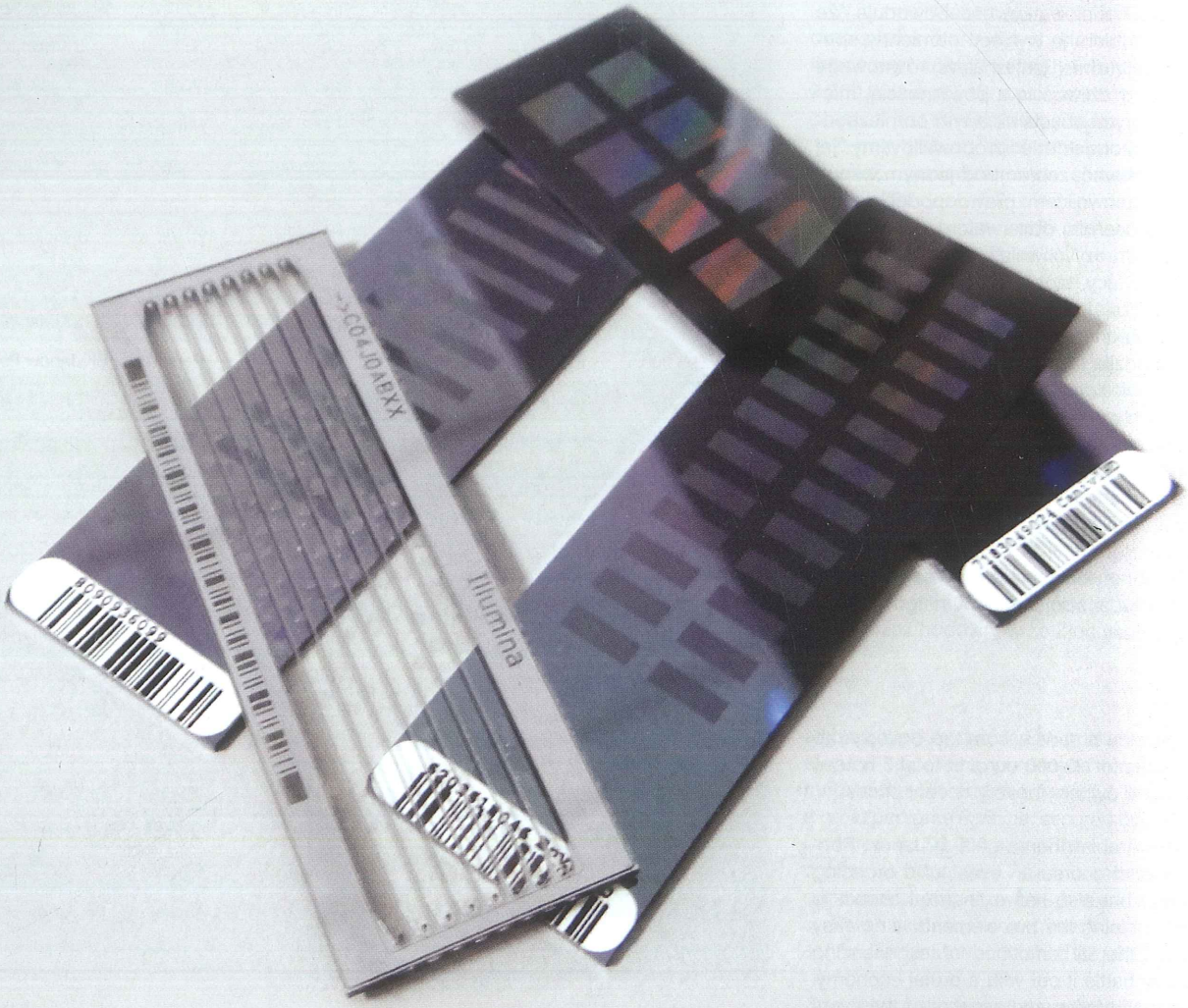
Choroby genetyczne u koni arabskich

co warto wiedzieć



Mikromacierze do analiz genomicznych oraz płytka do sekwencjonowania następnej generacji (NGS) / Microarrays for genomic analysis and flowcell for Next Generation Seqencing

Opracowała: Monika Bugno-Poniewierska
Samodzielna Pracownia Genomiki,
Instytut Zootechniki PIB

Tłum./Transl: Monika Bugno-Poniewierska

Genetyka jest obecnie najszybciej rozwijająca się dziedziną nauk biologicznych. Zastosowanie w badaniach najnowszych metod biologii molekularnej, genomiki, epigenetyki, bioinformatyki i statystyki pozwoliło na zidentyfikowanie kluczowych genów związanych z procesami wzrostu i rozwoju, strukturą i funkcją poszczególnych tkanek i organów oraz defektami genetycznymi. Osiągnięcia w dziedzinie genetyki zwierząt a szczególnie genetyki molekularnej mają bezpośrednie zastosowanie w diagnostyce chorób genetycznych, głównie w opracowaniu testów diagnostycznych nosicielstwa chorób występujących ze znaczną częstością u poszczególnych gatunków i ras.

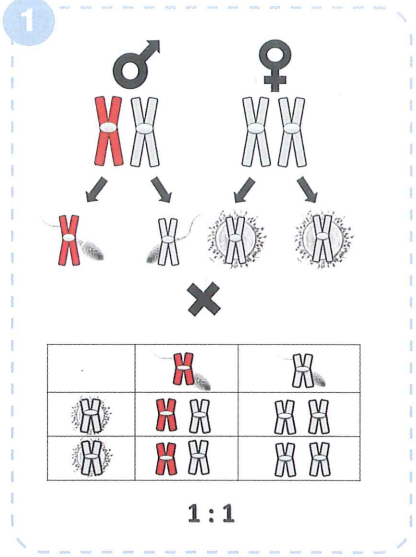
Obecnie u ssaków znanych jest około 3500 różnych chorób genetycznych. Znaczna ich część jest wynikiem mutacji w obrebie wielu genów (mutacje wielogenowe). Choroby te nie są przekazywane na zasadzie prostego dziedziczenia mendlowskiego. Niejednokrotnie objawy tych chorób pojawiają się na skutek interakcji z czynnikami środowiska i ujawniają się dopiero wówczas, gdy nasilenie tych czynników osiągnie pewną wartość progową.

Drugim typem chorób genetycznych są choroby monogenowe, będące wynikiem mutacji w jednym tylko genie. Choroby monogenowe przekazywane są potomstwu zgodnie z prawami Mendla. Mutacje te mogą mieć charakter dominujący bądź recesywny. W przypadku mutacji dominującej, wystarczy obecność jednego zmutowanego allelu w genotypie badanego osobnika aby wystąpiły zauważalne efekty fenotypowe (w tym przypadku objaw cho-

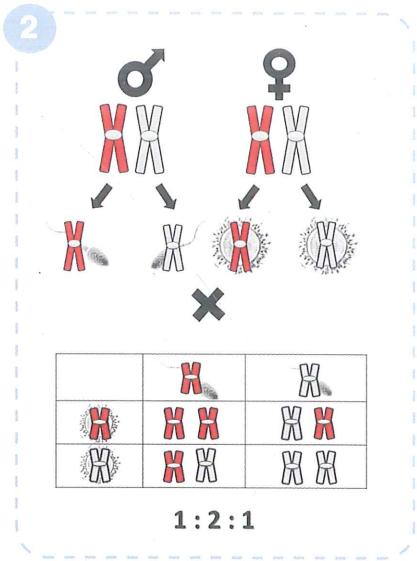
efektem są zaburzenia funkcji i niedrożność jelita grubego. Molekularne podłoże choroby, to mutacja TC>AG, w transmembranowej domenie białka receptora endoteliny (gen EDNRB). Receptor ten jest niezbędny dla prawidłowego rozwoju zarodka i migracji komórek barwnikowych skóry (melanocytów). Chore źrebięta rodzą się z niebieskimi oczami a ich umaszczenie jest całkowicie lub prawie całkowicie białe, stąd nazwa jednostki chorobowej. Choroba objawia się brakiem zwojów nerwowych w jelitach (aganglionozą), co z kolei prowadzi do niedrożności jelit i kolek. Ze względu na niedrożność dolnego odcinka przewodu pokarmowego, z reguły zgon następuje w ciągu dwóch pierwszych dób życia zwierzęcia.

LFS (Lavender Foal Syndrome) letalny syndrom źrebiąt maści lavender. Występuje głównie u koni rasy arabskiej. Zdiagnozowane przypadki pochodzą głównie z egipskiej populacji koni arabskich, odnotowane również w australijskiej i amerykańskiej populacji. Podłoże molekularne LFS – to mutacja funkcjonalna w genie miozyny V (MYO5A). Źrebięta obarczone LFS posiadają charakterystyczną maść opisywaną jako: srebrna, matowa lawenda, blada, matowa różowo-szara lub jasno kasztanowa. Efektem tej choroby są zaburzenia neurologiczne, napady sztywnienia kończyn, przeprost głowy, szyi i kręgosłupa (opisthotonus), oczopląs. Wszystkie dotknięte chorobą źrebięta są z konieczności poddawane eutanazji w ciągu kilku dni po urodzeniu.

Wszystkie wymienione powyżej choroby, dziedziczą się w sposób autosomalny recesywny. Oznacza to, że do wystąpienia objawów chorobowych dochodzi u koni, który wadliwy gen odziedziczyły od obojga rodziców, będących nosicielami. Nosiciele mutacji genetycznej wprawdzie nie chorują, ale prawdopodobieństwo przekazania defektu genetycznego potomstwu wynosi 50% (rys 1.).



Natomiast prawdopodobieństwo, że potomstwo dwóch nosicieli mutacji będzie chore, wynosi 25%, 50% to prawdopodobieństwo przekazania mutacji (nosiciele wadliwego genu), a tylko 25% to prawdopodobieństwo urodzenia zdrowego źrebaka, nie będącego równocześnie nosicielem mutacji (rys. 2.).



Współczesna nauka dysponuje narzędziami diagnostycznymi pozwalającymi na precyzyjną identyfikację mutacji genetycznych. Najlepszym materiałem do badań DNA jest próbka krwi pobrana na EDTA, ale nadaje się również nasienie, wymaz z błony śluzowej oraz włosy z cebulkami. Analizę DNA w celu wykrycia/wyeliminowania można przeprowadzić w każdym wieku zwierzęcia, a jego wynik jest niezmienny przez całe życie.

Ceny testów na nosicielstwo chorób genetycznych kształtują się na ogół na poziomie kilkudziesięciu USD. I tak test na nosi-

presence of two copies of the mutated gene inherited from both parents.

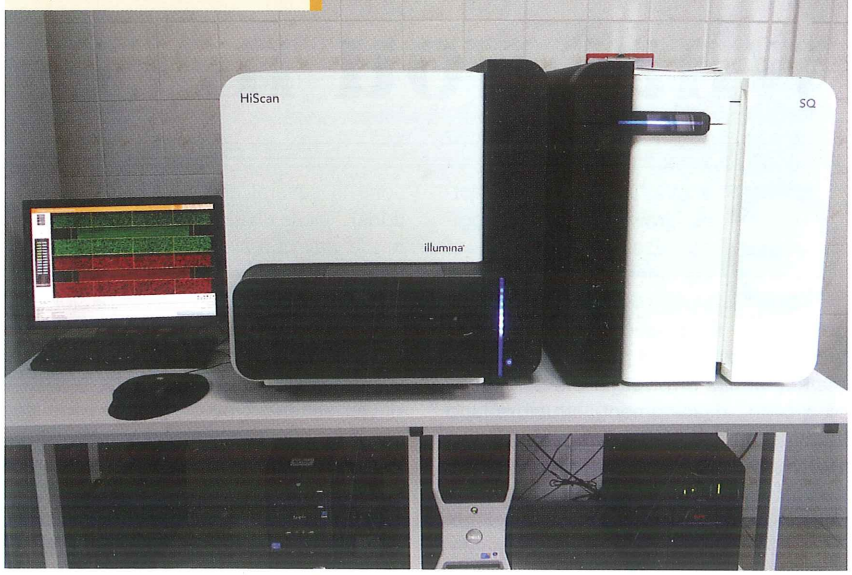
The most common genetic diseases that occur in the breed of Arabian horses and horses born by crossing Arabian horses with individuals of another race are:

– SCID, severe combined immunodeficiency. Molecular basis of this disease is the mutation in the gene encoding the catalytic subunit (DNA-PKcs) PK. This protein is involved in the recombination process of V (D) J in the early stages of B-lymphocytes differentiation that produce antibodies and T-lymphocytes of the immune system. Individuals suffering from SCID, due to disturbances in the maturation of B and T lymphocytes, and the production of interferon gamma and immunoglobulin, are extremely susceptible to infections. Consequently foals suffer from various infections such as viral infections of the upper respiratory tract as well as the gastrointestinal tract, the effect of which is death of the animal within the first few months of life;

– CA (Cerebellar Abiotrophy) is a neurological genetic disorder of an autosomal type (not sex-linked of the subject) that is inherited recessively. The medium molecular CA defect within purebred Arabian horses is a functional G to A mutation at nucleotide position 13074277 of the ECA2 chromosome sequence. Mutation site is located in the fourth exon of the TOE1 gene and results in a sequence change of the encoded protein (Arg to His substitution at amino acid position 95).

The disease develops when piriform cells in cerebellum called Purkinje cells begin to fade. These cells play a key

Skanowanie mikromacierzy SNP w aparaturze Illumina HiScanSQ



cielstwo CA kosztuje 40 USD a wyniki testu przedstawiane są w następujący sposób:

CA/CA Osobnik chory: koń posiada 2 kopie zmutowanego genu związanego z wystąpieniem choroby CA i będzie wykazywał objawy tej choroby

N/CA Nosiciel: koń posiada 1 kopię zmutowanego genu związanego z wystąpieniem choroby CA, jest heterozygotą pod względem tej mutacji i nie wykazuje objawów choroby. Osobnik ten może przekazać wadliwy gen 50% swoich potomków.

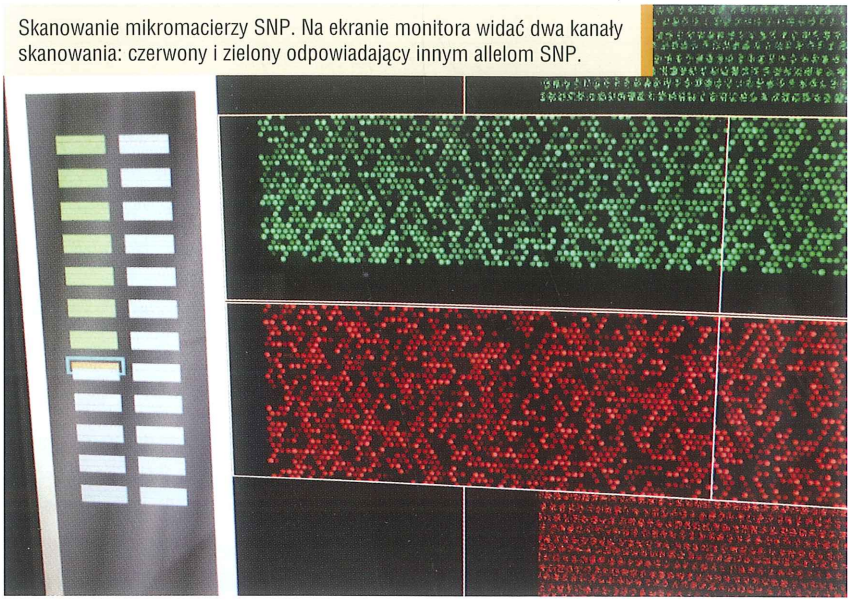
N/N Prawidłowy: koń nie posiada zmutowanego genu związanego z CA, wynik testu negatywny, osobnik i jego potomstwo będzie zdrowe

Korzyścią z przeprowadzenia badań na nosicielstwo defektu genetycznego jest przede wszystkim wyodrębnienie spośród zwierząt nie wykazujących objawów chorobowych, nosicieli mutacji (czyli mogących przekazać defekt 50% potomstwa). Umożliwia to odpowiedni dobór do kojarzeń, tak aby uniknąć wyboru na obojga rodziców nosicieli mutacji. Świadomość przekazania mutacji umożliwia z kolei kontrolę potomstwa i ewentualnego późniejszego postępowania hodowlanego.

W dobie inseminacji istnieje duże ryzyko szybkiego rozprzestrzenienia się mutacji w populacji. Hodowcy na całym świecie dobrowolnie badają swoje konie w kierunku nosicielstwa CA i SCID. Do chwili obecnej w Polsce nie ma obowiązku badania koni na nosicielstwo mutacji genetycznych. Niektóre kraje wprowadziły obowiązkowe testy w kierunku CA czy SCID (np. Niemiecki Związek Hodowców Koni Arabskich od 2010 roku), włącznie z wpisaniem tych informacji do paszportu. Postępowanie takie z jednej strony jest bardzo korzystne, ponieważ przy zakupie konia, czy też nasienia hodowca zna potencjalne ryzyko wprowadzenia mutacji do swojej populacji. Z drugiej jednak strony istnieje obawa, że osobniki będące nosicielami mutacji, pomimo ich potencjału hodowlanego, poprzez „napiętnowanie" będą eliminowane z hodowli a w konsekwencji osłabiona zostanie pula genetyczna rasy. W tym przypadku konieczna jest szeroko pojęta akcja informacyjna, która pomoże hodowcom koni zrozumieć ryzyko i zagrożenie pojawieniem się choroby, nawet po kilku latach „utajenia" jej w populacji.

Ponadto niezaprzeczalnym jest fakt, iż uzyskanie informacji o nosicielstwie defektu genetycznego, umożliwia hodowcom prowadzenie odpowiedzialnej polityki hodowlanej.

Skanowanie mikromacierzy SNP. Na ekranie monitora widać dwa kanały skanowania: czerwony i zielony odpowiadający innym allelom SNP.



role in the brain, taking part in the control of balance and coordination. Without Purkinje cells, the animal loses its sense of space and distance.

CA affected foals appear normal at birth. Symptoms appear in animals of approximately six weeks of age (yet sometimes this does not happen until the fourth month). The disease causes death of Purkinje cells in the cerebellum of foals, which leads to a progressively amplified imbalances and motor incoordination. Symptoms of CA have different severity. Some foals have very stringent symptoms, including a total lack of ability to maintain balance, in other cases only excessive shaking of the head occurs. Regardless of the severity of symptoms, CA foals can never be used under saddle due to the lack of motor coordination. They also require frequent treatment, sometimes of very severe injuries resulting from accidental injuries.

– OLWS – syndrome of white foals of overo equine coat color, revealing the presence of congenital absence of ganglion intramurla in the distal colon, resulting in dysfunction and obstruction of the colon. The molecular mechanism of this disease is the TC> AG mutation in a transmembrane domain of endothelin protein receptor (EDNRB gene). This receptor is essential for normal embryonic development and migration of skin pigment cells (melanocytes). Diseased foals are born with blue eyes and their coat is completely or almost completely white, hence the name of the disease. The disease is manifested by the absence of enteric ganglia (aganglioza), which in turn leads to intestinal obstruction and colic. Due to the obstruction of the lower gastrointestinal tract, death of an animal usually occurs within the first two nights.

LFS – lethal syndrome of foals of lavender equine coat color. It occurs mainly in horses of the Arabian breed. Diagnosed cases are mainly from the Egyptian population of Arabian horses, also reported in the Australian and American populations. Molecular basis of LFS – a functional mutation in the myosin V gene (MYO5A). Foals affected by LFS have a characteristic equine coat color described as: silver, matte lavender, pale, dull pinkish-gray or pale chestnut. The result of this disease are neurological disorders, seizure stiffness of limbs, hyperextension of the head, neck and spine (opisthotonus), and nystagmus. All affected foals are inevitably euthanized within a few days after birth.

All of the above mentioned diseases are inherited in an autosomal recessive manner. This means that the onset of disease occurs in horses that inherit the defective gene from both parents who are carriers. Carriers of genetic mutations, although not sick, have a 50% probability of transmitting a genetic defect to their offspring (Figure 1).

However, the probability that the progeny of two carriers of the mutation would be sick is 25%; 50% is the probability of transmission of mutations (carriers of the defective gene) and only 25% is the chance of having a healthy foal that is not simultaneously a carrier of the mutation (Figure 2).

Modern science utilizes diagnostic tools that allow for precise identification of genetic mutations. The best material for DNA testing is a blood sample collected on EDTA, but seed, mucosal swabs and hair with the roots are also suitable. DNA analysis in order to detect/elimination can be performed at any age of an animal and the result is unchanged throughout its whole life.

SŁOWNICZEK

Genomika – dziedzina genetyki molekularnej, która zajmuje się odczytywaniem sekwencji genomów organizmów (sekwencjonowanie) i poznawaniem sekwencji nukleotydów konkretnych genów. Bada również zależności pomiędzy strukturą genu a jego biologiczną funkcją w organizmie.

Epigenetyka – badanie mechanizmów związanych z rozwojem, polegających na powstaniu cech dziedziczonych przez komórki potomne, które nie są związane z mutacjami w DNA.

Gen – podstawowa jednostka dziedziczenia, zlokalizowana w chromosomach, decydująca o przekazywaniu cech potomstwu. Stanowi ciąg nukleotydów kodujących pojedyncze białko lub cząsteczkę RNA.

Choroby genetyczne – grupa chorób wywołana mutacjami w obrębie genu lub genów, mających znaczenie dla prawidłowej budowy i czynności organizmu.

Dziedziczenie mendlowskie (dziedziczenie chromosomowe) – proste dziedziczenie genów znajdujących się w chromosomach. Każdy gen występuje w postaci pary alleli. Podczas procesu mejozy każda komórka rozrodcza (gameta) otrzymuje tylko po jednym zestawie chromosomów (n) i jednym allelu z każdej pary.

Choroby monogenowe (jednogenowe) – choroby, do których powstania przyczynia się uszkodzenie pojedynczego genu lub pojedynczego allelu genu.

Mutacja dominująca – mutacja, której obecność tylko jednej kopii zmutowanego genu wystarczy, aby w organizmie pojawił się efekt tej mutacji.

Mutacja recesywna – mutacja, której efekt fenotypowy maskowany jest przez allel dominujący. Ujawnia się ona tylko w układzie homozygotycznym, co oznacza, że obydwa allele genu muszą kodować daną cechę.

Limfocyty B – komórki układu odpornościowego odpowiedzialne za humoralną odpowiedź odpornościową, czyli wytwarzanie przeciwciał.

Limfocyty T – komórki układu odpornościowego odpowiedzialne za komórkową odpowiedź odpornościową.

Dziedziczenie recesywne – w genetyce, sposób dziedziczenia, w którym cecha dziedziczona ujawnia się tylko w układzie homozygotycznym, co oznacza, że obydwa allele genu muszą kodować daną cechę.

Mutacja funkcjonalna – zmiana sekwencji aminokwasów w białku. Najczęściej powoduje także zmiany w aktywności danego białka, które prowadzą do określonego efektu fenotypowego.

Nukleotydy – organiczne związki chemiczne z grupy estrów fosforanowych, podstawowe składniki strukturalne kwasów nukleinowych (DNA i RNA).

Sekwencja DNA – jest to kolejność nukleotydów w cząsteczce DNA.

Ekson – kodująca część cząsteczki DNA, ulegając transkrypcji pojawia się w dojrzałej cząsteczce RNA. Może kodować element białkowy.

Transkrypcja – przepisywanie informacji genetycznej z DNA na RNA.

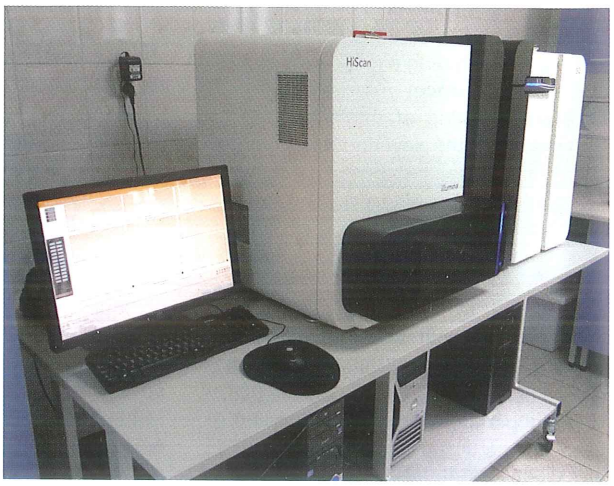
Prices of tests for carriers of the genetic diseases are generally at the level of tens of USD. Thus, a test for carriers of CA costs 40 USD and the test results are presented in the following way:

CA/CA The subject is sick: the horse has two copies of the mutated gene associated with the onset of the CA disease and it will show signs of the disease.

N/CA Carrier: the horse has one copy of the mutated gene associated with the occurrence of CA disease; it is heterozygous for this mutation and shows no signs of disease. This individual may pass the defective gene to 50% of its descendants.

N/N Valid: the horse does not have the mutated gene associated with the CA disease; the result of the test is negative and the individual and his offspring will be healthy.

The advantage of testing for carriers of genetic defects is primarily a separation of animals showing no symptoms of the disease and mutation carriers (i.e., a defect that could pass to 50% of the offspring). This allows the appropriate selection of mating animals, in order to avoid selection for both parents which are mutation carriers. Awareness of the mutation transfer can in turn lead to offspring control and any subsequent breeding procedures.

In the time of insemination, there is a high risk of rapid spread of the mutations in the population. Breeders around the world voluntarily test their horses for being carriers of CA and SCID. To date, in Poland there is no obligation to test horses as of being carriers of genetic mutations. Some countries have introduced mandatory testing for CA or SCID (e.g. German Arabian Horse Breeders Association since 2010) including entering the information to the passports of animals. Such actions on one hand is very beneficial because when a horse or its seed is bought, the breeder knows the potential risk of introducing mutations into his own population. On the other hand, there is a concern that individuals who carry the mutation, despite their breeding potential, through this „stigma", will be eliminated from the breeding and consequently the genetic pool of the breed will be weakened. In this case a wide information campaign is essential to help horse breeders understand the risks and the hazards of the outbreak, even after several years of „latency" in the population.

In addition, it is an undeniable fact that obtaining information about genetically defective carriers can lead to establishing responsible breeding policies.