

DEFEKTY GENÓW U KONI CZYSTEJ KRWI ARABSKIEJ – PROBLEMY HODOWLI*

Tomasz Ząbek, Monika Bugno-Poniewierska, Artur Gurgul

Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy, Pracownia Genomiki, 32-083 Balice k. Krakowa

Choroby genetyczne, tak jak inne cechy fenotypu, są uwarunkowane polimorfizmem sekwencji nukleotydów, które w zależności od miejsca i długości zmutowanej sekwencji, mogą mieć charakter letalny. 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 w zakresie cech produkcyjnych charakterystycznych dla danego kierunku użytkowania. Poznanie molekularnego podłoża zmutowanych genów oraz opanowanie metod identyfikacji ich nosicieli umożliwia eliminację heterozygot z populacji lub ich kontrolowany dobór do kojarzeń. W artykule scharakteryzowano przykłady mutacji genowych warunkujących choroby genetyczne u koni czystej krwi arabskiej, których obecność w populacji może powodować straty ekonomiczne w hodowli.

Słowa kluczowe: konie czystej krwi arabskiej, polimorfizm DNA

Przyczyny pojawiania się defektów genetycznych w populacji

Uzyskiwanie zwierząt o pożądanym cechach fenotypowych jest nadrzędnym celem hodowli, które w ujęciu klasycznym odbywa się poprzez kontrolowany dobór do kojarzeń i selekcję. Wprowadzenie sztucznej inseminacji (AI) pod koniec lat 30. ubiegłego wieku, a także opracowanie metod mrożenia i seksowania nasienia oraz transferu zarodków, umożliwiło uzyskiwanie licznych potomstwa po cennych osobnikach i było czynnikiem radykalnie zwiększającym postęp hodowlany. W ujęciu genetycznym celem hodowli jest doskonalenie zwierząt poprzez poszukiwanie udziału zmienności fenotypowej cechy, uwarunkowanej polimorfizmem genów. Ilościowa zmienność genetyczna ma swoje odbicie w sekwencji DNA i wpływa na regulację i ekspresję genów, włącznie z cechami kodowanego białka. Udział poszczególnych wariantów sekwencji genów w kształtowaniu pożądanej cechy jest przy tym nieznanym. Znajomość wpływu polimorfizmu genów (ich efektów) na określone cechy jest stosowana w hodowli zwierząt poprzez selekcję w kierunku pożądanym alleli. Informacja genetyczna cech użytkowych ma istotne znaczenie dla postępu genetycznego

* Artykuł opracowany w ramach środków projektu statutowego IZ PIB nr 01-4.04.1.

w hodowli zwierząt i skutkuje w zwiększonej wartości ekonomicznej. Trudnością selekcji w kierunku cech interesujących hodowców jest to, że z reguły cechy te są warunkowane przez wiele genów, uwzględniając również interakcje między genami oraz interakcje genów i środowiska, jak również obecność niekorzystnych mutacji genowych (Braunschweig, 2010). Mankamentem wysokich oczekiwań prowadzonej pracy hodowlanej jest ciągłe ograniczanie zmienności genetycznej szeregu gatunków zwierząt hodowlanych. Gwałtowny spadek liczebności wielu niegdyś popularnych ras zwierząt, ograniczona liczba reproduktorów w danej rasie i ściśle przestrzeganie kojarzeń w czystości rasowej, a także selekcja ukierunkowana na określone cechy sprzyjają wzrostowi kojarzeń w pokrewieństwie, prowadząc do wzrostu homozygotyczności populacji (Trommershausen-Bowling i Clark, 1985). Te zjawiska, niekorzystne z definicji doboru naturalnego, mogą prowadzić do obniżenia odporności (Bailey, 1998), zwiększenia problemów w rozrodzie (Kulisa i in., 1999) i wzrostu występowania chorób genetycznych.

Natura i efekty niekorzystnych mutacji genowych

Przyczyną chorób genetycznych są mutacje polegające na zmianie w sekwencji regionów kodujących DNA, które często mają charakter letalny. Mutacje genetyczne to zmiany w sekwencji regionów kodujących bądź części regulatorowych genów, w wyniku których może dojść do zaburzeń w wytwarzaniu prawidłowego białka bądź zaburzeń w poziomie ekspresji genów zmieniających ilość produkowanego białka. W odróżnieniu od uwarunkowań genetycznych złożonych cech fenotypowych, wykazujących efekt addytywny, efekty mutacji genetycznych są duże, bowiem niepożądane zmiany w sekwencji białka bądź zaburzenia w jego syntezie prowadzą do radykalnych zmian, w postaci konkretnych nieprawidłowości w budowie bądź zaburzeń funkcjonowania organizmu. Szczególnie ujemne skutki hodowlane wywołują choroby warunkowane mutacjami dziedziczonymi recesywnie, przekazywanymi w genotypie cennych zwierząt hodowlanych, wykorzystywanych w reprodukcji. W wyniku kojarzeń osobników niosących zmutowany allel statystycznie może urodzić się 50% heterozygot – nosicieli mutacji, 25% homozygot dominujących wolnych od mutacji i 25% osobników chorych – homozygot recesywnych z dwiema kopiami zmutowanego allelu. Podstawą hodowli koni jest selekcja najbardziej pożądanego osobników, w oparciu o wartości cech użytkowości ich przodków bądź użytkowości ich krewnych, w celu uzyskania następnych pokoleń udoskonalonych zwierząt. Dobór materiału hodowlanego w obrębie linii męskich bądź żeńskich prowadzi do sukcesywnego zwiększania homozygotyczności w obrębie poszczególnych linii, aczkolwiek zdarzają się kojarzenia krzyżówkowe, które obniżają zróżnicowanie genetyczne między liniami, wpływając pozytywnie na utrzymywanie zmienności genetycznej w obrębie linii (Brault i in., 2011). Wzrost kojarzeń w pokrewieństwie z wykorzystaniem osobników pochodzących z jednej linii zwiększa zagrożenie utrwalania się niekorzystnych alleli w populacji, tym samym zwiększających 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, który przypadkowo odziedziczył recesywną mutację genetyczną, jest rozprzestrzenie-

nie się zmutowanego allelu w populacji i potencjalny wzrost częstości urodzeń koni z wadą genetyczną.

Charakterystyka chorób genetycznych o znanym podłożu molekularnym na przykładzie koni czystej krwi arabskiej

U koni czystej krwi znanych jest kilka chorób genetycznych, warunkowanych jedną parą alleli, w przypadku których zidentyfikowano mutacje funkcjonalne. Jedną z nich jest zespół złożonego niedoboru odporności (SCID), który był pierwszym opisanym recesywnym defektem autosomalnym u koni (Perryman i in., 1980). 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. Żrebaki z SCID są podatne na infekcje z powodu braku funkcjonowania układu immunologicznego i zwykle umierają przed osiągnięciem wieku 5 miesięcy (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 chorobami układu immunologicznego (McGuire i Poppie, 1973). Badania rodowodów wykazały, że ogier, który krył we wczesnych latach XX stulecia w USA, mógł zapoczątkować mutację SCID w światowej populacji koni arabskich (Bernoco i Bailey, 1998; Swinburne i in., 1999). Oszacowana częstość allelu SCID wśród 250 koni arabskich badanych w USA wynosiła 8,4% (Bernoco i Bailey, 1998), a w grupie 105 koni oo w Wielkiej Brytanii 2,8% (Swinburne i in., 1999). Inne badania wykonane przez Terry i in. (1999) w grupie 271 polskich koni arabskich nie wykazały obecności zmutowanego allelu SCID. Osobną grupę chorób monogenowych koni czystej krwi wywołują mutacje w genach warunkujących pigmentację i wzór umaszczenia okrywy włosowej, mających znaczenie dla rozwoju melanocytów lub melanogenezy. Plejotropowe efekty u koni, związane z mutacjami w genach umaszczenia, obejmują między innymi letalne defekty układu nerwowego, takie jak LFS. Zespół źrebiąt maści lavender (LFS) to recesywny defekt letalny, występujący u źrebiąt 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 skanowania 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 – podgrupy rasy arabskiej wyprowadzonej pierwotnie w Egipcie, ale intensywnie eksportowanych i popularnych w USA. Frekwencja allelu LFS wśród koni arabskich pochodzenia egipskiego 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). Innym zaburzeniem neurologicznym opisanym u koni czystej krwi arabskiej jest zespół abiotrofii mózdzku (CA), który dziedziczony jest jak recesywna cecha autosomalna. Histopatologiczną cechą CA jest degeneracja komórek Purkiniego mózdzku postępująca zaraz po urodzeniu. Objawy CA ujawniają się w wieku 6 tygodni do 4 miesięcy i obejmują ataksję, drżenie głowy i brak utrzymywania równowagi. W związku z tym, że objawy CA są podobne do objawów 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 zróżnicowany stopień ciężkości przebiegu tego schorzenia. Niektóre z koni – homozygot recesywnych – wykazują silną ekspresję choroby, obejmującą prawie stałe drżenie głowy oraz wysoki stopień bezładu (ataksji), podczas gdy inne konie z genotypem chorobowym funkcjonują normalnie, z jedynie okazjonalnie pojawiającym się gubieniem kroków w chodzie oraz bardzo łagodnym drżeniem głowy podczas ruchu zamiarowego. Większość hodowców decyduje się na eutanazję ciężko chorych koni, ponieważ brak koordynacji sprawia, że obsługa i postępowanie z tymi końmi w wieku późniejszym 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. pb na chromosomie ECA2, w którym określono stały układ alleli, tworzący haplotyp w loci 22 markerów SNP, sprzężonych z fenotypem CA. Sekwencjonowanie 4 genów w tym regionie ujawniło obecność jednego *locus* SNP, obecnego wyłącznie u koni arabskich, zlokalizowanego w eksonie 4 genu *TOE1*, który jest prawdopodobną mutacją sprawczą dla defektu CA. Efektem tej mutacji jest zamiana jednego aminokwasu (Arg95His). 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 działały 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 defektu 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 z CA identyfikowane są również u koni arabskich w typie polskim, egipskim i hiszpańskim (Brault i in., 2011). Poza wspomnianymi wynikami badań przesiewowych w kierunku SCID (Terry i in., 1999)

brak jest danych literaturowych odnośnie częstości występowania mutacji genetycznych w polskiej populacji koni czystej krwi arabskiej.

Niekorzystne mutacje genowe – problem hodowlany i propozycje metod przeciwdziałania

Rynek handlu wybitnych ras koni szczególnie ceni niektóre popularne linie hodowlane. To prowadzi do wzrostu kojarzeń w pokrewieństwie, ponieważ właściciele koni starają się zwiększyć procent takiego pochodzenia u swoich źrebiąt. Taka strategia hodowlana zwiększa tym samym potrzebę skutecznego 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 przy okazji występuje segregacja ze zmutowanym allelem, aby zminimalizować lub wyeliminować uzyskiwanie chorych źrebiąt. Kwestią pozostaje, czy w ogóle kojarzenia osobników będących heterozygotami pod względem zmutowanych alleli są korzystne. Można postawić pytanie, czy korzyść uzyskiwania wartościowego potomstwa, niosącego cechy wybitnych ogierów ma przeważać nad ryzykiem rozprzestrzeniania mutacji letalnych zwiększających częstość uzyskiwania chorych źrebiąt (Perryman, 2000). Uwzględniając dobrostan zwierząt, celem nadrzędnym hodowli powinna być minimalizacja częstości zmutowanych alleli w populacji z tendencją do ich całkowitej eliminacji. Odpowiednia strategia hodowlana powinna uwzględniać częstość występowania niekorzystnych mutacji genowych w określonych liniach hodowlanych. Jeśli istnieje zainteresowanie ze względu na zachowanie pewnej linii przez ogiera uznanego za heterozygotę, powinien być kojarzony z klaczą, która jest prawidłową homozygotą w *locus*, w którym ustalono recesywny model dziedziczenia choroby. Potomstwo z takiego kojarzenia powinno zostać poddane testowi DNA i w momencie, gdy okaże się prawidłową homozygotą dominującą, może zostać dopuszczone do hodowli. Jones (1997) podkreślał, że w przypadku SCID, oprócz ogierów powinny być testowane również klacze, zanim wejdą do hodowli. W tym względzie naturalną sprawą jest jednoczesne objęcie badaniami reproduktorów pochodzących z importu oraz ich nasienia, w celu kontroli przed wprowadzeniem mutacji do populacji krajowej. Podsumowując, w krajach, w których dopuszcza się używanie w hodowli nosicieli mutacji genów letalnych, nosiciele powinni być kojarzeni z końmi zdrowymi, wolnymi od mutacji i ilość tego typu kojarzeń powinna być sukcesywnie zmniejszana, aby ostatecznie zostać wyeliminowana (Jonsson i Eriksson, 2007).

Piśmiennictwo

- Bailey E. (1998). Odds on the FAST gene. *Genome Res.*, 8: 569–571.
- 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 atrophy. *J. Vet. Med. A, Physiology, Pathology, Clinical Medicine*, 53: 286–287.

- Brault L.S., Cooper C.A., Famula T.R., Murray J.D., Penedo M.C. (2011). Mapping of equine cerebellar atrophy 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. Gen.*, 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 Va responsible for Lavender Foal Syndrome. *PLoS Genetics*, 6 (4): e1000909. doi:10.1371/journal.pgen.1000909.
- Jones W.E. (1997). Severe combined immunodeficiency now a solution. *J. Equine Vet. Sci.*, 17: 630–632.
- Jonsson L., Eriksson S. (2007). Equine severe combined immunodeficiency. *Litteraturstudie SLU, Uppsala*.
- Kulisa M., Pieszka M., Frybes O. (1999). Cięża bliźniacze w hodowli koni pełnej krwi angielskiej w Polsce w latach 1987-1996. *Med. Weter.*, 55 (10): 689–693.
- 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. *Vet. Clin. N. Am.-Equine*, 16: 105–116.
- Perryman L.E., Torbeck R.L., Perryman L.E., Torbeck R.L. (1980). Combined immunodeficiency of Arabian horses: confirmation of autosomal recessive mode of inheritance. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 176: 1250–1251.
- 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. Rec.*, 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. Genetics*, 40: 39–41.
- Trommershausen-Bowling A., Clark R.S. (1985). Blood group and protein polymorphism gene frequencies for seven breeds of horses in the United States. *Anim. Genet.*, 16: 93–108.

Zatwierdzono do druku 20 I 2014

TOMASZ ZĄBEK, MONIKA BUGNO-PONIEWIERSKA, ARTUR GURGUL

Gene defects in purebred Arabian horses – breeding problems

SUMMARY

Genetic disorders, like other phenotypic traits, are determined by DNA polymorphism which might be the cause of lethality dependently on the localization of mutation sites and the sequence length of mutated variant. The spread of genetic diseases is supported by the fact that most of these are conditioned by recessive alleles carried by individuals extensively used in reproduction because of their high breeding values. Understanding the molecular basis of mutant genes and elaboration of DNA tests for identifying heterozygous carriers enables the elimination of heterozygous individuals from active breeding or their controlled selection for mating. This paper presents a review of the identified gene mutations responsible for genetic disorders in purebred Arabian horses, which can cause significant economic losses to the horse industry.

Key words: purebred Arabian horses, DNA, polymorphism