., Vogan, K., Vdal, S., Hu, J., Cellier, M., Shurr, E., Fuks, A., Bumstead, N., Morgan, K. & Gros, P. (1994).** Haplotype mapping and sequence analysis of mouse *Nramp* gene predict susceptibility to infection with intracellular parasites. *Genomics* **23**, 51-61.
- Mariat, D., Amigues, Y. & Boscher, M. Y. (1998).** Eight canine tetranucleotide repeats. *Animal Genetics* **29**, 156-157.

- Mariat, D., Kessler, J. L., Vaiman, D. & Panthier, J. J. (1996).** Polymorphism characterization of five canine microsatellites. *Animal Genetics* **27**, 434-435.
- Marquet, S., Sánchez, F. O., Arias, M., Rodríguez, J., París, S. C., Skamene, E., Schurr, E. & García, L. F. (1999).** Variants of the human *NRAMP1* gene and altered Human Immunodeficiency Virus infection susceptibility. *The Journal of Infectious Diseases* **180**, 1521-1525.
- Matthews, G. D. & Crawford, A. M. (1998).** Cloning, sequencing and linkage mapping of the *NRAMP1* gene of sheep and deer. *Animal Genetics* **29**, 1-6.
- Meddeb-Garnaoui, A., Gritli, S., Garbouj, S., Ben Fadhel, M., El Kares, R., Mansour, L., Kaabi, B., Chouchane, L., Ben Salah, A. & Dellagi, K. (2001).** Association analysis of HLA-class II and class III gene polymorphisms in the susceptibility to mediterranean visceral leishmaniasis. *Human Immunology* **62**, 509-517.
- Mellersh, C., Holmes, N., Binns, M. & Sampson, J. (1994).** Dinucleotide repeat polymorphisms at four canine loci (LEI003, LEI007, LEI008 and LEI015). *Animal Genetics* **25**, 125.
- Mellersh, C. S., Hitte, C., Richman, M., Vignaux, F., Priat, C., Jouquand, S., Werner, P., André, C., DeRose, S., Patterson, D. F., Ostrander, E. A. & Galibert, F. (2000).** An integrated linkage-radiation hybrid map of the canine genome. *Mammalian Genome* **11**, 120-130.
- Mellersh, C. S., Langston, A. A., Acland, G. M., Fleming, M. A., Ray, K., Wiegand, N. A., Francisco, L. V., Gibbs, M., Aguirre, G. D. & Ostrander, E. A. (1997).** A linkage map of the canine genome. *Genomics* **46**, 326-336.
- Mellersh, C. S. & Ostrander, E. A. (1997).** The canine genome. *Advances in Veterinary Medicine* **40**, 191-216.

- Morera, L., Barba, C. J., Garrido, J. J., Barbancho, M. & de Andrés, D. F. (1999).** Genetic variation detected by microsatellites in five spanish dog breeds. *The Journal of Heredity* **90**, 654-656.
- Neff, M. W., Bromann, K. W., Mellersh, C. S., Ray, K., Acland, G. M., Aguirre, G. D., Ziegle, J. S., Ostrander, E. A. & Rine, J. (1999).** A second-generation genetic linkage map of the domestic dog, *Canis familiaris*. *Genetics* **151**, 803-820.
- Nolling, J., Breton, G., Omelchenko, M. V., Markarova, K. S., Zeng, Q., Gibson, R., Lee, H. M., Dubois, J., Qiu, D., Hitti, J., Wolf, Y. I., Tatusov, R. L., Sabathe, F., Doucette-Stamm, L., Soucaille, P., Daly, M. J., Bennett, G.-N. -, Koonin, E. V. & Smith, D. R. (2001).** Genome sequence and comparative analysis of the solvent-producing bacterium *Clostridium acetobutylicum*. *The Journal of Bacteriology* **183**, 4823-4838.
- O'Briens, S. J., Womack, J. E., Lyons, L. A., Moore, K. J., Jenkins, N. A. & Copeland, N. G. (1993).** Anchored reference loci for comparative genome mapping in mammals. *Nature Genetics* **3**, 103-112.
- Oliver, M., Cook, P., Desanctis, J., Hel, Z., Wojciechowski, W., Reiner, N. E., Skamene, E. & Radzioch, D. (1998).** Phenotypic difference between Bcg^r and Bcg^S macrophages is related to differences in protein-Kinase-C-dependent signalling. *European Journal of Biochemistry* **251**, 734-743.
- Ostrander, E. A., Mapa, F. A., Yee, M. & Rine, J. (1995).** One hundred and one new simple sequence repeat-based markers for the canine genome. *Mammalian Genome* **6**, 193-195.
- Ostrander, E. A., Sprague, G. F. J. & Rine, J. (1993).** Identification and characterization of dinucleotide repeat (CA)_n markers for genetic mapping in dog. *Genomics* **16**, 207-213.

- Parkhill, J., Wren, B. W., Thomson, N. R., Titball, R. W., Holden, M. T. G., Prentice, M. B., Sebaihia, M., James, K. D., Churcher, C., Mungall, K. L., Baker, S., Basham, D., Bentley, S. D., Brooks, K., Cerdeno-Tarraga, A. M., Chillingworth, T., Cronin, A., Davies, R. M., Davis, P., Dougan, G., Feltwell, T., Hamlin, N., Holroyd, S., Jagels, K., Leather, S., Karlyshev, A. V., Moule, S., Oyston, P. C. F., Quail, M., Rutherford, K., Simmonds, M., Skelton, J., Stevens, K., Whitehead, S. & Barrell, B. G. (2001).** Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. *Nature* **413**, 523-527.
- Perna, N. T., Plunkett, G. I., Burland, V., Mau, B., Glasner, J. D., Rose, D. J., Mayhew, G. F., Evans, P. S., Gregor, J., Kirkpatrick, H. A., Posfai, G., Hackett, J., Klink, S., Boutin, A., Shao, Y., Miller, L., Grotbeck, E. J., Davis, N. W., Lim, A., Dimalanta, E., Potamouisis, K., Apodaca, J., Anantharaman, T. S., Lin, J., Yen, G., Schwartz, D. C., Welch, R. A. & Blattner, F. R. (2001).** Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature* **409**, 529-533.
- Pinelli, E., Gebhard, D., Mommaas, A. M., van Hoeij, M., Langermans, J. A. M., Ruitenber, E. J. & Rutten, V. P. M. G. (2000).** Infection of canine macrophage cell line with *Leishmania infantum*: determination of nitric oxide production and anti-leishmanial activity. *Veterinary Parasitology* **92**, 181-189.
- Pinelli, E., Killick-Kendrick, R., Wagenaar, J., Bernadina, W., del Real, G. & Ruitenber, J. (1994).** Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infection and Immunity* **62**, 229-235.
- Pinelli, E., Rutten, V. P. M. G. & Ruitenber, E. J. (1999).** Cellular immune responses in canine leishmaniasis. In *Canine Leishmaniasis: an update.*, pp. 60-65. Edited by R. Killick-Kendrick. Barcelona: Hoechst Roussel Vet.

- Pinner, E., Gruenheid, S., Raymond, S. & Gros, P. (1997).** Functional complementation of the yeast divalent cation transporter family SMF by NRAMP2, a member of the mammalian natural resistance-associated macrophage protein family. *J. Biol. Chem.* **272**, 28933-28938.
- Pitel, F., Cribiu, E. P., Yerle, M., Lahbib-Mansais, Y., Lanneluc, I., Lantier, F. & Gellin, J. (1995).** Regional localization of the ovine *NRAMP* gene to chromosome 2q41–q42 by *in situ* hybridization. *Cytogenetics and Cell Genetics* **70**, 116-118.
- Pitel, F., Lantier, I., Riquet, J., Lanneluc, I., Tabet-Aoul, K., Saidi-Mehtar, N., Lantier, F. & Gellin, J. (1994).** Cloning, sequencing, and localization of an ovine fragment of the *NRAMP* gene, a candidate for the *ITY/LSH/BCG* gene. *Mammalian Genome* **5**, 834-835.
- Plant, J. E., Blackwell, J. M., O'Brien, A. D., Bradley, D. J. & Glynn, A. A. (1982).** Are the *Lsh* and *Ity* disease resistance genes at one locus on mouse chromosome 1?. *Nature* **297**, 510-511.
- Plant, J. E. & Glynn, A. (1976).** Genetics of resistance to infection with *Salmonella typhimurium* in mice. *The Journal of Infectious Diseases* **133**, 72-78.
- Polvi, A., Gerden, O. A., Elwood, C. M., Sorensen, S. H., Batt, R. M., Mäki, M. & Partanen, J. (1997).** Canine major histocompatibility complex genes DQA and DQB in Irish setter dogs. *Tissue Antigens* **49**, 236-243.
- Priat, C., Hitte, C., Vignaux, F., Renier, C., Jiang, Z., Jouquand, S., Chéron, A., André, C. & Galibert, F. (1998).** A whole-genome radiation hybrid map of the dog genome. *Genomics* **54**, 361-378.
- Redenbach, M., Kieser, H. M., Denapaite, D., Eichner, A., Cullum, J., Kinashi, H. & Hopwood, D. A. (1996).** A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 Mb *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. *Molecular Microbiology* **21**, 77-96.

- Reimann, N., Bartnitzke, S., Bullerdiek, J., Schmitz, U., Rogalla, P., Nolte, I. & Ronne, M. (1996).** An extended nomenclature of the canine karyotype. *Cytogenetics and Cell Genetics* **73**, 140-144.
- Reimann, N., Bartnitzke, S., Nolte, I. & Bullerdiek, J. (1999).** Working with canine chromosomes: current recommendations for Karyotype description. *The journal of Heredity* **90**, 31-34.
- Richman, A. D., Herrera, L. G. & Nash, D. (2001).** MHC class II beta sequence diversity in the deer mouse (*Peromyscus maniculatus*): implications for models of balancing selection. *Molecular Ecology* **10**, 2765-2773.
- Roach, T. I., Chatterjee, D. & Blackwell, J. M. (1994).** Induction of early-response genes KC and JE by mycobacterial lipoarabinomannans: regulation of KC expression in murine macrophages by *Lsh/Ity/Bcg* (candidate *Nramp*). *Infection and Immunity* **62**, 1176-1184.
- Roach, T. I., Kiderlen, A. F. & Blackwell, J. M. (1991).** Role of inorganic nitrogen oxides and tumor necrosis factor alpha killing *Leishmania donovani* amastigotes in gamma interferon-lipopolysaccharide-activated macrophages from Lshs and Lshr congenic mouse strains. *Infection and Immunity* **59**, 3935-3944.
- Rodrigues, V., Cheah, P. Y., Ray, K. & Chia, W. (1995).** *Malvolio*, the *Drosophila* homologue of mouse *NRAMP-1* (*Bcg*), is expressed in macrophages and in the nervous system and is required for normal taste behaviour. *EMBO Journal* **14**, 3007-3020.
- Ruepp, A., Graml, W., Santos-Martinez, M. L., Koretke, K. K., Volker, C., Mewes, H. W., Frishman, D., Stocker, S., Lupas, A. N. & Baumeister, W. (2000).** The genome sequence of the thermoacidophilic scavenger *Thermoplasma acidophilum*. *Nature* **407**, 508-513.

- Saeij, J. P., Wiegertjes, G. F. & Slet, R. J. (1999).** Identification and characterization of a fish natural resistance-associated macrophage protein (NRAMP) cDNA. *Immunogenetics* **50**, 60-66.
- Sarmiento, U. M., DeRose, S., Sarmiento, J. I. & Storb, R. (1992).** Allelic variation in the DQ subregion of the canine major histocompatibility complex: I. DQA. *Immunogenetics* **35**, 416-420.
- Sarmiento, U. M., DeRose, S., Sarmiento, J. I. & Storb, R. (1993).** Allelic variation in the DQ subregion of the canine major histocompatibility complex: II. DQB. *Immunogenetics* **37**, 148-152.
- Sarmiento, U. M., Sarmiento, J. I. & Storb, R. (1990).** Allelic variation in the DR subregion of the canine major histocompatibility complex. *Immunogenetics* **32**, 13-19.
- Sarmiento, U. M. & Storb, R. (1988a).** Restriction fragment length polymorphism of the major histocompatibility complex of the dog. *Immunogenetics* **28**, 117-124.
- Sarmiento, U. M. & Storb, R. (1988b).** Characterization of class II alpha genes and DLA-D region allelic associations in the dog. *Tissue Antigens* **32**, 224-234.
- Sarmiento, U. M. & Storb, R. (1990).** Nucleotide sequence of a dog DRB cDNA clone. *Immunogenetics* **31**, 396-399.
- Searle, S. & Blackwell, J. M. (1999).** Evidence for a functional repeat polymorphism in the promoter of the human *NRAMP1* gene that correlates with autoimmune versus infectious disease susceptibility. *J. Med. Genet.* **36**, 295-299.
- Searle, S., Bright, N. A., Roach, T. I. A., Atkinson, P. G. P., Barton, C. H., Melen, R. H. & Blackwell, J. M. (1998).** Localisation of Nramp1 in macrophages: modulation with activation and infection. *Journal of Cell Science* **111**, 2855-2866.

- Shaw, M. -A., Clayton, D. & Blackwell, J. M. (1997).** Analysis of the candidate gene *NRAMP1* in the first 61 ARC National Reposytory Families for rheumatoid arthritis. *Journal of Rheumatology* **24**, 212-214.
- Simpson, A. J. G., Reinach, F. C., Arruda, P., Abreu, F. A., Acencio, M., Alvarenga, R., Alves, L. M. C., Araya, J. E., Baia, G. S., Baptista, C. S., Barros, M. H., Bonaccorsi, E. D., Bordin, S., Bove, J. M., Briones, M. R. S., Bueno, M. R. P., Camargo, A. A., Camargo, L. E. A., Carraro, D. M., Carrer, H., Colauto, N. B., Colombo, C., Costa, F. F., Costa, M. C. R., Costa-Neto, C. M., Coutinho, L. L., Cristofani, M., Dias-Neto, E., Docena, C., El-Dorry, H., Facincani, A. P., Ferreira, A. J. S., Ferreira, V. C. A., Ferro, J. A., Fraga, J. S., Franca, S. C., Franco, M. C., Frohme, M., Furlan, L. R., Garnier, M., Goldman, G. H., Goldman, M. H. S., Gomes, S. L., Gruber, A., Ho, P. L., Hoheisel, J. D., Junqueira, M. L., Kemper, E. L., Kitajima, J. P., Krieger, J. E., Kuramae, E. E., Laigret, F., Lambais, M. R., Leite, L. C. C., Lemos, E. G. M., Lemos, M. V. F., Lopes, S. A., Lopes, C. R., Machado, J. A., Machado, M. A., Madeira, A. M. B. N., Madeira, H. M. F., Marino, C. L., Marques, M. V., Martins, E. A. L., Martins, E. M. F., Matsukuma, A. Y., Menck, C. F. M., Miracca, E. C., Miyaki, C. Y., Monteiro-Vitorello, C. B., Moon, D. H., Nagai, M. A., Nascimento, A. L. T. O., Netto, L. E. S., Nhani Jr., A., Nobrega, F. G., Nunes, L. R., Oliveira, M. A., de Oliveira, M. C., de Oliveira, R. C., Palmieri, D. A., Paris, A., Peixoto, B. R., Pereira, G. A. G., Pereira Jr., H. A., Pesquero, J. B., Quaggio, R. B., Roberto, P. G., Rodrigues, V., de M. Rosa, A. J., de Rosa Jr., V. E., de Sa, R. G., Santelli, R. V., Sawasaki, H. E., da Silva, A. C. R., da Silva, F. R., da Silva, A. M., Silva Jr., W. A., da Silveira, J. F., et al. (2000).** The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. The *Xylella*

- fastidiosa* Consortium of the Organization for Nucleotide Sequencing and Analysis. *Nature* **406**, 151-157.
- Singh, N., Agrawal, S. & Rastogi, A. K. (1997).** Infectious diseases and immunity: special reference to major histocompatibility complex. *Emerging Infectious Diseases* **3**, 41-49.
- Skamene, E., Gros, P., Forget, A., Kongshavn, P. A. L., St Charles, C. & Taylor, B. A. (1982).** Genetic regulation of resistance to intracellular pathogens. *Nature* **297**, 506-509.
- Solano-Gallego, L., Llull, J., Ramos, G., Riera, C., Arboix, M., Alberola, J. & Ferrer, L. (2000).** The Ibizaian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. *Veterinary Parasitology* **84**, 33-43.
- Solbach, W., Moll, H. & Röllinghoff, M. (1991).** Lymphocytes play the music but the macrophage calls the tune. *Immunology Today* **12**, 4-6.
- Song, W.-C., Sarrias, M. R. & Lambris, J. D. (2000).** Complement and innate immunity. *Immunopharmacology* **49**, 187-198.
- Strauss-Ayali, D. & Baneth, G. (2000).** Canine visceral leishmaniosis. In Recent advances in canine infectious diseases. Edited by L.E. Carmichael. International Veterinary Information Service (www.ivis.org).
- St-Denis, A., Caouras, V., Gervais, F. & Descoteaux, A. (1999).** Role of protein Kinase C- α in the control of infection by intracellular pathogens in macrophages. *The Journal of Immunology* **163**, 5505-5511.
- Sun, H. S., Wang, L., Rothschild, M. F. & Tuggle, C. K. (1998).** Mapping of the natural resistance-associated macrophage protein 1 (*NRAMP1*) gene to pig chromosome 15. *Animal Genetics* **29**, 138-140.
- Sutton, M. D., Holmes, N. G., Brennan, F. B., Binns, M. M., Kelly, E. P. & Duke, E. J. (1998).** A comparative genetic analysis of the Irish greyhound

- population using multilocus DNA fingerprinting, canine single locus minisatellites and canine microsatellites. *Animal Genetics* **29**, 168-172.
- Tautz, D. (1989).** Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research* **17**, 6463-6471.
- Tautz, D. & Renz, M. (1984).** Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research* **12**, 4127-4138.
- Theologis, A., Ecker, J. R., Palm, C. J., Federspiel, N. A., Kaul, S., White, O., Alonso, J., Altafi, H., Araujo, R., Bowman, C. L., Brooks, S. Y., Buehler, E., Chan, A., Chao, Q., Chen, H., Cheuk, R. F., Chin, C. W., Chung, M. K., Conn, L., Conway, A. B., Conway, A. R., Creasy, T. H., Dewar, K., Dunn, P., Etgu, P., Feldblyum, T. V., Feng, J., Fong, B., Fujii, C. Y., Gill, J. E., Goldsmith, A. D., Haas, B., Hansen, N. F., Hughes, B., Huizar, L., Hunter, J. L., Jenkins, J., Johnson-Hopson, C., Khan, S., Khaykin, E., Kim, C. J., Koo, H. L., Kremenetskaia, I., Kurtz, D. B., Kwan, A., Lam, B., Langin-Hooper, S., Lee, A., Lee, J. M., Lenz, C. A., Li, J. H., Lin, X., Liu, S. X., Liu, Z. A., Luros, J. S., Maiti, R., Marziali, A., Militscher, J., Miranda, M., Nguyen, M., Nierman, W. C., Osborne, B. I., Pai, G., Peterson, J., Pham, P. K., Rizzo, M., Rooney, T., Rowley, D., Sakano, H., Salzberg, S. L., Schwartz, J. R., Shinn, P., Southwick, A. M., Sun, H., Tallon, L. J., Tambunga, G., Toriumi, M. J., Town, C. D., Utterback, T., Van Aken, S., Vaysberg, M., Vysotskaia, V. S., Walker, M., Wu, D., Yu, G., Fraser, C. M., Venter, J. C. & Davis, R. W. (2000).** Sequence and analysis of chromosome 1 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**, 816-820.
- Thomas, R., Holmes, N. G., Fischer, P. E., Dickens, H. F., Breen, M., Sampson, J. & Binns, M. M. (1997).** Eight canine microsatellites. *Animal Genetics* **28**, 153-154.

- Tuggle, C. K., Schmitz, C. B. & Gingerich-Feil, D. (1997).** Rapid communication: cloning of a pig full-length natural resistance associated macrophage protein (*NRAMP1*) cDNA. *Journal of Animal Science* **75**, 277.
- Vaiman, D., Mercier, D., Moazami-Goudarzi, K., Eggen, A., Ciampolini, R., Lepingle, A., Velmala, R., Kaukinen, J., Varvio, S. L., Martin, P. & al., e. (1994).** A set of 99 cattle microsatellites: characterization, syntenic mapping, and polymorphism. *Mammalian Genome* **5**, 288-297.
- Vidal, S., Belouchi, A. M., Cellier, M., Beatty, B. & Gros, P. (1995a).** Cloning and characterization of a second human *NRAMP* gene on chromosome 12q13. *Mammalian Genome* **6**, 224-230.
- Vidal, S., Tremblay, M. L., Govoni, G., Gauthier, S., Sebastiani, G., Malo, D., Skamene, E., Olivier, M., Jothy, S. & Gros, P. (1995b).** The *I ty/Lsh/Bcg* locus: natural resistance to infection with intracellular parasites is abrogated by disruption of the *Nramp1* gene. *Journal of Experimental Medicine* **182**, 655-666.
- Vidal, S. M., Malo, D., Vogan, K., Skamene, E. & Gros, P. (1993).** Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation a candidate for *Bcg*. *Cell* **73**, 469-485.
- Vidal, S. M., Pinner, E., Lepage, P., Gauthier, S. & Gros, P. (1996).** *Nramp1* encodes a membrane phosphoglycoprotein absent in macrophages from susceptible (*Nramp1*^{D169}) mouse strains. *The Journal of Immunology* **157**, 3559-3568.
- Vignaux, F., Hitte, C., Priat, C., Chuat, J. C., André, C. & Galibert, F. (1999a).** Construction and optimization of a dog whole genome radiation hybrid panel. *Mammalian Genome* **10**, 888-894.

- Vignaux, F., Priat, C., Jouquand, S., Hitte, C., Jiang, Z., Chéron, A., Renier, C., André, C. & Galibert, F. (1999b).** Toward a dog radiation hybrid map. *The Journal of Heredity* **90**, 62-67.
- Wagner, J. L., Burnett, R. C., DeRose, S. A., Francisco, L. V., Storb, R. & Ostrander, E. A. (1996a).** Histocompatibility testing of dog families with highly polymorphic microsatellite markers. *Transplantation* **62**, 876-877.
- Wagner, J. L., Burnett, R. C., DeRose, S. A. & Storb, R. (1996b).** Molecular analysis and polymorphism of the DLA-DQA gene. *Tissue Antigens* **48**, 199-204.
- Wagner, J. L., Burnett, R. C. & Storb, R. (1996c).** Molecular analysis of the DLA DR subregion. *Tissue Antigens* **48**, 549-553.
- Wagner, J. L., Burnett, R. C., Works, J. D. & Storb, R. (1996d).** Molecular analysis of DLA-DRBB1 polymorphism. *Tissue Antigens* **48**, 554-561.
- Wagner, J. L., DeRose, S. A., Burnett, R. C. & Storb, R. (1995).** Nucleotide sequence and polymorphism analysis of canine DRA cDNA clones. *Tissue Antigens* **45**, 284-287.
- Wagner, J. L., Hayes-Lattin, B., Works, J. D. & Storb, R. (1998a).** Molecular analysis and polymorphism of the DLA-DQB genes. *Tissue Antigens* **52**, 242-250.
- Wagner, J. L., Works, J. D. & Storb, R. (1998b).** DLA-DRB1 and DLA-DQBC1 histocompatibility typing by PCR-SSCP and sequencing. *Tissue Antigens* **52**, 397-401.
- Wayne, R. K. & Ostrander, E. O. (1999).** Origin, genetic diversity, and genome structure of the domestic dog. *BioEssays* **21**, 247-257.
- Werner, P., Mellersh, C. S., Raducha, M. G., DeRose, S., Acland, G. M., Prociuk, U., Wiegand, N., Aguirre, G. D., Henthorn, P. S., Patterson, D.**

- F. & al., e. (1999).** Anchoring of canine linkage groups with chromosome-specific markers. *Mammalian Genome* **10**, 814-823.
- White, O., Eisen, J. A., Heidelberg, J. F., Hickey, E. K., Peterson, J. D., Dodson, R. J., Haft, D. H., Gwinn, M. L., Nelson, W. C., Richardson, D. L., Moffat, K. S., Qin, H., Jiang, L., Pamphile, W., Crosby, M., Shen, M., Vamathevan, J. J., Lam, P., McDonald, L., Utterback, T., Zalewski, C., Makarova, K. S., Aravind, L., Daly, M. J., Minton, K. W., Fleischmann, R. D., Ketchum, K. A., Nelson, K. E., Salzberg, S., Smith, H. O., Venter, J. C. & Fraser, C. M. (1999).** Genome sequence of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* R1. *Science* **286**, 1571-1577.
- Yoshida, T. & Kishi, F. (1997).** Expression of NRAMP1 molecule in human peripheral blood leukocytes. *Immunology Letters* **55**, 105-108.
- Zajc, I., Mellersh, C., Kelly, E. P. & Sampson, J. (1994).** A new method of paternity testing for dogs, based on microsatellite sequences. *The Veterinary Record* **3**, 545-547.
- Zajc, I., Mellersh, C. S. & Sampson, J. (1997).** Variability of canine microsatellites within and between different dog breeds. *Mammalian Genome* **8**, 182-185.
- Zajc, I. & Sampson, J. (1996).** DNA microsatellites in domesticated dogs: application in paternity disputes. *European Journal of Physiology* **431**, R201-R202.
- Zajc, I. & Sampson, J. (1999).** Utility of canine microsatellites in revealing the relationships of pure bred dogs. *The Journal of Heredity* **90**, 104-107.
- Zhang, G., Wu, H., Ross, C. R., Minton, J. E. & Blecha, F. (2000a).** Cloning of porcine *NRAMP1* and its induction by lipopolysaccharide, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-1 β : role of CD14 and mitogen-activated protein kinases. *Infection and Immunity* **68**, 1086-1093.

Zhang, L., Lee, T., Wang, Y. & Soong, T. W. (2000b). Heterologous expression, functional characterization and localization of two isoforms of monkey iron transporter *Nramp2*. *Biochemistry Journal* **349**, 289-297.

**Nomenclature for factors of the dog Major
Histocompatibility System (DLA), 1998: first report of the
ISAG DLA nomenclature committee**

Kennedy, L., Altet, L., Angles, J.M., Barnes, A., Carter, S.D., Francino, O.,
Gerlach, J.A., Happ, G.M., Ollier, W.E.R., Polvi, A., Thompson, W., and
Wagner, J.L.

Tissue Antigens. (1999) **54**: 312-321

Animal Genetics (2000) **31**: 52-61
