

## **Wykorzystanie testów molekularnych identyfikujących nosicieli mutacji SCID, CA i LFS w polskiej populacji koni czystej krwi arabskiej – wyniki wstępne\***

**Monika Bugno-Poniewierska<sup>1</sup>, Monika Stefaniuk-Szmukier<sup>2</sup>, Agata Piestrzyńska-Kajtoch<sup>1</sup>,  
Agnieszka Fornal<sup>1</sup>, Joanna Warzecha<sup>1</sup>, Katarzyna Ropka-Molik<sup>1</sup>**

*<sup>1</sup>Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy,*

*Dział Genomiki i Biologii Molekularnej Zwierząt, 32-083 Balice k. Krakowa*

*<sup>2</sup>Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, Zakład Hodowli Koni, al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków*

Uzyskiwanie zdrowych zwierząt o pożądanych cechach fenotypowych jest nadrzędnym celem hodowli, która w ujęciu klasycznym odbywa się poprzez selekcję i kontrolowany dobór osobników do kojarzeń. Wprowadzenie sztucznej inseminacji (AI) pod koniec lat 30. ubiegłego wieku, a także późniejsze opracowanie metod mrożenia i seksowania nasienia oraz transferu zarodków umożliwiło uzyskiwanie liczego potomstwa po cennych osobnikach i było czynnikiem radykalnie zwiększającym postęp hodowlany. W ujęciu genetycznym, celem hodowli jest doskonalenie zwierząt poprzez zwiększanie frekwencji pożądanych wariantów genetycznych w populacji. Zmienność genetyczna cech ilościowych ma swoje odbicie w sekwencji DNA, która wpływa na regulację i ekspresję genów, a także na cechy i ilość kodowanego białka. Udział poszczególnych wariantów sekwencji genów w kształtowaniu pożądanej cechy jest najczęściej nieznanym. Znajomość wpływu polimorfizmu genów (i ich

efektów) na określone cechy jest wykorzystywana w hodowli zwierząt poprzez selekcję w kierunku zwiększania częstości występowania pożądanych alleli. Informacja genetyczna w odniesieniu do cech użytkowych ma istotne znaczenie dla postępu genetycznego w hodowli zwierząt i skutkuje zwiększeniem wartości ekonomicznej hodowli. Trudnością selekcji w kierunku cech interesujących hodowców jest to, że z reguły są one warunkowane przez wiele genów, przy czym należy uwzględniać również interakcje między genami oraz interakcje genów i środowiska, jak również obecność niekorzystnych mutacji genowych (Braunschweig, 2010).

Choroby genetyczne są uwarunkowane polimorfizmem sekwencji nukleotydowej, które w zależności od miejsca i długości zmutowanej sekwencji mogą powodować różny stopień nasilenia objawów chorobowych. Choroby genetyczne warunkowane mutacjami o charakterze funkcjonalnym mają często letalny charakter i są przyczyną upadków zwierząt homozygotycznych pod względem zmutowanego allelu, a co za tym idzie przyczyną znacznych strat ekonomicznych w hodowli. Rozprzestrzenianiu się chorób genetycznych w określonych populacjach zwierząt gospodarskich sprzyja fakt, że w większości są one warunkowane allelami recesywnymi, a nosicielami mutacji są osobniki o wysokiej wartości hodowlanej.

Podstawą hodowli koni jest wybór najbardziej pożądanych osobników w oparciu o wartości

\*Praca wykonana w ramach projektu „Kierunki wykorzystania oraz ochrona zasobów genetycznych zwierząt gospodarskich w warunkach zrównoważonego rozwoju” współfinansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju w ramach Strategicznego programu badań naukowych i prac rozwojowych „Środowisko naturalne, rolnictwo i leśnictwo” – BIOSTRATEG, nr umowy: BIOSTRATEG2/297267/14/NCBR/2016.

cech użytkowych ich przodków bądź użytkowość ich krewnych w celu uzyskania następnych pokoleń udoskonalonych zwierząt. Dobór materiału hodowlanego w obrębie rodów męskich bądź linii żeńskich zwiększa zagrożenie utrwalania się niekorzystnych alleli w populacji, tym samym zwiększając ryzyko urodzeń źrebiąt z wadami genetycznymi. Szczególnym zabiegiem utrwalania cechy w populacji jest wykorzystywanie nasienia wybitnych ogierów w uzyskiwaniu potomstwa przejawiającego ich cechy fenotypowe. Ujemną stroną szerokiego stosowania dawek nasienia ogiera – nosiciela recesywnej mutacji genetycznej jest rozprzestrzenienie się zmutowanego allelu w populacji i wzrost częstości urodzeń koni z wadą genetyczną.

Znanych jest kilka chorób genetycznych koni warunkowanych jedną parą alleli, w przypadku których zidentyfikowano mutacje funkcjonalne. Większość spośród tych mutacji występuje wyłącznie u określonych ras koni.

Zespół złożonego niedoboru odporności (SCID) u koni czystej krwi arabskiej był pierwszym recesywnym defektem autosomalnym opisanym na poziomie molekularnym. Genetyczny defekt SCID to delecja 5 par zasad w genie kodującym podjednostkę katalityczną (DNA-PKcs) zależnej od DNA kinazy białkowej (DNA-PK) (Shin i in., 1997). Delecja prowadzi do przesunięcia ramki odczytu w kodonie 3155 sekwencji transkryptu, powodując utratę 967 aminokwasów i powstanie nieaktywnego enzymu, czego efektem są zaburzenia w produkcji limfocytów B i T. Żrebięta z zespołem SCID są podatne na zakażenia z powodu braku funkcjonowania układu immunologicznego i zwykle umierają przed osiągnięciem 5. miesiąca życia (Swinburne i in., 1999). Objawy to: zapalenie płuc wywołane wirusowymi infekcjami górnych dróg oddechowych oraz infekcje bakteryjne narządów wewnętrznych. Ze względu na zespół objawów SCID może być mylony z innymi schorzeniami układu immunologicznego (McGuire i Poppe, 1973). Badania rodowodów wykazały, że ogier, który krył we wczesnych latach XX stulecia w USA, mógł zapoczątkować mutację SCID w światowej populacji koni czystej krwi arabskiej (Bernoco i Bailey, 1998; Swinburne i in., 1999). Oszacowana częstość występowania allelu SCID wśród 250

koni czystej krwi arabskiej badanych w USA wynosiła 8,4% (Bernoco i Bailey, 1998), a w grupie 105 koni tej rasy badanych w Wielkiej Brytanii – 2,8% (Swinburne i in., 1999). Z kolei, badania wykonane przez Terry i in. (1999) w grupie 271 koni arabskich w polskiej populacji nie wykazały obecności zmutowanego allelu SCID.

Innym schorzeniem o podłożu genetycznym występującym u koni czystej krwi arabskiej jest zespół abiotrofii mózdzku (CA), powodujący zaburzenia neurologiczne, który jest dziedziczny jak recesywna cecha autosomalna. Histopatologiczną cechą CA jest degeneracja komórek Purkinjego mózdzku postępująca zaraz po urodzeniu. Objawy CA ujawniają się w wieku od 6 tygodni do 4 miesięcy i obejmują ataksję, drżenie głowy i brak zdolności utrzymywania równowagi. W związku z tym, że objawy CA są podobne do innych chorób neurologicznych, jego prawidłowa diagnoza jest trudna (Blanco i in., 2006). Pewny wynik diagnozy CA uzyskuje się wyłącznie w wyniku pośmiertnego badania histopatologicznego mózdzku. W przypadkach CA obserwuje się zróżnicowane nasilenie objawów choroby. Niektóre z koni – homozygot recesywnych wykazują silną ekspresję choroby, obejmującą prawie ciągłe drżenie głowy oraz wysoki stopień ataksji, podczas gdy inne konie z genotypem chorobowym funkcjonują normalnie, z pojawiającym się jedynie okazjonalnie gubieniem kroków w chodzie oraz bardzo łagodnym drżeniem głowy podczas ruchu zamiarowego. Większość hodowców decyduje się na eutanazję ciężko chorych koni, ponieważ brak koordynacji ruchowej sprawia, że obsługa i postępowanie z nimi są niebezpieczne zarówno dla samych koni, jak i ich właścicieli. W celu ustalenia genetycznego podłoża abiotrofii mózdzku wykonano skanowanie genomu z wykorzystaniem markerów SNP w 4 ojcowskich rodzinach pół-rodzeństwa koni arabskich, w których zaobserwowano dziedziczenie cechy CA. Zidentyfikowano region o wysokiej homozygotyczności, obejmujący 142 tys. pz na chromosomie ECA2, w którym określono stały układ alleli, tworzący haplotyp, uwzględniający 22 markery SNP sprzężone z fenotypem CA. Sekwencjonowanie 4 genów w tym regionie ujawniło, że u koni arabskich obecny jest wyłącznie jeden SNP, zlokalizowany w eksonie 4 genu *TOE1*, który jest

prawdopodobną mutacją sprawczą dla defektu CA. Efektem tej mutacji jest zamiana jednego aminokwasu (Arg95His (R95H)). Zidentyfikowany polimorfizm może zmieniać funkcję białka TOE1 bądź prowadzić do obniżenia poziomu ekspresji położonego w pobliżu genu *MUTYH* poprzez blokowanie wiązania czynnika transkrypcyjnego GATA2. Analiza rodowodów koni z rodzin, w których zdiagnozowano CA wskazuje, że mutacja pojawiła się u spokrewnionych koni, które były wykorzystywane w hodowli w latach trzydziestych ubiegłego wieku i są znanymi przodkami w wielu liniach czystej krwi arabskiej. Do chwili obecnej przetestowano 4200 koni hodowanych w USA na obecność CA. Stopień nosicielstwa mutacji oszacowano na poziomie 19,7%, jednakże uzyskany wynik może być zawyżony w odniesieniu do całej populacji ze względu na duże zainteresowanie badaniami ze strony hodowców posiadających konie z linii hodowlanych, w których częstość tego schorzenia mogła być wyższa. Wśród testowanych koni arabskich 1,4% określono jako źrebięta chore na CA (dwie kopie haplotypu CA oraz dwie kopie prawdopodobnej mutacji sprawczej dla CA). Analizy rodowodów źrebiąt chorych na CA wykazały wspólne pochodzenie, które utrzymuje się do ponad pięciu pokoleń wstecz jako wynik prawdopodobnych krzyżówek między liniami. Aktualnie, źrebięta będące nosicielami CA są identyfikowane również w polskiej, egipskiej i hiszpańskiej populacji koni arabskich (Brault i in., 2011).

Osobną grupę chorób monogenowych koni wywołują mutacje w genach warunkujących pigmentację i wzór umaszczenia okrywy włosowej koni, mających znaczenie dla rozwoju melanocytów lub przebiegu melanogenezy. Plejotropowe efekty związane z mutacjami w genach umaszczenia obejmują między innymi letalne defekty układu nerwowego – OLWFS i LFS. Syndrom białych źrebiąt maści overo (OLWFS) objawia się wrodzonym brakiem śródściennych zwojów nerwowych w końcowym odcinku jelita grubego, czego efektem są zaburzenia funkcji i niedrożność jelita grubego. Choroba była diagnozowana między innymi u amerykańskich koni paint horses, będących homozygotami pod względem umaszczenia overo. Molekularne podłoże choroby to recesywna mutacja w transmem-

branowej domenie białka receptora endoteliny (*locus* EDNRB). Osobniki heterozygotyczne pod względem mutacji posiadają jedynie umaszczenie typu overo. Z kolei, zespół źrebiąt maści lavender (LFS) to recesywny defekt letalny, występujący u źrebiąt koni czystej krwi arabskiej – homozygot pod względem umaszczenia typu lavender. LFS obejmuje zespół objawów neurologicznych, w których dominują skurcze tężcowe mięśni. Ze względu na złożoność objawów zespół LFS jest trudny w diagnostyce i może być mylony z innymi chorobami wieku neonatalnego. Badania z wykorzystaniem technik umożliwiających skanowanie genomu w rodzinie obciążonej zespołem LFS doprowadziły do wykrycia mutacji sprawczej dla LFS w genie miozyny piątej (*MYO5A*). Nowo odkryta delecja w eksonie 30 *MYO5A* prowadzi do przesunięcia ramki odczytu i przedwczesnej terminacji transkrypcji. Utrata 379 aminokwasów w końcu C białka prawdopodobnie przyczynia się do zaburzenia funkcjonowania melanocytów i neuronów – typów komórek, które wywodzą się z tego samego listka zarodkowego. Większość udokumentowanych przypadków LFS opisano w populacji egipskiej koni czystej krwi arabskiej – intensywnie eksportowanych i popularnych w USA. Frekwencja allelu LFS wśród koni czystej krwi arabskiej pochodzących z populacji egipskiej wynosi 5,2%. Uważa się, że mimo obecności dawnego przodka, który dał początek mutacji LFS, istnieją linie, w których ta mutacja pojawiła się znacznie później (Brooks i in., 2010).

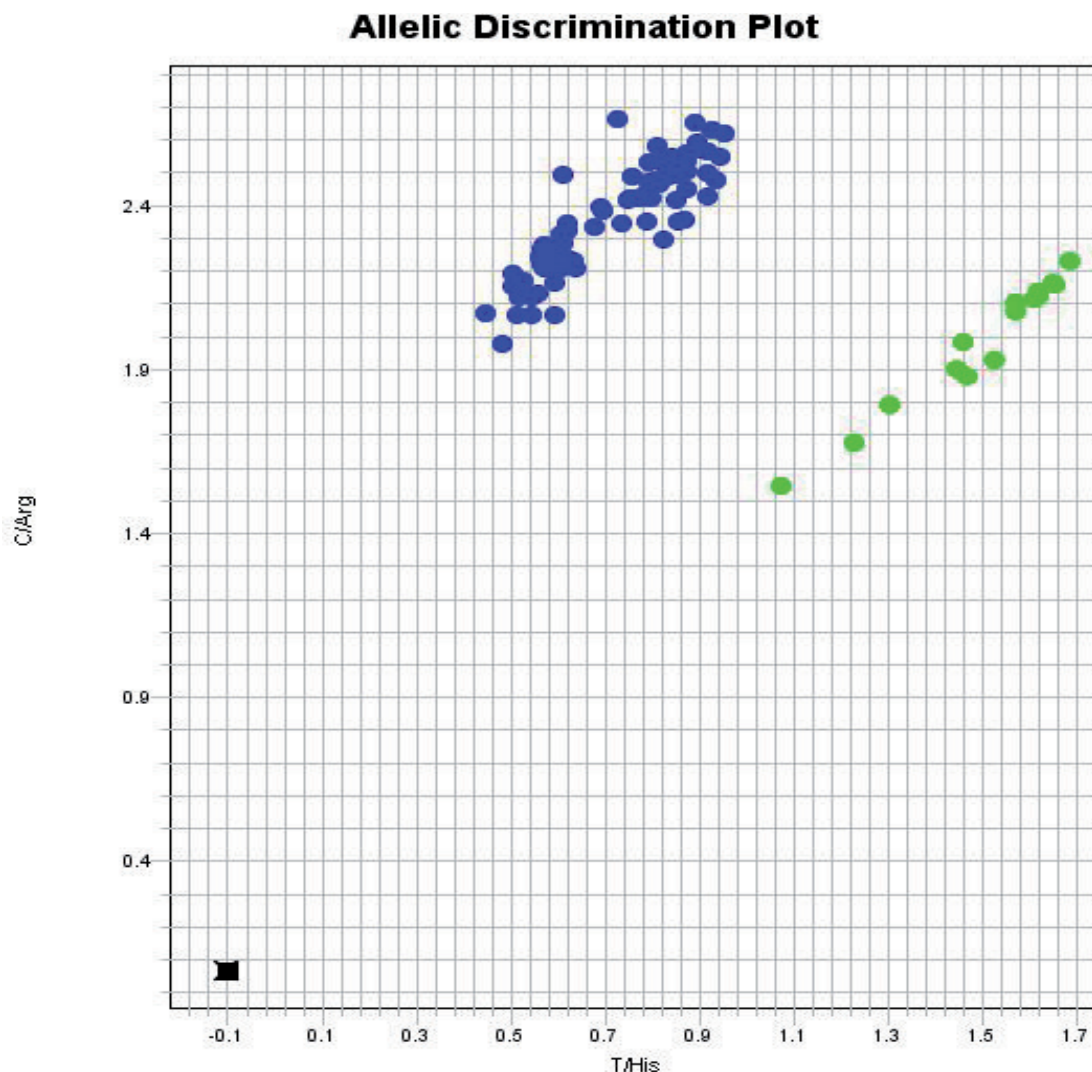
Rynek handlu końmi czystej krwi arabskiej szczególnie ceni niektóre popularne linie hodowlane. To prowadzi do wzrostu kojarzeń w pokrewieństwie, ponieważ właściciele koni starają się zwiększyć udział tych linii u swoich źrebiąt (Perryman, 2000). Taka strategia hodowlana zwiększa tym samym potrzebę aktywnego zapobiegania występowaniu recesywnych chorób genetycznych. W takich sytuacjach test molekularny oparty o polimorfizm DNA może stanowić kluczowe narzędzie dla hodowców starających się hodować konie w ramach wartościowej linii, w której występuje zmutowany allel, dając możliwość zminimalizowania lub eliminacji zmutowanych genów z populacji (Jonsson i Eriksson, 2007).

Hodowcy na całym świecie dobrowolnie badają swoje konie w kierunku nosicielstwa CA

i SCID. Niektóre kraje wprowadziły obowiązkowe testy w tym kierunku (np. Niemiecki Związek Hodowców Koni Arabskich od 2010 r.). W Polsce nie ma, jak dotąd, obowiązku badania koni na nosicielstwo mutacji genetycznych. Jednakże, biorąc pod uwagę oszacowaną częstość allelu SCID wśród koni czystej krwi arabskiej badanych w USA na poziomie 8,4% (Bernoco i Bailey, 1998); allelu LFS wśród koni czystej krwi arabskiej pochodzącej z populacji egipskiej na poziomie 5,2% (Brooks i in., 2010) oraz stopień nosicielstwa mutacji CA u koni z populacji USA na poziomie 19,7% (Brault i in., 2011), celowe

wydarza się podjęcie działań zapobiegających oraz ograniczających rozprzestrzenianie się tych mutacji u koni czystej krwi arabskiej hodowanych w polskiej populacji.

Do osiągnięcia tego celu zostało wykorzystanych szereg metod molekularnych. W celu utworzenia autorskich testów molekularnych służących do identyfikacji CA opracowano dwie metody wykrywania mutacji w genie *TOE1* (SNP rs397160943). Zaprojektowano startery do sekwencjonowania fragmentu genu *TOE1*, obejmujące odcinek o długości 517 pz zawierający miejsce polimorficzne rs397160943.



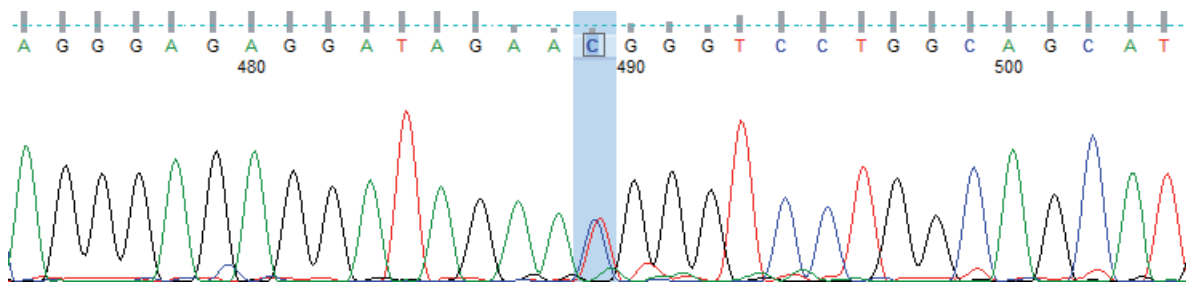
Rys. 1. Reprezentatywny wynik dyskryminacji alleli w oznaczaniu genotypów CA; niebieskie kropki – osobniki bez mutacji; zielone kropki – osobniki będące nosicielami mutacji

*Fig. 1. The representative result of allele discrimination in CA genotype designating; blue spots – specimens without mutation; green spots – specimens which are mutation carriers*

Po zsekwencjonowaniu przy użyciu sekwencjonatora kapilarnego Genetic Analyzer 3500xl wybranego fragmentu genu *TOE1* otrzymano czytelne sekwencje umożliwiające wiarygodną analizę mutacji. Zaprojektowano również zestaw dwóch sond TaqMan MGB (znakowanych fluorescencyjnie różnymi barwnikami) i starterów do analizy dyskryminacji alleli w aparatach typu real-time PCR (rys. 1).

Zoptymalizowano warunki tej reakcji i przetestowano dla próbek referencyjnych. Zweryfikowano wyniki stosując reakcję sekwencjonowania opisaną powyżej.

Z zastosowaniem metody dyskryminacji alleli oznaczono genotyp CA dla 34 koni arabskich, a następnie zweryfikowano wyniki stosując sekwencjonowanie (rys. 2). Wyniki z obu metod były zgodne.

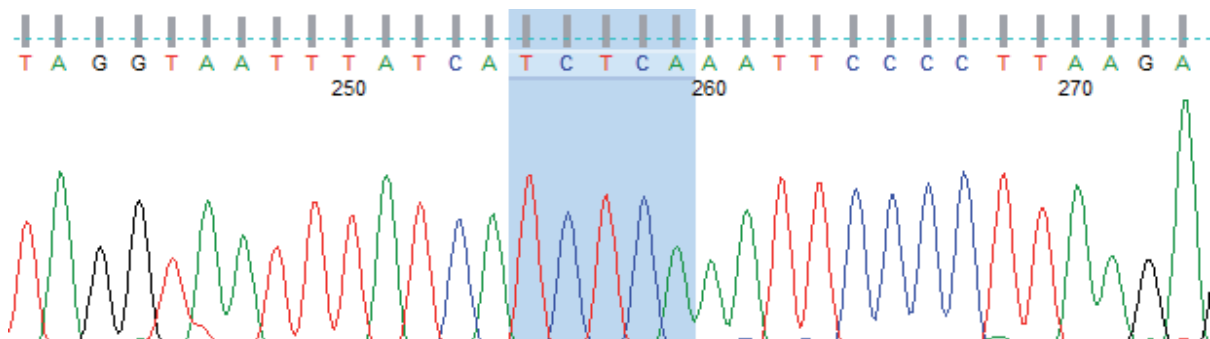


Rys. 2. Fragment uzyskanej sekwencji genu *TOE1*; niebieskim podświetleniem zaznaczono mutację R95H, która uważana jest za mutację sprawczą CA

Fig. 2. The fragment of the obtained *TOE1* gene sequence; R95H mutation was marked with blue backlight, which is considered to be a causative mutation of CA

W celu identyfikacji nosicieli SCID opracowano trzy metody wykrywania delecji 5' w genie *DNA-PKcs* (ECA9g. 35528429-35528433del). Zaprojektowano startery do wykrywania wariantów z delecją fragmentu DNA lub jej brakiem metodą analizy fragmentów (1 starter znakowany barwnikiem FAM, 2 niezakodowany). Startery zostały wstępnie przetestowane – dopracowano reakcję PCR i elektroforezę na sekwencjonatorze kapilarnym Genetic Analyzer

3500xl. Zaprojektowano również startery do sekwencjonowania fragmentu genu *DNA-PKcs* zawierającego tę delecję oraz zsekwencjonowano fragment genu o długości 621 pz zawierający miejsce występowania delecji. Otrzymano czytelne odczyty sekwencji wybranego fragmentu genu dla próbek testowych, umożliwiające wiarygodne wykrywanie poszukiwanej mutacji (rys. 3). Nie znaleziono do tej pory żadnego konia ze zmutovanym allelem.

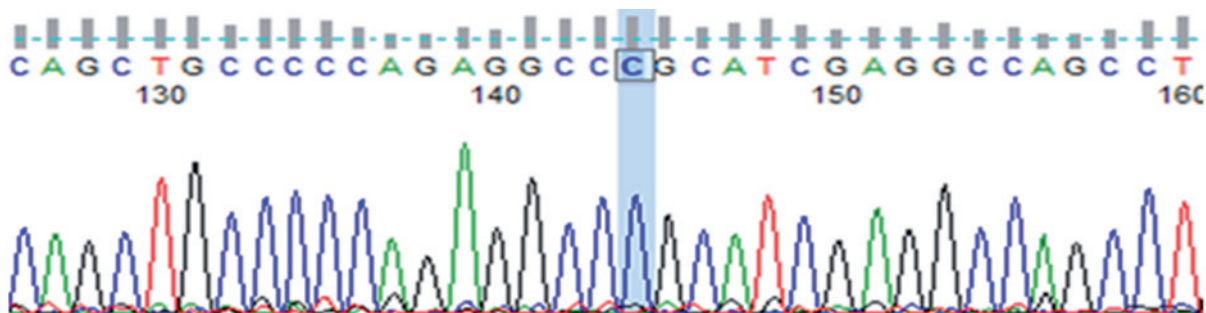


Rys. 3. Reprezentatywny chromatogram fragmentu genu *DNA-PKcs* z zaznaczonymi nukleotydami ulegającymi delecji w przypadku zespołu SCID

Fig. 3. The representative chromatogram of *DNA-PKcs* gene fragment with marked nucleotides undergoing deletion in case of SCID syndrome

W celu wykrycia mutacji przyczynowej dla syndromu LFS zaprojektowano startery do reakcji PCR obejmujące fragment o długości 567 pz genu *MYO5A* obejmującego 30 egzon, w którym znajduje się delekcja g.138235715del. Wszystkie

analizowane próbki zostały zsekwencjonowane na sekwencjonatorze kapilarnym Genetic Analyzer 3500xl. Jak dotychczas, nie udało się oznaczyć żadnego osobnika posiadającego zmutowany allel (rys. 4).



Rys. 4. Reprezentatywny chromatogram fragmentu genu *MYO30A* z zaznaczonym nukleotydem ulegającym delekcji w przypadku syndromu LFS

Fig. 4. The representative chromatogram of *MYO30A* gene fragment with a marked nucleotide undergoing deletion in case of LFS syndrome

Na obecnym etapie projektu objęto badaniami 448 koni wpisanych do Polskiej Księgi Stadnej Koni Czystej Krwi Arabskiej.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono brak nosicieli alleli SCID i LFS. Stopień nosicielstwa mutacji CA oszacowano natomiast na poziomie 11,4%. Zidentyfikowano

jedynie formy heterozygotyczne.

Mimo że nosiciele zmutowanych alleli nie wykazują objawów klinicznych i brak jest doniesień opisujących negatywne konsekwencje dla zdrowia i aktywności sportowej koni heterozygot, konieczne jest dalsze monitorowanie aktywnej populacji.

#### Literatura

- Bernoco D., Bailey E. (1998). Frequency of the SCID gene among Arabian horses in the USA. *Anim. Genet.*, 29: 41–42.
- Blanco A., Moyano R., Vivo J., Flores-Acuña R., Molina A., Blanco C., Monterde J.G. (2006). Purkinje cell apoptosis in Arabian horses with cerebellar abiotrophy. *J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med.*, 53: 286–287.
- Brault L.S., Cooper C.A., Famula T.R., Murray J.D., Penedo M.C. (2011). Mapping of equine cerebellar abiotrophy to ECA2 and identification of a potential causative mutation affecting expression of *MUTYH*. *Genomics*, 97 (2):121–129.
- Braunschweig M.H. (2010). Mutations in the bovine *ABCG2* and the ovine *MSTN* gene added to the few quantitative trait nucleotides identified in farm animals: a mini-review. *J. Appl. Genet.*, 51 (3): 289–297.
- Brooks S.A., Gabreski N., Miller D., Brisbin A., Brown H.E., Streeter C., Mezey J., Cook D., Antczak D.F. (2010). Whole-genome SNP association in the horse: Identification of a deletion in myosin V a responsible for lavender foal syndrome. *PLoS Genet.*, 6 (4): e1000909; doi:10.1371/journal.pgen.1000909.
- Jonsson L., Eriksson S. (2007). Equine severe combined immunodeficiency. *Litteraturstudie SLU, Uppsala*.
- McGuire T.C., Poppie M.J. (1973). Hypogammaglobulinemia and thymic hypoplasia in horses: a primary combined immunodeficiency disorder. *Infect. Immun.*, 8: 272–277.
- Perryman L.E. (2000). Primary immunodeficiencies of horses. *The Veterinary clinics of North America. Equine Practice*, 16: 105–116.
- Shin E.K., Perryman L.E., Meek K. (1997). A kinase-negative mutation of DNA-PKcs in equine SCID results in defective coding and signal joint formation. *J. Immunol.*, 158: 3565–3569.

Swinburne J., Lockhart L., Scott M., Binns M.M. (1999). Estimation of the prevalence of severe combined immunodeficiency disease in UK Arab horses as determined by a DNA-based test. *Vet. Record*, 145: 22–23.

Terry R.R., Cholewiński G., Cothran E.G. (1999). Absence of the severe combined immunodeficiency disease gene among Arabian horses in Poland. *J. Appl. Genet.*, 40: 39–41.

## **THE APPLICATION OF MOLECULAR TESTS IDENTIFYING CARRIERS OF SCID, CA AND LFS MUTATIONS IN POLISH POPULATION OF PUREBRED ARABIAN HORSES – INITIAL RESULTS**

### **Summary**

In the age of insemination there is a high risk of quick spread of mutation in a population. Breeders in the whole world voluntarily examine their horses for CA and SCID carrier state. Taking into consideration the estimated incidence of SCID allele among Purebred Arabian horses examined in the USA on the level of 8.4%, LFS allele among Purebred Arabian horses from the Egyptian population on the level of 5.2% and the degree of carrier state of CA mutation in horses from the USA population on the level 19.7%, the aim of the work is to undertake the activities preventing and restricting the spread of these mutations in Purebred Arabian horses bred in Polish population. The horses coming from the state studs (Horse Stud Michałów, Horse Stud Janów, Stallion Herd Białka) and private breeders constitute the material for research. On the basis of the obtained results from 448 examined horses, the lack of carriers of SCID and LFS alleles was ascertained. However, the carrier state of CA mutation was estimated on the level of 11.4%. Solely heterozygotic forms were identified.

**Key words:** Purebred Arabian horses, genetic mutations, CA, SCID, LFS



Klacz rasy arabskiej w Stadninie w Janowie Podlaskim  
*Purebred Arabian mare in Polish stud farm in Janów Podlaski*  
(fot. D. Dobrowolska)