

Diagnostyka molekularna wybranych chorób układu mięśniowego i nerwowego u koni

Angelika Andrzejewska, Klaudia Staszak, Karolina Lisiak-Teodorczyk, Piotr Bociąg, Grzegorz Cholewiński, Jacek Wojciechowicz

z Centrum Badań DNA Sp. z o.o. w Poznaniu

Molecular diagnostics of selected muscular and nervous system diseases in horses

Andrzejewska A., Staszak K., Lisiak-Teodorczyk K., Bociąg P., Cholewiński G., Wojciechowicz J., DNA Research Center Ltd., Poznań

Congenital diseases of the muscular and nervous systems are a serious problem in certain horse breeds. The fact that they are largely conditioned by recessive alleles influences the spread of these diseases in breeding. Introduction of veterinary genetic tests allows detection and elimination of these diseases from breeding lines. This paper presents selected genetic diseases in horses that cause severe dysfunction of the muscular system (hyperkalemic periodic paralysis, polysaccharide storage myopathy) and nervous system (cerebellar ataxia). They are associated with mutations in the *SCN4A*, *GYS1* and *TOE1* genes respectively. Understanding the molecular basis of the above-mentioned diseases contributes to the better development of DNA tests, which enable to diagnose the disease more quickly and thus implement effective veterinary care.

Keywords: genetic tests, hyperkalemic periodic paralysis, polysaccharide storage myopathy, cerebellar ataxia, molecular diagnostics.

Choroby genetyczne koni stanowią istotny problem dla hodowców i szerokie zagadnienie z punktu widzenia aktualnych strategii hodowlanych. Podłoże molekularne najczęściej związane jest z mutacjami regionów kodujących lub regulatorowych genów, odgrywających istotną rolę w funkcjonowaniu organizmu. Mutacje w regionach kodujących z reguły powodują powstawanie niefunkcjonalnego białka, natomiast lokalizacja zmiany w sekwencji regulatorowej genu może uniemożliwić przyłączanie czynników transkrypcyjnych, powodując zahamowanie transkrypcji i w rezultacie brak syntezy białka. Szczególną trudność stanowią choroby dziedziczone w trybie autosomalno-recesywnym, gdzie zwierzęta posiadające zmutowany allel recesywny mogą nie wykazywać objawów fenotypowych, co utrudnia wczesne rozpoznanie choroby u ich potomstwa, a tym samym wczesne podjęcie odpowiedniego leczenia. Potomstwo zwierząt będących nosicielami choroby dziedziczonej w sposób autosomalny z prawdopodobieństwem 50% będzie również nosicielem zmutowanego genu, a w 25% będzie dotknięte chorobą. W przypadku gdy tylko jeden z rodziców jest nosicielem, prawdopodobieństwo przekazania zmutowanego allelu potomstwu wynosi 25%. Częstością procedurą wśród hodowców koni jest szerokie stosowanie dawek nasienia ogiera o pożądanych cechach fenotypowych. Jeśli ogier odziedziczył recesywną mutację genetyczną, stosowanie jego nasienia może prowadzić do rozprzestrzeniania się zmiany w hodowli.

Choroby dziedziczne u koni stanowią złożony problem ze względu na dużą wartość hodowlaną tych zwierząt. Do jednych z dotkliwszych, nadal nieuleczalnych, chorób należą: hiperkaliemiczne porażenie okresowe (hyperkalemic periodic paralysis – HYPP), przewlekły mięśniochwat porażenny (polysaccharide storage myopathy – PSSM) oraz zespół abiotrofii mózdzku (cerebellar ataxia – CA; 1, 2, 3).

Hiperkaliemiczne porażenie okresowe (HYPP)

Jest ono jedną z częściej występujących chorób układu mięśniowego u koni. Choroba objawia się znacznym osłabieniem, niekontrolowanymi drżeniami i skurczami mięśni oraz arytmiami serca.

Hiperkaliemiczne porażenie okresowe dziedziczy się w trybie autosomalno-dominującym, co oznacza że wystarczy jeden allel z mutacją, aby osobnik mógł wykazywać objawy choroby. Dotychczas przeprowadzone badania dowodzą, że mutacją sprawczą dla HYPP u koni jest zmiana c.4248C>G, zlokalizowana w 23. eksonie genu *SCN4A* (sodium voltage-gated channel alpha subunit 4 gene). Gen zlokalizowany jest u koni w chromosomie 11 (ECA 11), a jego długość wynosi 27700 pz. *SCN4A* koduje podjednostkę alfa kanału sodowego mięśni szkieletowych o długości 1834 aminokwasów (m. cz. 207487 Da). Wskutek opisanej zmiany w produkcie białkowym w miejscu fenyloalaniny w pozycji 1416 występuje leucyna (p.Phe1416Leu), co zmienia strukturę przestrzenną kanału. Zaburza to przywracanie potencjału spoczynkowego błony po jej początkowej depolaryzacji, przez czasową utratę zdolności przenoszenia jonów przez pompę sodowo-potasową. W takiej sytuacji poziom jonów sodu w komórkach wzrasta, a poziom jonów potasu we krwi przyjmuje chwilowo krytycznie wysoki poziom. Następuje ciągła depolaryzacja miocytów przez ich nadpobudliwość, co prowadzi do nadmiernych skurczów i drżenia mięśni, a także przejściowych ataków porażenia. Dysfunkcja kanału może objawiać się samoistnie lub może być wywoływana przez dodatkowe czynniki zewnętrzne, takie jak zakończenie intensywnego wysiłku (1, 4, 5, 6). Schemat lokalizacji genu *SCN4A* i omawianej zmiany został przedstawiony na [rycinie 1](#).

U heterozygot stwierdzono łagodniejszy przebieg HYPP. Natomiast homozygoty często przejawiają objawy już w ciągu kilku dni po urodzeniu. Wśród nich odnotowano również większą śmiertelność (1, 7). Obecnie opieka weterynaryjna zwierząt z HYPP polega przede wszystkim na podawaniu leków poprawiających wydolność oddechową. Stosowane są także substancje wspomagające wydalanie potasu (np. z moczem) i uwalnianie insuliny, co wiąże się również z odpowiednio

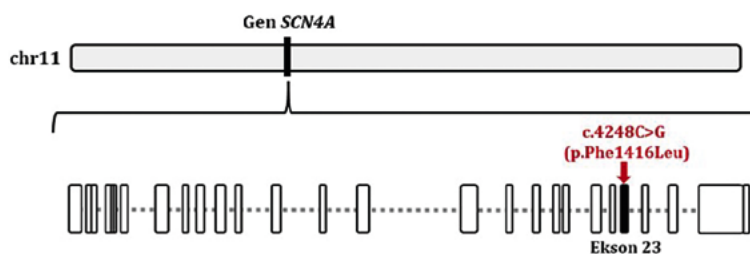
zmodyfikowaną dietą, m.in. ubogą w potas. Jak dotąd choroba jest nieuleczalna, ale szybkie wprowadzenie nadzoru lekarskiego może znacznie zmniejszyć jej dotkliwość. HYPP często jest niemożliwe do zdiagnozowania na podstawie obserwacji zwierzęcia, m.in. ze względu na zróżnicowaną intensywność i czas pojawiania się objawów. W takich przypadkach istotną rolę odgrywa wczesna diagnostyka zwierząt, umożliwiającą szybkie wprowadzenie odpowiedniej opieki weterynaryjnej. Istnieje możliwość zastosowania testów klinicznych, takich jak pomiar stężenia potasu w osoczu podczas ataku, badanie elektromiograficzne (pomiar potencjału błony komórkowej) czy próba wywołania ataku z użyciem chlorku potasu (z reguły niestosowana). Niewątpliwie najskuteczniejszą metodą diagnostyczną stanowią testy genetyczne na obecność mutacji w genie *SCN4A* (2).

Choroba może ujawniać się na różnym etapie życia zwierząt. Objawy występują przejściowo, a ich dotkliwość może wahać się od ledwie zauważalnych dolegliwości, przez częste i silne ataki osłabienia mięśni, aż do śmierci. Choroba często wiąże się z niewydolnością oddechową (1).

Badania pokazały, że wysoką częstotliwość występowania HYPP obserwuje się u koni biorących udział w zawodach halterowych (quarter horse, paint horse, appaloosa oraz inne). Pierwszym nosicielem choroby był ogier rasy american quarter horse, który przekazał ją licznemu potomstwu. Rasa ta jest pożądana w konkurencji halter ze względu na duży wzrost masy mięśniowej, lecz wykazuje zauważalnie większą częstotliwość do występowania hiperkaliemicznego porażenia okresowego. Stąd powiązanie tego fenotypu z mutacją sprawczą dla HYPP. Przyniosło to w ostatnich latach zmiany w klasyfikacji koni do zawodów, a także w przepisach dotyczących rejestracji koni z HYPP, i wynikało z dążenia do wyeliminowania tej choroby (2).

Przewlekły mięśniochwat porażenny (PSSM)

Choroba należy do chorób genetycznych układu mięśniowego. PSSM objawia się upośledzonym metabolizmem glikogenu – polisacharydu, który stanowi główny materiał zapasowy w komórkach zwierzęcych i jest ważnym źródłem energii dla komórek mięśniowych, gdzie stanowi 0,7% ich masy. Chorobę cechuje nadmierne odkładanie polisacharydów w mięśniach, co prowadzi do ich uszkodzenia i niewydolności ruchowej. Skutkiem tego są często obserwowane, niekontrolowane, szybkie skurcze włókien mięśniowych, jak również sztywnienie mięśni. Obserwuje się także naprzemienne kulawizny oraz wyciąganie tylnych kończyn. Wraz z rozwojem PSSM może następować rozpad tkanki mięśniowej poprzecznie prążkowanej, co skutkuje pojawieniem się we krwi wolnej mioglobiny. Konsekwencją tego jest ostra niewydolność nerek. Zwierzę może również wykazywać zmienioną aktywność enzymów mięśniowych, takich jak kinaza kreatynowa, której wzrost aktywności we krwi może świadczyć o uszkodzeniu tkanki mięśniowej. W najcięższych przypadkach choroby może dochodzić do całkowitego obezwładnienia zwierzęcia. Objawy kliniczne PSSM mogą być zróżnicowane i pojawiają się zwykle w wieku



Ryc. 1. Schemat przedstawiający lokalizację genu *SCN4A* oraz zmiany c.4248C>G. Przerwane linie pomiędzy eksonami odwzorowują introny. Opracowanie własne na podstawie bazy Ensembl oraz Wojtulewicz, Gruszczynska i Siewruk, 2011

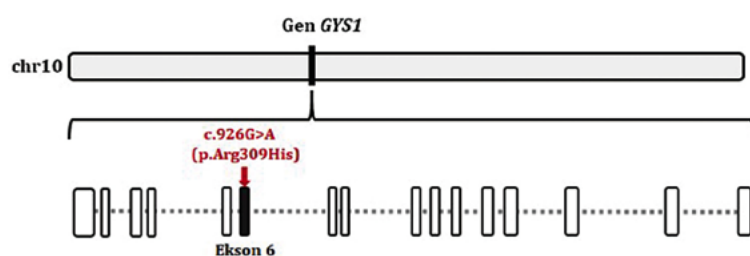
2–3 lat. Częstsze występowanie choroby odnotowane zostało wśród rasy quarter horse i spokrewnionych – koni gorącokrwistych i pociągowych, jak również ich krzyżówek (8, 9).

PSSM dziedziczy się jako cecha autosomalna dominująca. Podłoże molekularne związane jest z mutacją c.926G>A w 6. eksonie genu *GYS1* (glycogen synthase 1 gene), który znajduje się w 10. chromosomie konia (ECA 10; **ryc. 2**). *GYS1* liczy 13314 pz i koduje syntazę glikogenu – białko enzymatyczne o długości 737 aa (m. cz. 83896 Da). Wystąpienie mutacji powoduje zmianę w łańcuchu aminokwasowym tego enzymu – zamiast arginy w pozycji 309 występuje wówczas histydyna (p.Arg309His). Zmiana konformacyjna białka powoduje jego ciągłą aktywność enzymatyczną, co skutkuje rozregulowaniem syntezy glikogenu, którego poziom w mięśniach szkieletowych wzrasta 1,5–2 razy w stosunku do prawidłowego stężenia (1, 5, 6, 9).

Dotychczas nie opracowano skutecznego leczenia PSSM, jednak odpowiednia opieka weterynaryjna może w znacznym stopniu ograniczyć występujące objawy. Duże znaczenie odgrywa zmodyfikowana dieta, która powinna zawierać mniejszą ilość rozpuszczalnych węglowodanów i jednocześnie zwiększoną ilość tłuszczu jako alternatywnego źródła energii.

Fundamentalną rolę w walce z PSSM odgrywają także regularne ćwiczenia, które zmniejszają sztywność mięśni. Niestety nawet w przypadku kontrolowania tych czynników zmienność fenotypowa PSSM jest duża. Ataki choroby mogą być w znacznym stopniu niwelowane również przez odpoczynek i środki uspokajające.

Zaobserwowano, że cięższa postać PSSM występuje u koni mających jednocześnie opisaną mutację w obrębie genu *GYS1*, jak również mutację w genie *RYR1*. Diagnostyka PSSM może obejmować obserwację wytrącania się polisacharydów opornych na amylazę w tkance biopsyjnej mięśnia, jak i kontrolowane



Ryc. 2. Schemat przedstawiający lokalizację genu *GYS1* oraz miejsce zmiany c.926G>A. Przerwane linie pomiędzy eksonami odwzorowują introny. Opracowanie własne na podstawie bazy Ensembl oraz Mccue i wsp. 2009

badania wysiłkowe. Jednakże zdecydowanie większą wiarygodnością cechują się testy genetyczne obejmujące analizę mutacji genu *GYS1* (1, 9).

Zespół abiotrofii mózdzku (CA)

Choroba należy do grupy neurodegeneracyjnych chorób dziedzicznych. Abiotrofia mózdzku jest jedną z najczęściej obserwowanych chorób zwyrodnieniowych u zwierząt domowych. Z histopatologicznego punktu widzenia CA objawia się wyrodnieniem komórek Purkinjego w mózdzku. Objawy obejmują m.in. drżenie głowy, zaburzenia równowagi i brak reakcji na zagrożenie. W wyniku uszkodzeń struktury mózdzku następuje upośledzenie ruchu motorycznego, często w postaci zróżnicowanych stopni ataksji i nieskoordynowanych ruchów. Zmiany pojawiają się zaraz po urodzeniu. Postępujący zanik wywołuje objawy kliniczne w okresie od 6. tygodnia do 4. miesiąca życia zwierzęcia. Abiotrofia mózdzku występuje powszechnie u wielu gatunków zwierząt (psów, owiec, bydła, koni), wykazując pewne różnice w etiologii. W odniesieniu do koni zaburzenie dotyka najczęściej koni czystej krwi arabskiej (3, 10).

CA dziedziczona jest jako cecha autosomalna recesywna. Podłoże molekularne powiązane z mutacją c.284G>A w eksonie 4. genu *TOE1* (target of EGR1 protein 1 gene), który koduje deadenylazę mRNA i zlokalizowany jest w 2. chromosomie konia (ECA 2). Długość genu jest równa 3498 pz, a jego produkt białkowy (*TOE1*) składa się z 509 aminokwasów (masa cz. 56645 Da). Białko to bierze udział w regulacji cyklu komórkowego, wpływając na ekspresję *TGFβ*, *p21* i *p53*. Wskutek mutacji w białku *TOE1* dochodzi do zmiany aminokwasu argininy na histydynę w pozycji 95 (p.Arg95His). Pomimo że aminokwasy mają podobny charakter chemiczny, zmiana ma miejsce w wysoko konserwatywnym regionie genu, co może tłumaczyć jej wpływ na funkcjonalność białka. Ponadto regiony transkrypcyjne genu *TOE1* leżą w pobliżu promotora genu *MUTYH* (pozycja antysensowna w stosunku do *TOE1*). Mutacja powiązana z CA znajduje się w sąsiedztwie miejsca wiązania czynnika transkrypcyjnego dla genu *MUTYH* – *GATA2*. Analiza qPCR materiału wyekstrahowanego z mózdzku koni dotkniętych CA wykazywała obniżoną ekspresję *MUTYH*, w porównaniu ze zdrowymi końmi. Patogeneza molekularna choroby może być zatem związana z utratą funkcjonalności białka *TOE1* lub negatywną regulacją genu *MUTYH*, pośrednio wpływając na wiązanie czynnika *GATA2* (5, 6, 11,

12). Schemat analizowanego genu, jak i miejsce zmiany zostało przedstawione na **rycinie 3**.

Zarówno czas wystąpienia, jak i przebieg choroby nie są jednorodne we wszystkich przypadkach. Konie, będące homozygotami recesywnymi, charakteryzuje stałe drżenie głowy oraz wyższy stopień ataksji. Mimo że CA nie jest chorobą śmiertelną, jednostki o wysokim stopniu zaawansowania choroby najczęściej poddawane są eutanazji. Brak koordynacji ruchów jest uciążliwy dla zwierząt i stanowi niebezpieczeństwo dla hodowców. Jednoznaczne postawienie diagnozy CA stanowi duże wyzwanie ze względu na podobieństwo do innych schorzeń układu nerwowego. Ostateczne rozpoznanie uzyskuje się poprzez pośmiertne badanie histopatologiczne zwierząt. Ze względu na dziedziczną naturę choroby oraz niejednoznaczność objawową, testy genetyczne mogłyby przyczynić się do usprawnienia prawidłowej diagnozy CA (3, 11).

Podsumowanie

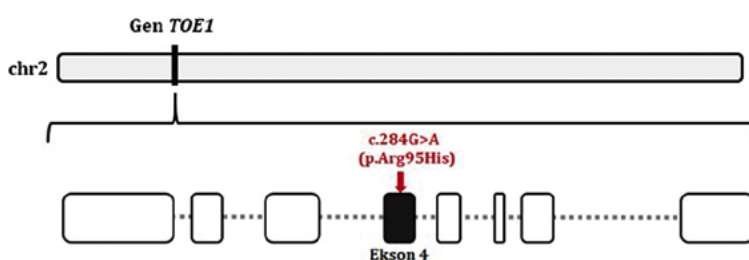
Choroby genetyczne zwierząt stanowią duży problem dla hodowców. Fakt, że w znacznej przewadze są one warunkowane allelami recesywnymi, wpływa na rozprzestrzenianie się tych chorób w hodowli. Ponadto nosicielami mutacji są często osobniki o wysokiej wartości hodowlanej – prezentujące cechy produkcyjne, pożądane w obrębie danego gatunku i kierunku użytkowania, wykorzystywane masowo do rozrodu.

Dokładne poznanie podłoża molekularnego chorób genetycznych umożliwia opracowanie testów opartych na badaniu DNA, identyfikujących genotypy poszczególnych osobników. Stanowią one doskonałe uzupełnienie badań weterynaryjnych, a w przypadku heterogennych objawów, uniemożliwiających rozpoznanie choroby, są jedynym skutecznym narzędziem diagnostycznym. Występowanie chorób dziedzicznych w sposób autosomalno-recesywny stanowi szczególne utrudnienie dla hodowców ze względu na ryzyko rozprzestrzenienia się mutacji poprzez nosicielstwo w określonych liniach hodowlanych, co znacznie obniża ich wartość hodowlaną. Kontrola kolarzeń za pomocą identyfikacji mutacji w DNA daje możliwość eliminacji choroby z linii hodowlanych. Diagnostyka genetyczna jest również kluczowa w przypadku chorób dziedzicznych w sposób dominujący, charakteryzujących się niespecyficznymi i heterogennymi objawami, gdzie zwierzę może nie wykazywać wyraźnych objawów nawet przez całe życie. Testy genetyczne stanowią obecnie najskuteczniejszy sposób diagnostyki, który daje jednoznaczny wynik, niezależnie od wieku zwierzęcia i stadium choroby.

Projekt współfinansowany ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego. Dotacje na innowacje – Inwestujemy w Waszą przyszłość.

Piśmiennictwo

1. Brosnahan M.M., Brooks S.A., Antczak D.F.: Equine clinical genomics: A clinician's primer. *Equine Vet. J.* 2010, **42**, 658–670.
2. Wojtulewicz P., Gruszczynska J., Siewruk K.: Hiperkaliemiczne porażenie okresowe u koni. *Życie Wet.* 2011, **86**, 196–201.



Ryc. 3. Schemat przedstawiający lokalizację genu *TOE1* oraz miejsce zmiany c.284G>A. Przerwane linie pomiędzy eksonami odzwierciodwiają introny. Opracowanie własne na podstawie bazy Ensembl oraz Brault i wsp. 2011

3. Ząbek T., Bugno-Poniewierska M., Gurgul A.: Defekty genów u koni czystej krwi arabskiej – problemy hodowli. *Rocz. Nauk Zootech.* 2013, **40**, 127–132.
4. Lengele J.P., Belge H., Devuyst O.: Periodic paralyses: when channels go wrong. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2007, **23**, 1098–1101.
5. Ensembl Database release 92, <http://www.ensembl.org/index.html>, aktualizacja: 01.2018.
6. UniProt Database, <https://www.uniprot.org/>, aktualizacja: 01.2018.
7. Naylor J.M.: Equine hyperkalemic periodic paralysis: Review and implications. *Can. Vet. J.* 1994, **35**, 279–285.
8. Annandale E.J., Valberg S.J., Mickelson J.R., Seaquist E.R.: Insulin sensitivity and skeletal muscle glucose transport in horses with equine polysaccharide storage myopathy. *Neuromuscul. Disord.* 2004, **13**, 666–674.
9. Mccue M.E., Valberg S.J., Jackson M., Borgia L., Lucio M., Mickelson J.R.: Polysaccharide storage myopathy phenotype in quarter horse-related breeds is modified by the presence of an *RYR1* mutation. *Neuromuscul. Disord.* 2009, **19**, 37–43.
10. Scott E.Y., Penedo M.C.T., Murray J.D., Finno C.J.: Defining trends in global gene expression in Arabian horses with cerebellar abiotrophy. *The Cerebellum.* 2017, **16**, 462–472.
11. Brault L.S., Famula T.R., Penedo M.C.T.: Inheritance of cerebellar abiotrophy in Arabians. *Am. J. Vet. Res.* 2011, **72**, 940–944.
12. Brault L.S., Cooper C.A., Famula T.R., Murray J.D., Penedo M.C.T.: Mapping of equine cerebellar abiotrophy to ECA2 and identification of a potential causative mutation affecting expression of *MUTYH*. *Genomics* 2011, **97**, 121–129.

Mgr Angelika Andrzejewska,
e-mail: angelika.andrzejewska888@gmail.com