

GRZEGORZ GRZYBOWSKI, TOMASZ GRZYBOWSKI*, MARCIN WOŹNIAK*,
IZABELA CHACIŃSKA-BUCZEK, EWA SMUDA, KRZYSZTOF LUBIENIECKI

Badania przesiewowe na obecność genu wczesnej obumieralności zarodków DUMPS u bydła w Polsce*)

Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębcu, 05-551 Mroków

*Katedra i Zakład Medycyny Sądowej Akademii Medycznej, ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-084 Bydgoszcz

Grzybowski G., Grzybowski T., Woźniak M., Chacińska-Buczek I., Smuda E., Lubieniecki K.

Molecular screening for the early embryo mortality gene (DUMPS) in the Polish cattle population

Summary

The purpose of the study was to elaborate a molecular procedure to identify the DUMPS mutation which causes hereditary disorder (deficiency of uridine monophosphate synthase) in cattle. The degree of this disorder was determined in a gene pool of a Polish bredcattle population which consisted of 1038 animals: 781 artificial insemination bulls from all centers in Poland and 257 sire dams from the two largest breeding centers of Holstein-Friesian cattle: Osięciny and Osowa Sień.

The diagnosis was performed using the PCR-RFLP method and technique based on automated solid-phase sequencing of PCR products.

In the examined material no DUMPS carrier was found. This indicates that the population of cattle reared in Poland is free from this economically significant disorder.

The results obtained indicate a high effectiveness of monitoring of point mutation DUMPS by the PCR-RFLP method. Moreover, it is worth noting the wide possibilities of examining other biologically significant genome regions using the solid-phase sequencing method.

Punktowe podstawienie zasad C→T w kodonie 405 genu UMPS (gen syntazy monofosforanu urydyny) znane jest jako mutacja DUMPS – deficiency of uridine monophosphate synthase (16). Ta istotna gospodarczo anomalia genomu bydła domowego klasyfikowana jest w grupie mutacji nonsensowych. Kodon 405 genu UMPS zmienia sekwencję CGA na kończący translację białka kodon TGA (15) co powoduje, że produkt genowy jest niepełny i traci swoje normalne właściwości biologiczne (enzym UMPS jest nieaktywny). Gen UMPS u bydła zmapowany został na autosomie nr 1 (3, 14), występuje zatem w jednej grupie sprzężeniowej m.in. z genem BLAD odpowiedzialnym za występowanie wrodzonego niedoboru leukocytarnych cząsteczek adhezyjnych (2). W polskim piśmiennictwie dane na temat genetycznych i patofizjologicznych podstaw recesywnej aberracji DUMPS u bydła opublikowano w 1995/96 r. (7, 8).

Normalny gen UMPS bydła oznaczany jest jako TD, natomiast jego recesywny allel (zmutowany gen DUMPS) – jako DP. Zatem zwierzęta nie obciążone mutacją mają genotyp TD/TD, zaś jej nosiciele – DP/TD.

Enzym UMPS jest nieodzowny w szlaku syntezy *de novo* nukleotydów pirymidynowych. Największe zapotrzebowanie na ten szlak syntezy występuje we wczesnych etapach rozwoju prenatalnego. Genotypy homozygotyczne recesywne (DP/DP) są pozbawione wspomnianego szlaku metabolicznego i zamierają ok. 35 dnia po zapłodnieniu to znaczy w okresie kończenia procesu implantowania w macicy i przechodzenia na samowystarczalność w zakresie metabolizmu. Na tym etapie rozwoju prenatalnego wyraźnie widoczne są już kończyny, głowa i inne części młodego organizmu a także pracujące serce. Zamieranie spowodowane mutacją DUMPS ma zatem miejsce na styku dwóch faz rozwojowych: w końcowej fazie rozwoju zarodkowego i na początku okresu płodowego. W dokumentach hodowlanych, katalogach itd., genotypy przetestowanych zwierząt oznaczane są skrótowo jako TD (zwierzę normalne) lub DP (nosiciel mutacji). Osobniki heterozygotyczne względem mutacji DUMPS tzn. jej nosiciele (genotyp DP/TD) są całkowicie normalne i przy zastosowaniu konwencjonalnej diagnostyki weterynaryjnej nie można ich odróżnić od homozygot genu normalnego (genotyp TD/TD). Analogiczna anomalia genomu człowieka znana jest jako kwasica orotowa (orotic aciduria) i wiąże się z zaburzeniami metabolizmu pirymidyn, lecz nie jest letalna (18).

*) Praca wykonana w ramach projektu badawczego 5 PO6D 052 09 finansowanego przez KBN.

Aberracja DUMPS u bydła ma duże znaczenie ekonomiczne. Jej ujemne skutki wpływają na wyniki rozrodu, a więc ogniskują się na głównym elemencie pracy hodowlano-selekcyjnej i efektywności produkcji. U osobników żyjących nie występują genotypy homozygotyczne recesywne DP/DP. Można je zdiagnozować tylko we wczesnej fazie rozwoju prenatalnego badając technikami molekularnymi DNA pozyskany z komórek trofoblastu lub węzła zarodkowego (17). W warunkach hodowlanych cały problem śledzenia mutacji DUMPS w puli genowej koncentruje się zatem na wykrywaniu buhajów i krów – nosicieli mutacji (heterozygotyczny genotyp DP/TD).

W 1993 r. zsekwencjonowano gen UMPS (15), istnieją zatem obecnie możliwości prowadzenia szerszych badań nad mutacją DUMPS przy wykorzystaniu zaawansowanych technologii DNA. Polskie badania nad tym zagadnieniem podjęto w IGiHZ PAN w Jastrzębcu w 1994 r. W następnym roku zaadaptowano efektywny test diagnostyczny PCR-RFLP przydatny do masowych badań przesiewowych i rozpoczęto monitorowanie puli genowej polskiej populacji bydła na obecność mutacji DUMPS (7).

Celem niniejszego opracowania było zaprezentowanie metod identyfikacji mutacji DUMPS techniką PCR-RFLP i poprzez automatyczne sekwencjonowanie genu UMPS, oraz przedstawienie potencjalnego i faktycznego zagrożenia mutacją DUMPS bydła hodowanego w Polsce.

Materiał i metody

Materiał do badań stanowiły próbki krwi, cebulki włosowe, próbki kontrolne genomowego DNA od bydła hodowanego w Niemczech oraz nasienie buhaja rasy holsztyńsko-fryzyskiej Happy-Herd Beutician. Przebadano ogółem 1038 sztuk bydła (781 buhajów reprodukcyjnych i 257 krów matek buhajów). Buhaje pochodziły ze Stacji Hodowli i Unasieniania Zwierząt w Bydgoszczy, Legnicy, Poznaniu, Olecku, Szczecinku, Łowiczu, Karczowie, Krasnym i Zamościu.

Natomiast krowy pochodziły głównie z dwóch najcenniejszych genetycznie, zarodowych stad czystorasowe go bydła hf (OHZ Osięcin woj. bydgoskie i OHZ Osowa Sień woj. leszczyńskie) oraz z Zakładu Doświadczalnego IGiHZ PAN w Jastrzębcu. Testowany materiał był zróżnicowany rasowo i oprócz bydła holsztyńsko-fryzyskiego (493 szt.), bydła czarno-białego (451 szt.), bydła czerwono-białego (65 szt.), obejmował osobniki różnych ras mięsnych oraz bydła rasy jersey.

Przy pobieraniu próbek, ekstrakcji, standaryzacji i przygotowywaniu genomowego DNA do badań stosowano wcześniej opisane metodyki własne (9, 12).

Przeprowadzanie łańcuchowej reakcji polimerazowej (PCR) i analizy długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP). Objętość oraz komponenty (poza primerami) mieszaniny reakcyjnej PCR były identyczne jak przy diagnostyce mutacji BLAD (12). Na jedną reakcję stosowa-

wano po 5 pM primera S09 (forward) i S18 (reverse) umożliwiających uzyskiwanie produktu PCR o wielkości 108 pz (16).

Reakcję PCR (amplifikację fragmentu 108 pz) przeprowadzano przy użyciu termocyklerów TC-1 i Gene Amp PCR system 9600 (Perkin-Elmer) stosując następujący program termiczny:

94°C – 5 min., 60°C – 1 min., 72°C – 30 sek. przez 1 cykl,
94°C – 1 min., 60°C – 1 min., 72°C – 30 sek. przez 35 cykli,
94°C – 1 min., 60°C – 1 min., 72°C – 5 min. przez 1 cykl.

Całkowita objętość próbki poddawanej analizie RFLP wynosiła 20 µl. Uzyskiwano to dodając do 10 µl produktu PCR, 5 jednostek endonukleazy Ava I (Peterfarm, Sieradz), 2 µl buforu (10x) i dopełniając próbkę H₂O (Sigma, W-3500).

Próbki inkubowano w temp. 37°C przez 18-20 godz. i poddawano analizie restrykcyjnej wg opisanej już metodyki stosowanej przy diagnostyce mutacji BLAD (12).

Automatyczne sekwencjonowanie produktów PCR. Reakcję amplifikacji fragmentu genu UMPS prowadzono z użyciem 20-30 ng DNA przy objętości reakcji 50 µl. W skład reakcji wchodziły ponadto: 1x Thermophilic DNA Polymerase Buffer (Promega), 1,5 mM MgCl₂, 200 µM każdego z deoksynukleotydów (Promega), 0,5 U polimerazy Taq (Promega) oraz 0,2 µM każdego z primerów. Ich sekwencje były takie same jak przy metodzie PCR-RFLP z tym, że jeden z primerów służących do generowania nici matrycowej był znakowany na końcu 5' biotyną.

Stosowano następujące warunki termiczne: wstępna denaturacja w 94°C przez 4 min., a następnie 94°C przez 15 sek., 69°C przez 20 sek., 72°C przez 15 sek. (35 cykli), końcowa elongacja przy 72°C przez 5 min. Ilość i jakość produktu PCR oceniano na 5% żelu agarozowym (MetaPhor, FMC) wybarwionym bromkiem etydyny.

Do sekwencjonowania na podłożu stałym używano 40 µl nieoczyszczonego produktu PCR oraz zestawu Auto Load Solid Phase Sequencing Kit (Pharmacia). Primer sekwencyjny znakowany był na końcu 5' fluoresceiną.

Elektroforezę prowadzono w warunkach zalecanych przez producenta na automatycznym sekwenatorze A.L.F. (Pharmacia). Wyniki analizowano przy pomocy programu ALF Manager (Pharmacia).

Wyniki i omówienie

Na ryc. 1 przedstawiono wyniki testu PCR-RFLP umożliwiające szybkie i wiarygodne zweryfikowanie obecności lub braku mutacji DUMPS w genomie bydła. Idea testu oparta jest na fakcie, iż w allelu normalnym (TD) występuje jedno miejsce restrykcyjne dla endonukleazy Ava I (C↓CCGAG), które w wyniku podstawienia C→T w kodonie 405 genu UMPS zanika przybierając nową postać CCTGAG (allel DP). Dlatego amplifikowana sekwencja zmutowanego allelu nie podlega trawieniu przez endonukleazę Ava I. Jednakże efekt niewrażliwości produktu PCR na działanie endonukleazy może występować także z innych powodów, z których najtrudniejszym do wykrycia jest powstawanie podczas

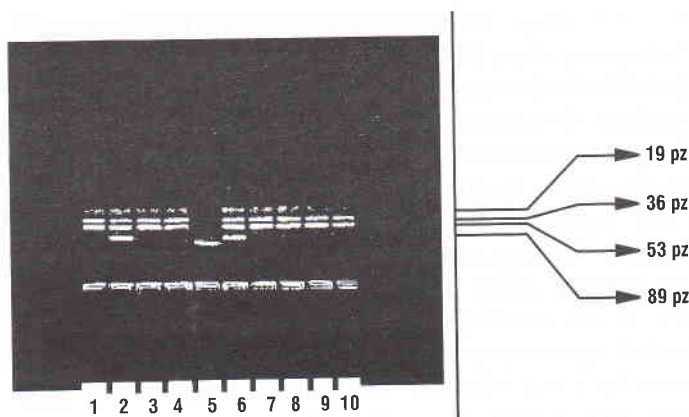
reakcji PCR heterodupleksów tzn. niecałkowicie sparowanych nici DNA (5). Dlatego kluczowym elementem stosowanego testu jest wprowadzona tu wewnętrzna kontrola efektywności trawienia. Jej istotą jest obecność w obrębie amplifikowanej sekwencji dodatkowego („sztucznego”) miejsca restrykcyjnego dla endonukleazy Ava I. Generowane jest ono w produkcji PCR na skutek celowego niesparowania jednej zasady w sekwencji primera reverse hybrydującego po denaturacji DNA z końcem 5' tzw. nici antysensowej. W konsekwencji, produkt PCR powstający w wyniku amplifikacji DNA każdego osobnika jest, niezależnie od genotypu, wrażliwy na działanie endonukleazy Ava I. Manifestuje się to występowaniem w każdej bez wyjątku próbce, fragmentu restrykcyjnego o wielkości 19 par zasad (ryc. 1). A zatem przy prawidłowym przebiegu analizy u żadnego osobnika bez względu na jego genotyp nie może pojawić się fragment restrykcyjny o wielkości identycznej z wielkością amplifikowanego produktu PCR. Zaistnienie takiego przypadku wskazuje, że w procedurze identyfikacyjnej wystąpiły nieprawidłowości, a uzyskany wynik nie jest wiarygodny.

Indykátorem obecności mutacji DUMPS w genomie osobnika jest ujawnienie się bardzo dobrze widocznego fragmentu restrykcyjnego o wielkości 89 pz. Posługując się wyżej opisaną metodą diagnostyczną, rozróżnienie między genotypem normalnym TD/TD i genotypem nosiciela mutacji DP/TD (odpowiednio – trzy i cztery fragmenty restrykcyjne) – ryc. 1 nie nastręcza żadnych trudności. Genotyp homozygotyczny recesywny DP/DP (brak takiej próbki na ryc. 1) manifestuje się występowaniem dwóch fragmentów o wielkości 89 pz i 19 pz.

W prezentowanych na ryc. 1 wynikach oznaczeń, próbka nr 2 pochodziła od wybranego nosiciela mutacji DUMPS zdiagnozowanego w Niemczech, natomiast próbka nr 6 wyizolowana została z nasienia słynnego buhaja rasy holsztyńsko-fryzyskiej (hf) Happy-Herd Beautician (nr 5 w rankingu 400 czołowych buhajów w USA w 1987 r.). Z aktualnych badań światowych wynika, że jest on głównym nosicielem, za pośrednictwem którego nastąpiło rozpowszechnienie tej anomalii na świecie. „Rodowód” mutacji DUMPS jest jednak bardziej złożony, zdiagnozowano bowiem szereg innych czołowych buhajów – nosicieli, które nie są ze sobą ściśle spokrewnione (13).

W dotychczas przebadanym przez nas licznym materiale z całej Polski nie wykryto żadnego przypadku nosicielstwa mutacji DUMPS. Z uwagi na wybitnie niepożądany charakter mutacji DUMPS, brak w puli genowej bydła tej groźnej anomalii jest bardzo pozytywnym i zarazem zaskakującym faktem.

W końcu lat osiemdziesiątych mutacja DUMPS uznana została przez związki hodowców bydła hf



Ryc. 1. Wyniki oznaczeń mutacji DUMPS u bydła przy wykorzystaniu jako matrycy dwuniciowego DNA izolowanego z komórek krwi:

Objaśnienia: 5 – próbka kontrolna tzn. amplifikowany fragment genu UMPS (108 pz); 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10 – amplifikowane próbki DNA poddane trawieniu enzymem restrykcyjnym Ava I; 1, 3, 4, 7, 8, 9, 10 – obraz charakterystyczny dla genotypu TD/TD (osobniki wolne od mutacji DUMPS); 2, 6 – obraz charakterystyczny dla genotypu DP/TD (nosiciele mutacji DUMPS). Indykatorem wystąpienia mutacji jest fragment restrykcyjny o wielkości 89 pz.

za niepożądaną. W USA oraz w Europie Zachodniej zainicjowano zatem program zmierzający do wykrywania jej nosicieli. Program testowań, do którego przystąpili ochotniczo niektórzy hodowcy, opierał się na pomiarze aktywności syntetazy monofosforanu urydyny w erytrocytach. W ciągu czterech lat (styczeń 1988 – styczeń 1992) przebadano w Europie nielosowo wybraną grupę 1226 najcenniejszych genetycznie krów i buhajów rasy hf identyfikując 414 nosicieli (13). Obciążenie mutacją DUMPS było więc znaczne. Polska od początku lat 70-tych rozpoczęła intensywny import bydła hf z USA, Kanady i Europy Zachodniej opierając na dolewie krwi tej rasy swą strategię genetycznego doskonalenia rodzinnego bydła czarno-białego. Przypomnieć należy, że w latach siedemdziesiątych przebiegał w Polsce pod auspicjami FAO międzynarodowy eksperyment hodowlany uważany za największy, jaki przeprowadzono dotychczas na bydło. Doświadczenie to trwało prawie 10 lat. W pierwszym jego okresie 80 000 dawek nasienia buhajów reprezentujących 10 odmian bydła cb z różnym udziałem genów hf z całego świata, użytych zostało do zainseminowania 30 000 krów w 70 gospodarstwach państwowych. Powyższe dane wskazują, że mógł nastąpić niezamierzony import do Polski genu DUMPS co nie byłoby zaskakujące, ponieważ dotyczyło to nawet tak odległych krajów importujących bydło hf jak Republika Południowej Afryki (11).

Jednakże rezultaty odnoszące się do dotychczas przetestowanego przez nas najcenniejszego genetycznie materiału kształtującego pulę genów krajowo-

wej populacji (buhaje reprodukcyjne i krowy matki buhajów) dają podstawy do stwierdzenia, że pula genowa hodowanego w Polsce materiału nie jest aktualnie obciążona mutacją DUMPS. Dlatego analizując problem wczesnej obumieralności zarodków bydła i tzw. nieinfekcyjne przyczyny tego zjawiska (10), wyłączyć można z kalkulacji genetyczną etiologię związaną z mutacją DUMPS. Z uwagi na wyżej podane fakty dotyczące rozległego importu bydła hf nie można wykluczyć, iż w wyniku dalszych badań ujawnione zostaną jakieś przypadki nosicielstwa lecz już obecnie jest pewne, że prowadzenie dalszej kontroli prawidłowości genomu u materiału reprodukcyjnego spowoduje, że mutacja DUMPS u bydła w Polsce na trwałe pozostanie zagrożeniem wyłącznie potencjalnym.

Z punktu widzenia specyfiki hodowli zwierząt, głównym powodem utrzymywania się w populacji różnorodnych aberracji genomu jest z reguły ich recesywny charakter co uniemożliwia szybkie ich wykrycie oraz mający często miejsce silny pozytywny związek z priorytetem selekcji hodowlanej (wydajność rzeźna, mleczna itd.), co powoduje duże skumulowanie danej wady w puli genowej. Nawet wówczas gdy pula genowa populacji jest wolna od jakiegokolwiek istotnej gospodarczo aberracji recesywnej, a była ona rejestrowana w przeszłości lub występuje w innych krajach, należy prowadzić diagnostykę w celach prewencyjnych. Różnorodne mutacje powstają spontanicznie co sprawia, że nawet po uwolnieniu populacji od danej wady może się ona pojawić ponownie, a do jej szybkiego rozprzestrzenienia przyczyniać się mogą efektywne biotechniki rozrodu: inseminacja, stymulowanie mnogiej owulacji u krów, zapłodnienie *in vitro*, przenoszenie zarodków, klonowanie itd. (1, 4, 6).

Na ryc. 2 przedstawiono oryginalną metodę monitorowania prawidłowości struktury genu UMPS drogą sekwencjonowania na podłożu stałym. Ten rodzaj automatycznej analizy sekwencji genu UMPS bydła nie był dotychczas na świecie opisany. Drukarka współpracująca z komputerem sekwenatora, po zarejestrowaniu przetworzonego sygnału laserowego migrujących w żelu produktów sekwencjonowania, samoczynnie drukuje w układzie liniowym sygnał detekcji stawiając w odpowiedniej pozycji literę symbolizującą daną zasadę oraz wykreślając w tym miejscu odpowiedni kolorowy pik. Adenina (A) manifestuje się na wykresie obecnością pików zielonego, tymina (T) – czarnego, guanina (G) – niebieskiego, natomiast cytozyna oznaczona jest kolorem czerwonym. Przy analizie sekwencyjnej danego genu lub jego fragmentu, weryfikowana jest niezależnie od siebie kolejność zasad nici 5' – 3' oraz kolejność zasad w komplementarnej nici 3' – 5'. Dopiero uzyskana pełna zbieżność wyników takiego porównania umożliwia wiarygodne zweryfikowanie analizowanej sekwencji genu.

Ryc. 2 przedstawia przykładowy wynik analizy nici 5' – 3' normalnego genu UMPS bydła. Wyniki pochodzą z amplifikacji genomowego DNA wyekstrahowanego z jednej cebulki włosowej dorosłej krowy. Zwraca uwagę fakt, że wierzchołki pików są wyraźnie od siebie oddzielone. Wszystkie pozycje są obsadzone zasadami i nie występuje w tym względzie żaden przypadek nieoznaczoności. Sygnalizuje to w sposób oczywisty, że mamy tu do czynienia z DNA osobnika, którego genom nie jest obciążony mutacją DUMPS. Istotnie, na krytycznej pozycji, którą zaznaczono strzałką widać wyraźnie samodzielny pik cytozyny (C), natomiast w nici komplementarnej obecna jest na tej pozycji guanina (G). Znaczy to, że nie występuje podstawienie C → T, a zatem badany osobnik jest homozygotą genu normalnego (TD/TD). Prezentowana metoda automatycznego sekwencjonowania produktów PCR nie tylko umożliwia szybkie wykrywanie aberracji (mutacji) genomu lecz także precyzyjne określenie jej natury i dlatego może być szczególnie przydatna w różnicowej diagnostyce weterynaryjnej. Inne mutacje punktowe lub zmiany struktury tego samego genu wiązać się mogą z podobnymi następstwami funkcjonalno-metabolicznymi i ich diagnozowanie techniką PCR-RFLP nie we wszystkich przypadkach jest możliwe. Natomiast automatyczne sekwencjonowanie, którego przykładem jest prezentowana sekwencja genu UMPS, umożliwia obserwowanie większych, istotnych biologicznie obszarów genomu, gdzie mogą występować aberracje ważne dla funkcjonowania organizmu.

Szersze badania przesiewowe na obecność mutacji DUMPS w puli genowej bydła hodowanego w Polsce nie były dotychczas prowadzone. Chociaż dane przedstawione w niniejszym opracowaniu wskazują, że ta dziedziczna aberracja bydła aktualnie nie występuje w polskim materiale hodowlanym, wskazane byłoby jej dalsze monitorowanie. Podkreślane jest to jej dużym znaczeniem dla ekonomiki produkcji, a także faktem, że w krajach produkujących w hodowli bydła obowiązuje już testowanie materiału hodowlanego na obecność mutacji DUMPS. Informacje o wynikach są zamieszczane w dokumentacji hodowlanej, katalogach itd. Z uwagi na zachodzące w Europie procesy integracyjne, dysponowanie przez polską weterynarię analogicznymi testami diagnostyki molekularnej ugruntowałoby jej partnerskie związki z weterynarią światową.

Prezentowany test oparty na metodzie PCR-RFLP jest bardzo efektywny, wiarygodny i umożliwia przetestowanie w krótkim czasie licznej materii nawet w warunkach zagrożeń epizootycznych (np. oparcie testów na „nieinwazyjnych” próbkach takich jak cebulki włosowe). Natomiast przedstawiona metoda automatycznego sekwencjonowania produktów PCR może być przydatna zarówno