

O emprego dos genes RAG na elucidação das relações filogenéticas de mamíferos

ANA LETÍCIA DA SILVA PEREIRA¹
CRISTINA CLAUMANN FREYGANG²
MARGARETE SUÑÉ MATTEVI³

RESUMO

O Sistema imune dos animais vertebrados é uma ferramenta importante que reconhece os antígenos alvo por meio de um complexo sistema de proteínas. Duas proteínas, codificadas pelos genes RAG₁ e RAG₂ são essenciais para esta reação. Recentemente estes genes estão sendo usados em estudos de sistemática e de análise filogenética dos vertebrados. Relata-se a análise de 26 amostras pertencentes às espécies *A. lituratus* e *A. fimbriatus* de quirópteros provenientes de 10 localidades de Santa Catarina, coletadas em um transecto Norte-Sul. Destas amostras está sendo seqüenciado o gene RAG₂ com o objetivo de verificar se as mesmas se diferenciam à medida que aumentam as distâncias geográficas.

Palavras-chave: RAG, sistema imune, quirópteros, relações filogenéticas, recombinação V(D)J.

ABSTRACT

The immune system of vertebrate animals is an important tool in recognizing the target antigens by antigen-binding proteins. Two proteins encoded by the recombination-activating genes, RAG₁ and RAG₂, are essential in this reaction. Recently, these genes are being used in the systematic and in the phylogenetic

¹ Acadêmica do Curso de Biologia/ULBRA - Bolsista PIBIC/CNPq

² Doutoranda do PPG Genética e Biologia Molecular/ UFRGS

³ Professora-Orientadora do Curso de Biologia e PPG Diagnóstico Genético-Molecular/ULBRA (mattevi@ulbra.br)

analysis of the vertebrates. Here it is related the analysis performing in 26 individuals of the *A. lituratus* and *A. fimbriatus* *Quiroptera* species from 10 localities of Santa Catarina, obtained in North-South transect. The RAG_2 gene of these sampled are being sequenced with the purpose to verify if they differentiate according to the increase of the geographic distances.

Key words: RAG, immune system, *Quiroptera*, phylogenetic relationships, V(D)J Recombination.

O sistema imune dos animais vertebrados é uma ferramenta importante que reconhece os antígenos alvo por meio de um complexo sistema de proteínas. Essas proteínas pertencem a duas famílias: as TCRs (T cell receptors), expressas e retidas na superfície das células T e as imunoglobulinas (Igs), expressas tanto em receptores na superfície da célula quanto secretadas como proteínas circulantes denominadas de anticorpos (SADOFSKY, 2001).

Para o reconhecimento dos diversos antígenos, o sistema imune cria uma ampla população de moléculas receptoras que diferem nas seqüências primárias de suas regiões de ligação com o antígeno. Esse vasto “Repertório imunológico” é formado por um mecanismo de diversificação e seleção próprio gerado por três processos diferentes, dentre eles a recombinação V(D)J (SADOFSKY, 2001).

Este mecanismo requer um corte preciso do DNA em segmentos seguido por um rearranjo dos mesmos (QIU et al., 2001). Duas proteínas, RAG_1 e RAG_2 (Recombination Activating Genes) formam as nucleases responsáveis pela clivagem do DNA (SADOFSKY, 2001). É interessante notar que as RAG atuam como transposases *in vitro* e que o processo de Recombinação V-J é parecido com o mecanismo pelo qual transposons movem-se de um lugar para outro no genoma e entre genomas (KLEIN,2004).

Especificamente, as proteínas RAG_1 e RAG_2 podem ser vistas como transposases modificadas (enzimas intimamente associadas com o movimento dos transposons), as quais se ligam às seqüências sinal, deste modo iniciando uma reação que corta a seqüência entre os dois segmentos escolhidos sem, contudo, integrá-los em outra parte do genoma. De fato, testes *in vitro* têm demonstrado que as proteínas RAG são também capazes de cumprir esta função de integração (AGRAWAL et al.,1998; KLEIN,2004). Estas observações têm conduzido a hipóteses que os genes RAG e as seqüências sinal que flanqueiam os segmentos V,J, e D foram introduzidos no genoma de um ancestral vertebrado mandibulado por um transposon originado de uma bactéria ou vírus (BAKER et al., 2000; KLEIN, 2004). De acordo com estas hipóteses, o transposon original consistiria dos dois genes RAG nas suas formas ativas *in-vivo*. Após a integração no genoma do vertebrado ancestral, ele tornou-se ativo e produziu uma variante deficiente dos genes RAG, a qual então foi transposta uma ou duas vezes dentro do exon V do gene receptor primordial, cortando V e J em segmentos flanqueados pelas seqüências sinal. Uma segunda transposição pode ter gerado o segmento D que, ao contrário dos segmentos V e J, é flanqueado por seqüências sinal em ambas as extremidades. O transposon original integrado então perdeu suas seqüências sinal flanqueadoras, assim como a habilidade de trans-

por a si mesmo *in vivo*. O dois genes RAG tornaram-se, então, envolvidos exclusivamente na recombinação V(D)J dos genes TCR e BCR (B cell receptors) (AGRAWAL et al., 1998; KLEIN, 2004).

Somada à evidência citada acima, a observação de que dois genes RAG, embora pouco relacionados um com o outro, são justapostos em todas as espécies estudadas e transcritos concomitantemente, reforça a hipótese do transposon (KLEIN, 2004).

As proteínas RAG são codificadas por dois pares de genes (RAG_1 e RAG_2) que, nos tetrápodes, não são interrompidos por íntrons e situados 8Kb um em relação ao outro no genoma nuclear. RAG_1 humano e proteínas RAG_2 são de 1,043 e 527 aminoácidos, respectivamente (BAKER et al., 2000). Estes genes são expressos somente nos linfócitos B e T, onde os níveis do transcrito variam nos diferentes estágios de desenvolvimento.

O mecanismo de corte e união é feito pelas proteínas RAG de modo similar ao mecanismo pelo qual os íntrons são retirados do transcrito primário de RNA. No entanto, o processo está atuando sobre o DNA e segmentos diferentes estão envolvidos (V, D e J), não se podendo admitir que um V seja ligado a um J diretamente, sem o D, por exemplo.

A clivagem é direcionada a um local preciso pela presença das RSSs (recombination signal sequences). A RSS é composta por heptâmeros conservados e nonâmeros separados por um espaçador de tamanho fixado. Há duas classes de RSS, que são distinguidas pelo tamanho de suas regiões espaçadoras. O tamanho destas regiões tem sempre 12 ou 23 nucleotídeos (o comprimento aproximado de uma ou duas voltas de DNA) e as mesmas são referidas como 12-RSS

ou 23-RSS (SADOFSKY, 2001; QIU et al., 2001).

Este conjunto cria, assim, na extremidade de cada segmento, um indicador de corte e união, semelhante ao que os íntrons têm no seu início e no seu fim. A existência dessas duas classes ajuda a evitar uma possível falha no sistema de recombinação (SADOFSKY, 2001).

A função de RAG_1 neste processo já é bem conhecida, porém, a única função específica do RAG_2 que já foi identificada é o aumento da estabilidade e da especificidade das interações entre RAG_1 e a RSS (AKAMATSU & OETTINGER, 1998; SWANSON & DESIDERIO, 1999). A função de catalisador, se houver, de RAG_2 permanece desconhecido. Contudo, apesar de pouco se conhecer sobre a função de RAG_2 , mutantes para este gene têm sido utilizados em estudos que visam melhor entender o funcionamento do sistema imune, como os trabalhos desenvolvidos por CHEN et al., 1993 e por QIU et al., 2000.

A descoberta do RAG_1 e RAG_2 foi o avanço mais importante no estudo da recombinação V(D)J desde a descoberta original do rearranjo dos genes por Tonegawa (1983) tornou possível análises detalhadas da reação de clivagem da V(D)J. A descoberta dos genes RAG também foi de grande importância no estudo da ligação entre o reparo de DBSs (Double Strand Breaks) induzidas por RAG e outros reparos de DBSs, principalmente porque acredita-se que estes processos possam levar a translocações cromossômicas entre RSS verdadeiras e seqüências crípticas localizadas dentro do genoma, gerando oncogenes (JUNG & ALT, 2004).

Em relação ao papel destes genes em estudos evolutivos, estes têm sido usados para resolver questões de ordem filogenética, entre pássaros

e vertebrados, e pequenas porções da região conservada têm sido empregadas para questões de níveis sistemáticos mais altos em mamíferos, morcegos e tubarões (STEPPAN et al. 2004).

Especificamente em relação ao RAG₂, recentemente este gene vem sendo utilizado em trabalhos relacionados à filogenia e filogeografia de diversas taxa de mamíferos quando se trata de níveis taxonômicos superiores, tais como gêneros e famílias, nos quais a saturação de alguns tipos de mutações prejudica a resolução das relações entre os grupos, como pode acontecer com outros marcadores moleculares como citocromo b, por exemplo (BAKER et al., 2003).

O potencial de RAG₂ na análise filogenética fica bem claro nos trabalhos realizados com a ordem Quiroptera por BAKER et al. (2000), Carstens et al., (2002) e BAKER et al. (2003}, principalmente dentro da família Phyllostomidae,

grupo altamente controverso onde a magnitude da adaptação morfológica para estratégias mais eficientes de alimentação pode resultar em fenótipos tão modificados que mascaram as relações filogenéticas basais (BAKER et al., 2000).

RAG₂ pode, particularmente, ser de grande utilidade para estudos da evolução dos filostomídeos pois, além de evoluir mais lentamente que o citocromo b, sua função na resposta imunológica provavelmente não está ligada às características morfológicas utilizadas freqüentemente como critérios diagnósticos na taxonomia do grupo. Estas propriedades nos levaram a escolhê-lo para análises do gênero *Artibeus*.

Foram coletadas 26 amostras pertencentes às espécies *A. lituratus* e *A. fimbriatus*, provenientes de 10 localidades distintas do estado de Santa Catarina em um transecto Norte - Sul (Figura 1).

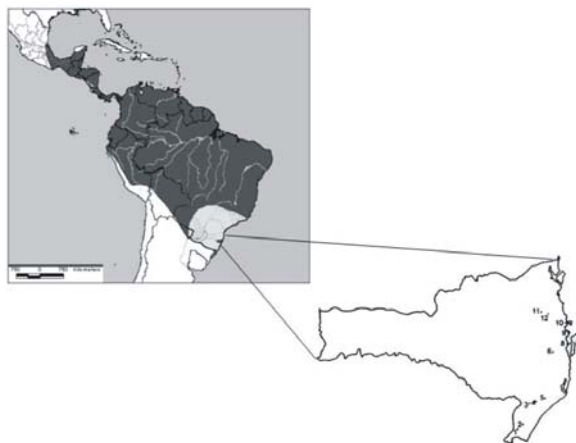


Figura 1 - Mapa da distribuição das espécies estudadas e mapa do estado de Santa Catarina com os respectivos locais de coleta: 1 – Santa Rosa do Sul, 2 – Jacinto Machado, 3- Nova Veneza, 5- Treze de Maio, 6- Santo Amaro da Imperatriz, 7 e 8 - Florianópolis 9 – Governador Celso Ramos, 10 – Porto Belo, 11 – Blumenau, 12 – Gaspar. A localidade 4 não foi amostrada para estas espécies. Em cinza escuro, distribuição de *A. lituratus* e em cinza claro, distribuição de *A. fimbriatus*.

A extração é feita utilizando-se o método de extração de DNA com sal pela técnica de Medrano et al. (1990) e a amplificação por PCR mediante a combinação dos “primers” RAG₂-F1 e RAG₂-R1 (Figura 2) segundo condições descritas na literatura, com modificações. Para o

seqüenciamento estão sendo utilizados os mesmos “primers” da amplificação. Os resultados estão sendo comparados com os que já obtivemos com o gene mitocondrial citocromo b para nas mesmas amostras, sendo, no entanto, ainda preliminares.

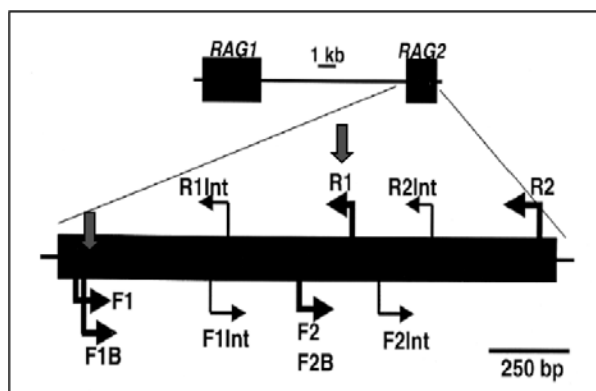


Figura 2 - Diagrama representando os genes RAG, mostrando os sítios de anelamento, com destaque para os primers utilizados. Figura retirada de BAKER et al. (2000).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, A.; EASTMAN, M. Q.; SCHATZ, G. D. Transposition mediated by RAG1 and RAG2 and its implications for the evolution of the immune system. *Nature*, v.394, p.744-751. 1998.

BAKER, R. J.; HOOFFER, S. R.; PORTER, C. A.; VAN DEN BUSSCHE, R. A. Diversification among New World Leaf-nosed bats: An evolutionary hypothesis and classification inferred from digenomic congruence of DNA sequence. *Occasional Papers of the Museum of Texas Technical University*, v.230, p.1-32, 2003.

BAKER, R. J.; PORTER, C. A.; PATTON, J. C.; VAN DEN BUSSCHE, R. A. Systematics of bats of the family Phyllostomidae based on RAG2 DNA sequences. *Occasional Papers of the Museum of Texas Technical University*, v.202, p.1-16. 2000.

CARSTENS, B. C.; LUNDRIGAN, B. L.; MYERS, P. A phylogeny of the Neotropical nectar-feeding bats (Chiroptera: Phyllostomidae) based on morphological and molecular data. *Journal of Mammalian Evolution*, v.9, p.23-53. 2002.

CHEN, J.; LANSFORD, R.; STEWART, V.; YOUNG, F.; ALT, F. W. RAG-2-deficient blastocyst complementation: an assay of gene function in lymphocyte development. *Proceedings of the National Academy of*

Science, v.90, p.4528-4532, 1993.

JUNG, D.; ALT, F. W. Unraveling V(D)J Recombination: Insights into gene regulation. *Cell*, v.116, p.299-311, 2004.

KLEIN, J. Did viruses play a part in the Origin of the Adaptative Immune System?. *Folia Biologica*, v.50, p.87-92, 2004.

MEDRANO, J. F.; AASEN E. ; SHARROW, L. DNA extraction nucleated red blood cells. *Biotechniques*, v.8, p.43. 1990.

QIU, J. X.; KALE, S. B.; SCHULTZ, H. Y.; ROTH, D. B. Separation-of-function mutants reveal critical Roles for RAG2 in Both the

Cleavage and Joining Steps of V(D)J Recombination. *Molecular Cell*, v.7, p.77-87, 2001.

SADOSKY, M. J. The RAG proteins in V(D)J recombination: more than just a nuclease. *Nucleic Acids Research*, v.29, p.1399-1409, 2001.

STEPPAN, J.S; STORZ, L.B, HOFFMANN, S.R. Nuclear DNA phylogeny of the squirrels (Mammalia: Rodentia) and the evolution of arboreality from c-myc and RAG1. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v.30, p.703-719, 2004.

TONEGAWA, S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature*, v.302, p.575-581, 1983.