

STANISŁAW KAMIŃSKI, ANNA RUŚĆ

*artykuł przeglądowy*

# Testowanie bydła na nosicielstwo genu wczesnej obumieralności zarodków DUMPS

Katedra Genetyki Zwierząt Wydziału Zootechnicznego AR-T, ul. Oczapowskiego 5, 10-718 Olsztyn

Zdrowe, prawidłowo żywione i utrzymywane krowy powinny cielić się regularnie raz do roku; w przeciwnym razie ma się do czynienia z jałowością. W stadach krów mlecznych doskonalonych przez krzyżowanie z buhajami rasy holsztyńsko-fryzyskiej (h.f.) obok białaczki i niskiej wydajności, jałowść jest główną przyczyną brakowania krów (2). Oprócz licznych czynników środowiskowych, przyczyną jałowienia krów mogą być czynniki natury genetycznej, istotnie zaburzające proces zapłodnienia lub upośledzające ontogenezę nowego organizmu. U bydła, jeśli śmierć embrionu następuje w okresie do ok. 45 dnia ciąży (to jest w czasie od zapłodnienia do zakończenia różnicowania się narządów, czyli organogenezy), określa się ją mianem obumieralności zarodkowej (8). Wczesna obumieralność zarodków występuje dosyć często u wszystkich gatunków zwierząt. U kłaczy straty spowodowane tym zjawiskiem szacuje się na 2-17%, u owiec odpowiednio 11-19%, a u świń aż 30-40% (8). U bydła całkowite straty w okresie ciąży, biorąc pod uwagę różnicę między liczbą zapłodnień a liczbą wycieleń, określa się na ok. 33-55% (1).

Genetyczne przyczyny obumierania embrionów mogą być rozmaite. Na największą uwagę u bydła zasługują aberracje chromosomowe, przez wielu autorów uważane za główną przyczynę zamierania zarodków (1, 6, 11). Obok mutacji strukturalnych polegających na zmianach w układzie genów na chromosomach (pęknięcia chromosomów, translokacje, inwersje, delecje, duplikacje), występują również mutacje liczby chromosomów, które u bydła najczęściej mają charakter trisomii.

Odrębną grupę zmian genetycznych stanowią mutacje punktowe polegające na substytucji nukleotydowej w określonym genie. Mutacje takie często są przyczyną defektów genetycznych i wywołują dysfunkcję białek strukturalnych lub enzymatycznych. Spośród dysfunkcji metabolicznych najgroźniejsze są te, które powodują niedobory enzymów mających podstawowe znaczenie dla organizmu. Geny letalne ujawniające się u zwierząt gospodarskich do niedawna były poznawane metodami genetyki klasycznej rejestrującej jedynie efekty fenotypowe ich działania (3, 7). Nieznane były i nadal w wielu przypadkach takimi pozostają pierwotne przyczyny

i natura zjawisk molekularnych prowadzących do ujawnienia się genów letalnych.

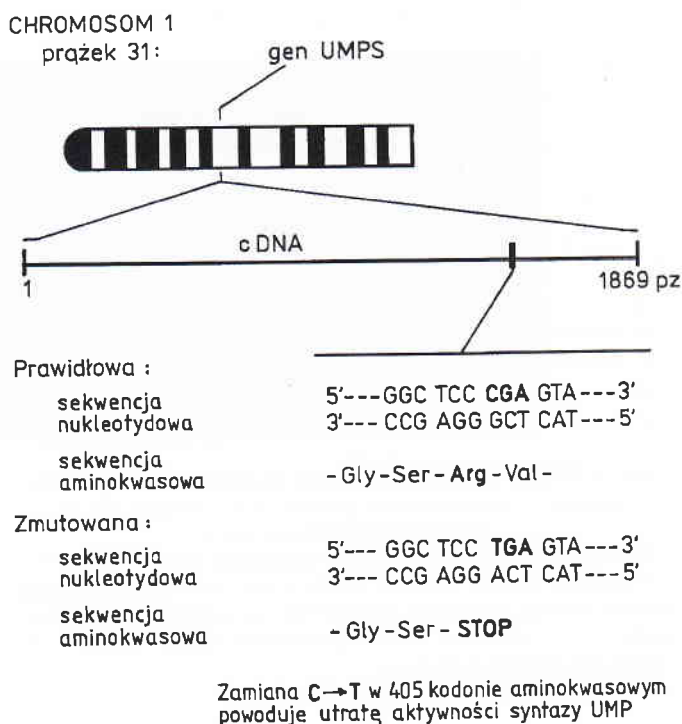
Geny letalne powodują śmiertelność prawie wszystkich osobników dotkniętych uwarunkowaną nimi anomalią i są przyczyną znacznych strat ekonomicznych w hodowli. Poznanie molekularnego podłoża genów letalnych oraz opanowanie metod identyfikacji ich nosicieli umożliwia eliminację heterozygot z populacji lub ich kontrolowany dobór do kojarzeń. Wydaje się, że badania nad genem kodującym syntazę urydino-monofosforanu (UMPS – Uridine Monophosphate Synthase) stanowią „modelowy” przykład takiego postępowania.

Do grupy genów letalnych wywołanych mutacją punktową zaliczyć należy wykryty w latach osiemdziesiątych u bydła rasy h.f. niedobór enzymu biorącego udział w syntezie pirymidyn, uwarunkowany genem recesywnym (12). Przyjęta skrócona nazwa tego defektu genetycznego DUMPS pochodzi od angielskich słów – Deficiency of Uridine Monophosphate Synthase i określa niedobór syntazy urydino-monofosforanu. Analogiczne zaburzenie jest znane od lat w medycynie ludzkiej pod nazwą dziecięca acyduria orotowa (20).

## Istota defektu genetycznego DUMPS

Kluczowa rola syntazy monofosforanu urydyny w powstawaniu DNA i RNA wywołała zainteresowanie genem kodującym ten enzym. Zaowocowało to, jak dotychczas, poznaniem kodującej części genu tzw. cDNA genu syntazy monofosforanu urydyny u bydła (15). Sekwencja ta składa się z 1869 par zasad (pz). Gen UMPS został również zmapowany na bydlęcym chromosomie 1 w prążku 31 (14).

Podłożem molekularnym defektu genetycznego DUMPS jest mutacja punktowa w kodonie aminokwasowym nr 405. Substytucja cytozyny na tyminę w kodonie CGA warunkującym argininę powoduje powstanie sekwencji TGA. Konsekwencją tej zmiany jest utworzenie na mRNA kodonu STOP (UGA), kończącego translację białka (17). Skutkiem tego jest utrata aktywności syntazy urydino-monofosforanu (12) (ryc. 1). Defekt ten dziedziczny jest jak autosomalna cecha recesywna i ma charakter letalny. U heterozygot nie występują widoczne oz-



Ryc. 1. Lokalizacja genu UMPS oraz istota jego mutacji

naki jej szkodliwego oddziaływania, natomiast homozygoty recesywne zamierają ok. 40 dnia ciąży (19). Typ dziedziczenia tej wady ustalono na tej podstawie, iż nie stwierdzono dotychczas obecności żyjących homozygot recesywnych.

U zwierząt heterozygotycznych mimo częściowego braku enzymu UMPS nie obserwuje się ujemnego wpływu na ich wzrost czy rozwój. Przeciwnie, badania poświęcone ocenie stanu krów heterozygotycznych DUMPS<sup>+</sup> / DUMPS<sup>-</sup> wykazały ich nieco wyższą wydajność mleczną w porównaniu z normalnymi zdrowymi osobnikami (5, 18). Istnienie genu zamieralności zarodków (DUMPS) w populacji krów mlecznych wiąże się jednak z ryzykiem tworzenia homozygotycznych chorych zwierząt. Kojarząc ze sobą heterozygoty należy spodziewać się ok. 25% utraty cieląt spowodowanej ich zamieraniem w okresie prenatalnym (według oczekiwanego rozkładu genotypów 1:2:1).

Dostrzegając to zagrożenie, w USA od 1988 r. wprowadzono oficjalne testowanie bydła w celu wykrycia nosicieli DUMPS. Liczbę nosicieli tej wady letalnej wśród amerykańskiego bydła h.f. oceniono na 1-2% populacji, przy czym wszystkie one wywodzą się od buhaja Skokie Sensation Ned urodzonego w 1957 r. (20). Dotychczas nie wykryto wymienionej wady wśród czołowych buhajów amerykańskich rasy jersey, guernsey oraz wśród bydła innych ras mlecznych i mięsnych. W Europie wśród przebadanych w latach 1988-1991 krów i buhajów rasy h.f. zidentyfikowano 414 nosicieli DUMPS. Większość nosicieli wykrytych w USA i Europie była potomkami buhaja Happy – Herd Beautician, prawnika Neda urodzonego w 1981 r.

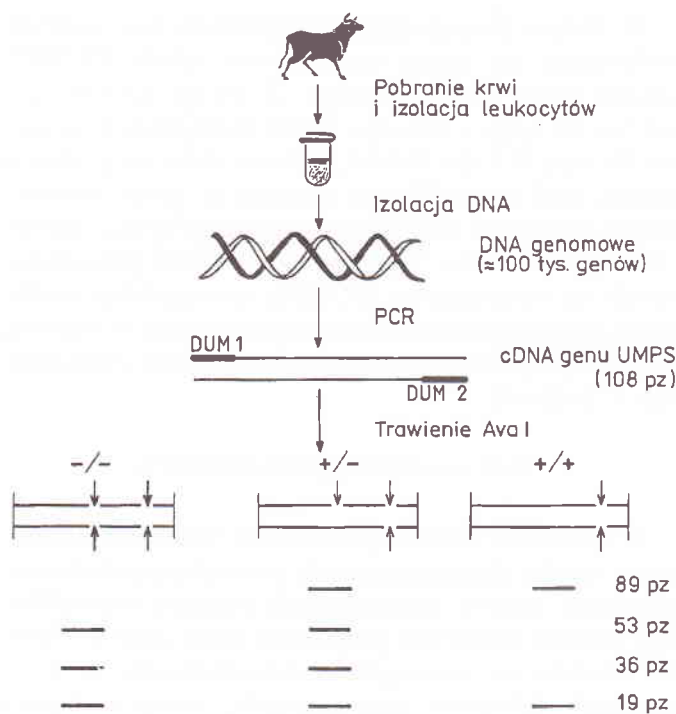
W Polsce dotychczas nie opublikowano żadnych informacji na temat nosicielstwa allelu DUMPS wśród bydła czarno-białego. Z uwagi na trwający od lat 70-tych i obecnie coraz rozleglejszy import bydła rasy h.f. do Polski, celowe stało się podjęcie badań nad identyfikacją mutacji w genie syntazy mono-fosforanu urydyny w populacji bydła czarno-białego w Polsce. Wykonywanie badań przesiewowych na nosicielstwo DUMPS stworzyłoby możliwość wskazania nosicieli mutacji tego genu w krajowej populacji bydła a tym samym możliwość eliminacji ich z hodowli.

### Test na nosicielstwo DUMPS

W ostatnich latach opracowano wiele molekularnych testów diagnostycznych pozwalających na rozpoznanie chorób genetycznych poprzez identyfikację mutacji będących przyczyną tych chorób. Testy te okazały się szczególnie informatywne w przypadkach defektów genetycznych, których objawy nie są patognomiczne. Najczęściej stosowaną metodą, która znalazła zastosowanie w diagnostyce molekularnej defektów genetycznych jest polimerazowa reakcja łańcuchowa (PCR) połączona z użyciem hybrydizacji specyficznych sond molekularnych lub analizą polimorfizmu fragmentów restrykcyjnych (RFLP) (21).

Do stwierdzenia obecności mutacji wywołującej DUMPS zastosowano metodę PCR-RFLP opublikowaną przez Schwengera i wsp. (16) wprowadzając kilka własnych modyfikacji. Metoda ta składa się z kilku etapów: 1) pobrania materiału biologicznego, najczęściej w postaci krwi obwodowej lub nasienia, 2) specyficznej amplifikacji, czyli namnożenia fragmentu genu UMPS metodą PCR i 3) trawienia uzyskanego fragmentu genu enzymem restrykcyjnym Ava I w celu stwierdzenia obecności mutacji (ryc. 2). Wielkość fragmentów DNA, uzyskanych w wyniku trawienia danej cząsteczki DNA zależy od odległości między sekwencjami rozpoznawanymi przez enzym restrykcyjny. Uzyskane odcinki DNA rozdziela się następnie metodą elektroforezy w żelu agarozowym lub poliakrylamidowym i poddaje analizie pozwalającej na zlokalizowanie mutacji różnicujących liczbę i wielkość fragmentów restrykcyjnych.

Rycina 3 przedstawia przykładowy test na nosicielstwo DUMPS. Po strawieniu uzyskanych fragmentów genu UMPS restryktazą Ava I, w żelu uzyskano po 2 fragmenty DNA o długościach 53, 36 pz. Prążek 19 pz był niekiedy słabo widoczny w 3% żelu agarozowym. Taki obraz pasm pozwolił uznać osobnika, od którego wyizolowano DNA, za nie posiadającego mutacji wywołującej DUMPS. Pojawienie się dodatkowego pasma DNA o długości 89 pz świadczyło o istnieniu mutacji i pociągało za sobą uznanie osobnika, od którego wyizolowano DNA, za nosiciela DUMPS. Obecność tylko jednego



Ryc. 2. Schemat procedury identyfikacji mutacji związanej z niedoborem syntazy urydyno-5'-monofosforanu bydła (oznaczenia genotypów: -/- homozygota dominująca, +/- heterozygota, +/+ homozygota recesywna)

pasma o wielkości 89 pz świadczyłyby, że DNA użyte do amplifikacji PCR pochodzi od homozygoty recesywnej.

Badaniami objęto 120 krów – pierwiastek rasy nizinnej czarno-białej. Krowy te pochodziły z kilku obór rozmieszczonych na terenie Żuław. Dodatkowo, do badań włączono także 2 buhaje podejrzane o nosicielstwo mutacji DUMPS oraz 4 krowy uznane za często roniące. U krów pierwiastek poddanych badaniom nie stwierdzono występowania genotypu heterozygotycznego  $DUMPS^+ / DUMPS^-$ . Koresponduje to z doniesieniem Shanksa i wsp. (20), którzy szacują frekwencję występowania allelu zmutowanego na 1-2% wśród bydła h.f. w USA. Testowi diagnostycznemu poddano także DNA czterech krów uznanych jako często roniące. Krowy te jak również dwa przebadane buhaje, które ze względu na swe pochodzenie należały do grupy ryzyka, okazały się wolne od DUMPS. Obecnie podejmowane są próby ustalenia obecności potomstwa potencjalnych nosicieli DUMPS w Polsce.

### Zalety metody PCR-RFLP w diagnostyce DUMPS

Metoda PCR-RFLP jest szeroko stosowana ze względu na to, że pozwala na określenie genotypu z próbek DNA (lub RNA), a zatem jest niezależna od płci, wieku i stanu fizjologicznego badanego osobnika. W przypadku niedoboru syntazy monofosforanu urydyny alternatywną do metody PCR-RFLP jest metoda oznaczania zawartości orotanu



Ryc. 3. Elektroforogram przedstawiający fragmenty restrykcyjne DNA powstałe w wyniku trawienia produktu PCR o długości 108 pz enzymem restrykcyjnym Ava I.

Objaśnienia: ścieżka 1 i 7 – marker molekularny DNA, ścieżka 2 i 5 – heterozygota (nosiciel DUMPS), ścieżka 3 i 6 – homozygoty dominujące (osobniki zdrowe), ścieżka 4 – produkt PCR nie poddany trawieniu Ava I, ścieżka 2 i 3 – użyto Ava I produkcji Peterfarm Sieradz, ścieżka 5 i 6 – użyto Ava I produkcji Promega

w mleku lub moczu krów laktujących oraz pomiar aktywności enzymu syntazy monofosforanu urydyny (12). Oznaczenia takie jednak charakteryzują się dużą zmiennością związaną z płcią, wiekiem i stadium laktacji. Jones i wsp. (4) wykazali, że cielęta charakteryzują się o 80% wyższą aktywnością erytrocytarnej syntazy UMP niż zwierzęta dorosłe (powyżej 2 lat). U samców wskaźnik ten jest o 10% wyższy niż u samic. Z kolei Shanks i wsp. (18) przyjmują 2/3 normalnej wartości aktywności syntazy UMP jako rozgraniczenie między osobnikami zdrowymi a heterozygotycznymi. Metoda ta wydaje się być dość czaso- i pracochłonna, a ponadto opiera się na użyciu pierwiastków promieniotwórczych. Testowanie zwierząt na podstawie oznaczania poziomu enzymu w erytrocytach wymaga poza tym użycia zwierząt kontrolnych będących tej samej płci i w porównywalnym wieku (13).

Podobnie jak pomiar aktywności syntazy, oznaczenie zawartości orotanów również wrażliwe jest na wpływ wielu czynników znacznie zmniejszających jednoznaczność testu. Niedobór enzymów metabolizujących kwas orotowy wzmagają jego gromadzenie w płynach ciała i w mleku. Przy czym orotan jako pośrednik w biosyntezie nukleotydów pirymidynowych jest naturalnym składnikiem mleka krów i innych przeżuwaczy. Orotan powstaje w gruczole mlekowym, tylko znikoma jego ilość, ok. 0,1% dociera z krwią do tego gruczołu (10). Zawartość kw. orotowego w mleku krowim wykazuje dużą zmienność i zależy m.in. od rasy, fazy laktacji, liczby laktacji oraz od indywidualnych właściwości osobników (10). U krów rasy jersey i guernsey stwierdza się niższe stężenie tego kwasu w mleku niż u krów rasy holsztyńskiej i ayrshire. Analizując stadia laktacji – najniższe stężenie tego metabolitu obserwuje

się w siarce, wzrasta ono następnie aż do 10 tygodnia laktacji, po czym utrzymuje się na stałym poziomie do 38 tyg. laktacji, po którym następuje stopniowy spadek koncentracji kwasu orotowego w mleku do końca laktacji. Zjawisko to jest indukowane raczej stanem laktacji krów niż ciążą bowiem po wycieleniu następuje wzrost ilości orotanu wydalanego z moczem (12). Laktacja wymaga wzmoczonej podaży nukleotydów pirymidynowych dla syntezy laktozy (z UDP – galaktozy) i białek mleka (poprzez RNA). Zwiększone zapotrzebowanie na pirymidyny objawia się wzmoczoną sekrecją orotanu w mleku. Podobnie dzieje się z orotanem w moczu, kumulowanym z powodu wzmoczonego metabolizmu w wątrobie podczas laktacji. Stężenie kwasu orotowego w mleku zmienia się wraz z liczbą laktacji i począwszy od czwartej laktacji maleje. Wymienione zjawiska natury biochemiczno-fizjologicznej ograniczają wykorzystanie zmiennego poziomu kwasu orotowego w płynach ustrojowych jako metody dedukcji genotypu DUMPS. Sytuację pogarsza jeszcze fakt, że zwiększone wydalanie kwasu orotowego w moczu zwierząt występuje także przy wrodzonych niedoborach enzymów cyklu mocznikowego, niezbilansowaniu aminokwasów w tkankach i hiperamonemii (9).

Podsumowując należy uznać, że metoda PCR-RFLP w porównaniu z ilościowymi oznaczeniami aktywności syntazy i poziomu kwasu orotowego odznacza się większą wiarygodnością, precyzją i łatwością wykonania.

### Znaczenie praktyczne identyfikacji nosicieli DUMPS w hodowli bydła

Nowoczesne techniki rozrodu: inseminacja, przenoszenie zarodków, zapłodnienie *in vitro* powodują szybsze rozpowszechnianie się mutacji o szkodliwym działaniu w populacjach zwierząt. W USA od 1988 r. wprowadzono oficjalne testowanie bydła w celu wykrycia nosicieli DUMPS. W rodowodach przebadanych zwierząt rasy h.f. umieszcza się przy nazwie osobnika odpowiednie oznaczenia: DP (z ang. carrier of DUMPS) – jeśli zwierzę jest heterozygotą i TD (ang. tested free as carrier) – dla zwierzęcia o normalnym stanie (20). Podobne działania podjęto w krajach Unii Europejskiej.

Do Polski było i jest nadal importowane nasienie buhajów rasy h.f. Istnieje zatem możliwość wystąpienia mutacji w krajowej populacji bydła czarno-białego. Trudno jest ocenić frekwencję tej mutacji w Polsce. Podjęte próby odtworzenia czasu, miejsca i zakresu przeniknięcia mutacji genu UMPS do krajowego pogotowia bydła, jakkolwiek fragmentaryczne, pozwalają przypuszczać, że DUMPS jest raczej zjawiskiem marginalnym i nie stanowi znaczącej przyczyny zaburzeń płodności u bydła w Polsce.

Pomimo tego test na nosicielstwo DUMPS może obecnie być wykonywany w następujących grupach zwierząt:

- u wybitnych buhajów dopuszczonych do rozplodu rasy nizinnej czarno-białej oraz czerwono-białej, u których analiza rodowodowa wskazuje na pokrewieństwo ze znanym nosicielem DUMPS,
- u buhajów testowych, u których potomstwa stwierdzono znaczne zaburzenia płodności z podejrzeniem, że mają one charakter genetyczny i u których nie można wykluczyć spokrewnienia z nosicielem DUMPS.

Rezultaty takich badań powinny stanowić uzupełniającą informację w programach hodowlanych bydła mlecznego opartych na sztucznym unasiennianiu i transferze zarodków np. w MOET (multi ovulation embryo transfer).

Dzięki postępowi w badaniach podstawowych z zakresu biologii i genetyki molekularnej oraz odkrywaniu nowych metod badania struktury i funkcji genów można się spodziewać, że w najbliższej przyszłości liczba znanych genów letalnych będzie wzrastać. Z pewnością zjawisku temu sprzyjać będą wyniki Projektu Poznania Genomu Człowieka oraz Projektu Mapowania Genomu Bydła (BovMap). Świadomość tego dynamicznego procesu u lekarzy weterynarii z pewnością może okazać się pomocna w interpretacji występujących schorzeń u zwierząt, w rozpoznaniu możliwości diagnostycznych oraz w podejmowaniu decyzji zmierzających do najskuteczniejszej i najtańszej terapii.

### Piśmiennictwo

1. Bielański A., Tischner M.: Biotechnologia rozrodu zwierząt gospodarskich. Universitas, Kraków 1993.
2. Gnyp J., Trautman J., Kamiński K.: Medycyna Wet. 51, 533, 1995.
3. Hutt F. B.: Genetyka zwierząt. PWRiL, Warszawa 1972.
4. Jones L. R., Harden K. K., Bragg D. S., Robinson J. L.: Compar. Biochem. Physiol. 84 B, 489, 1986.
5. Kuhn M. T., Shanks R. D.: J. Dairy Sci., 77, 589, 1994.
6. Lechniak D.: Medycyna Wet. 52, 89, 1994.
7. Maciejowski J., Zięba J.: Genetyka zwierząt i metody hodowlane. PWN, Warszawa 1982.
8. Max A.: Medycyna Wet. 47, 416, 1991.
9. Motyl T.: Medycyna Wet. 46, 58, 1990.
10. Motyl T.: Medycyna Wet. 46, 153, 1990.
11. Rejduch B., Świtoński M., Słota E., Danielak B., Kozubska-Sobocińska A.: Medycyna Wet. 50, 379, 1994.
12. Robinson J. L., Drabik M. R., Dombrowski D. B., Clark J. H.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 321, 1983.
13. Robinson J. L., Popp R. G., Shanks R. D., Oosterhof A., Veerkamp J. H.: Livest. Prod. Sci. 36, 287, 1993.
14. Ryan A. M., Gallagher D. S. Jr., Schoeber S., Schwenger B., Womack J. E.: Mammal. Genome 5, 46, 1994.
15. Schoeber S., Simon D., Schwenger B.: Gene 124, 307, 1993.
16. Schwenger B., Schoeber S., Simon D.: Genomics 16, 241, 1993.
17. Schwenger B., Tammen I., Aurich C.: J. Reprod. Fert. 100, 511, 1994.
18. Shanks R. D., Bragg D. S. A., Robinson J. L.: J. Anim. Sci. 64, 695, 1987.
19. Shanks R. D.: Am. J. Vet. Res. 51, 800, 1990.
20. Shanks R. D., Robinson J. L.: Cornell Vet. 80, 119, 1990.
21. Węgleński P.: Genetyka molekularna. PWN, Warszawa 1995.

Adres autora: dr Stanisław Kamiński, ul. Żołnierska 14 c/202, 10-561 Olsztyn