

Diagnostyka molekularna wybranych letalnych wad genetycznych 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

Występowanie u zwierząt hodowlanych chorób objawiających się ciężkimi zaburzeniami morfologicznymi lub upośledzeniem różnych funkcji organizmu niewątpliwie obniża ich wartość hodowlaną. Etiologia niektórych takich chorób związana jest ze zmianami w materiale genetycznym. Są to najczęściej mutacje regionów kodujących lub regulatorowych kluczowych genów, co może zasadniczo zaburzać funkcjonowanie całego organizmu. Nawet pojedyncza zmiana w sekwencji DNA, poprzez wpływ na ekspresję genu, może znacząco, a nawet całkowicie hamować wytwarzanie funkcjonalnego białka. Szczególnie niebezpieczeństwo niosą mutacje dziedziczone recesywnie, które są przekazywane następnym pokoleniom w genotypie zwierząt będących ich nosicielami. Fenotyp heterozygotycznego nosiciela choroby często nie różni się od fenotypu zdrowych zwierząt. Identyfikacja mutacji leżących u podłoża chorób genetycznych może umożliwić zwiększenie skuteczności ich diagnostyki oraz zmniejszyć ryzyko ich rozprzestrzeniania w hodowli. Postęp z zakresu biologii molekularnej pozwala na poznanie etiologii kolejnych chorób. Testy genetyczne są coraz częściej wykorzystywanym narzędziem. Ich zaletą jest przede wszystkim jednoznaczna diagnoza, niezależnie od wieku i stadium choroby, co niezaprzeczalnie ułatwia wprowadzenie skutecznej opieki weterynaryjnej.

Do ciężkich chorób letalnych koni spowodowanych zmianami dziedzicznymi należą m.in. zespół białego źrebięcia overo (overo lethal white syndrome, OLWS) i zespół lawendowego źrebięcia (lavender foal syndrome, LFS), związane z umaszczeniem koni. Inną chorobą genetyczną koni, prowadzącą do szybkiej śmierci, jest pęcherzowe oddzielanie się naskórka typu łączącego (*epidermolysis bullosa junctionalis*, EBJ).

Zespół białego źrebięcia overo

Różne umaszczenie sierści zwierząt związane jest z mutacjami w genach zaangażowanych w funkcjonowanie melanocytów. Zidentyfikowano dwa główne geny, biorące udział w determinowaniu koloru umaszczenia u koni – *MC1R* (melanocortin 1 receptor gene) i *ASIP* (agouti signaling protein gene). Wykazano, że wzór umaszczenia jest kontrolowany przez geny biorące udział w migracji, proliferacji i przeżyciu komórek prekursorowych melanocytów (melanoblastów). Należą do nich gen receptorowej kinazy tyrozynowej (*KIT*) i gen receptora endoteliny typu B (*EDNRB*). Mają na to również wpływ mutacje w genach bezpośrednio odpowiedzialnych za przeżywalność melanocytów, takich jak gen *STX17* (syntaxin 17 gene; 1, 2).

Molecular diagnostics of selected lethal genetic defects in horses

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

Lethal genetic defects in horses, manifested by severe morphological disorders and impairment of various body functions, significantly reduce the value of horse breeding. Foals affected by these disorders die in a short time after birth. An important aspect is therefore an effective diagnosis to prevent crossbreeding of carriers. Introduction to veterinary genetic tests allows detection and elimination of most genetic defects from breeding lines. This paper presents a description of selected lethal genetic diseases in horses that are related to the coat color like overo lethal white syndrome and lavender foal syndrome or that are directly related to the epidermis like junctional epidermolysis bullosa. They are associated with mutations in *EDNRB*, *MYO5A*, *LAMC2* (or *LAMA3*) genes, respectively. Understanding the molecular basis of the above mentioned diseases contributes to the better development of DNA tests, which makes it possible to perform fast diagnosis and thus to implement effective veterinary care.

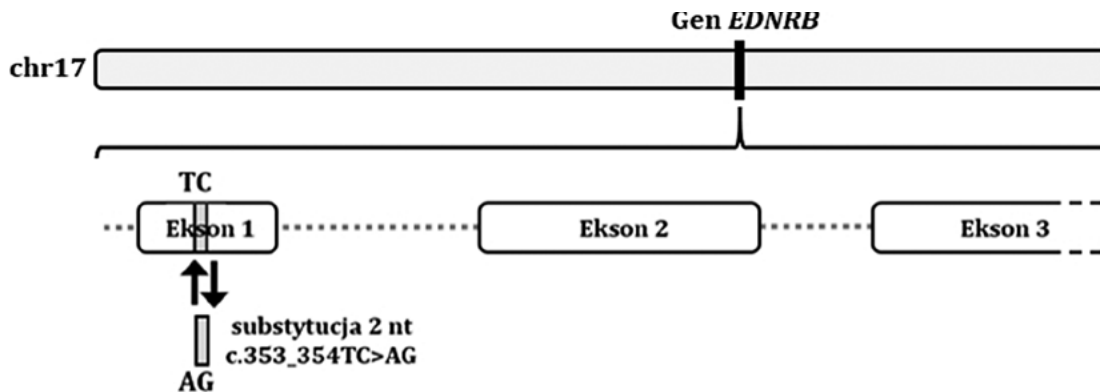
Keywords: lethal genetic disorders, horses, molecular diagnostic tests.

Umaszczenie typu overo (srokate) występuje w postaci białych plam lub jednolicie białego zabarwienia. Srokaty typ umaszczenia może przyjmować różne wzory nazywane odpowiednio: plamiste białe, sabino lub frame overo (2). Do rodzenia się źrebiąt z OLWS dochodzi głównie w wyniku kojarzenia koni rasy paint horse o umaszczeniu typu overo (3).

Zespół białego źrebięcia to dziedziczny letalny zespół chorobowy. Dotknięte nim źrebięta rodzą się prawie całkowicie białe (1). U większości źrebiąt z OLWS występuje zwyrodnienie mięśni i zaburzenia unerwienia jelit, co w konsekwencji prowadzi do ich niedrożności. Często obserwowana jest także depigmentacja tęczówki (4). Podobne objawy występują także u myszy i szczurów laboratoryjnych, a także w chorobie Hirschsprungu u człowieka (2).

OLWS powiązано z mutacją c.353_354TC>AG (g.50624658) w 1. eksonie genu *EDNRB* (endothelin receptor B gene). Gen *EDNRB* zlokalizowany jest w chromosomie 17. koni (ECA17). Możliwy jest jeden wariant splicingu tego genu. *EDNRB* koduje białko receptorowe typu B endoteliny o długości 458 aminokwasów (masa cz. 51275 Da). Mutacja powoduje zamianę aminokwasu izoleucyny na lizynę (p.I118K) w sekwencji pierwszej domeny transmembranowej receptora. Substytucja ta zaburza funkcjonalność produkowanego białka. Szlak endoteliny pełni rolę w rozwoju i migracji komórek grzebienia nerwowego, które w późniejszym etapie tworzą melanocyty i neurony jelitowe (1, 3, 5, 6). Białe

Ryc. 1. Schemat przedstawiający lokalizację genu *EDNRB* oraz zmiany c.353_354TC>AG. Przerwane linie pomiędzy eksonami odwzorowują introny. Opracowanie własne na podstawie bazy Ensembl oraz Bellone, 2010



umaszczenie źrebiąt z OLWS spowodowane jest zatem brakiem melanocytów w skórze. Zaburzona funkcjonalność szlaku endoteliny skutkuje także brakiem neuronów jelitowych, a w efekcie niedrożnością jelit (4). Lokalizację chromosomową omawianego genu oraz schemat zmiany przedstawiono na **rycinie 1**.

Zespół białego źrebięcia dziedziczony jest w trybie autosomalno-recesywnym. Zarówno homozygoty dominujące, o jednolitym umaszczeniu, jak i heterozygotyczne osobniki srokate nie wykazują objawów chorobowych. Źrebięta homozygotyczne pod względem zmutowanego allelu rodzą się białe i umierają już w kilka dni po urodzeniu (2). Do tej pory nie opracowano leczenia zespołu OLWS, który we wszystkich przypadkach jest chorobą letalną. Przyczyną śmierci jest głównie niedrożność jelit. Źrebięta umierają samoistnie bądź poddawane są eutanazji (4).

Jednoznaczne określenie genotypu wymaga przeprowadzenia testu genetycznego. Opracowanie testu identyfikującego predyspozycje genetyczne do zespołu białego źrebięcia umożliwia bezpieczny dobór osobników do kojarzeń.

Zespół lawendowego źrebięcia

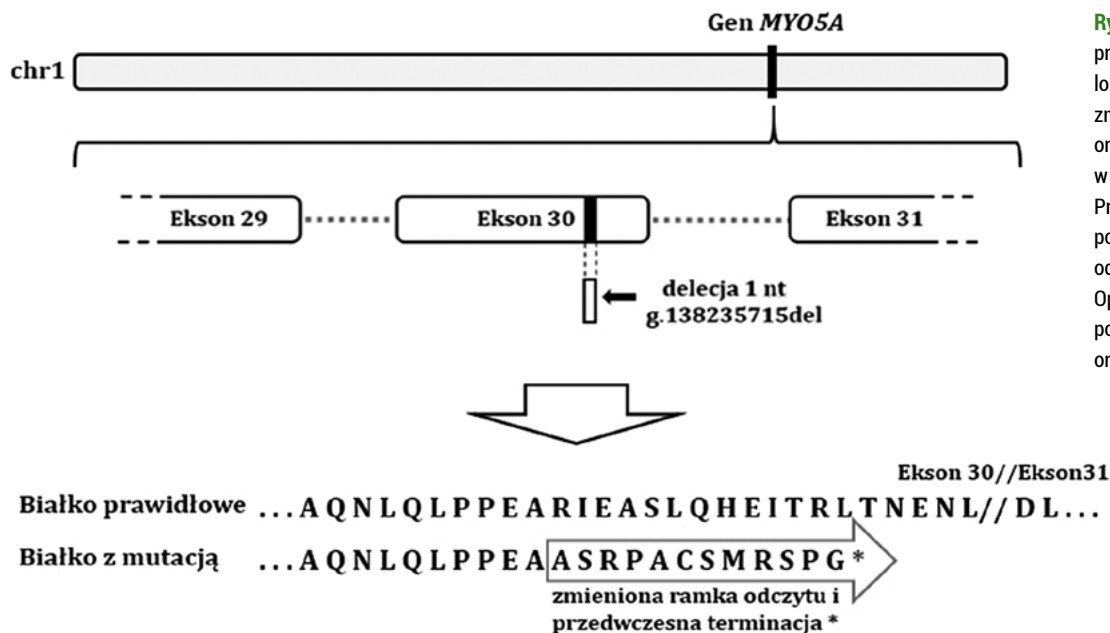
Zespół lawendowego źrebięcia (LFS), zwany inaczej letalnym rozjaśnieniem umaszczenia (coat colour dilution lethal, CCDL), również należy do letalnych dziedzicznych zespołów, związanych z efektem plejotropowym mutacji zlokalizowanych w genach odpowiadających za pigmentację. Choroba związana jest ze zmianami neurologicznymi, które uniemożliwiają życie nowo narodzonemu zwierzęciu. U chorych koni występuje rozjaśniony kasztanowaty odcień sierści, często przypominający odcień lawendy, stąd nazwa choroby. Wkrótce po urodzeniu pojawiają się mimowolne skurcze mięśni, ruchy gałek ocznych oraz nadpobudliwość głowy i szyi. Zwierzę wykonuje również niekontrolowane ruchy kończynami. Te zaburzenia powodują ból i całkowicie uniemożliwiają źrebięciu utrzymanie postawy stojącej, co utrudnia karmienie. Dalszy rozwój LFS doprowadza do śmierci zwierzęcia lub decyzji o eutanazji. Na podstawie dostępnych danych można sądzić, że choroba występuje jedynie u egipskich koni rasy arabskiej (1, 2). Po raz pierwszy zespół ten został opisany przez Bowlinga (7) jako źrebięta o jasnym umaszczeniu, które zmarły od razu po urodzeniu.

Badania genu *MYO5A* (myosin VA gene), zlokalizowanego w chromosomie 1 konia (ECA1), wskazały na jego

związek z występowaniem zespołu lawendowego źrebięcia. *MYO5A* składa się z 43 eksonów i liczy 186729 pz. Gen koduje miozynę Va, ulega alternatywnemu składowaniu, w wyniku czego powstają trzy warianty transkryptów. Pierwszy z nich ma długość 5538 pz (białko: 1845 aa; masa cz. 214392 Da), drugi liczy 5532 pz (białko: 1843 aa; masa cz. 214505 Da), natomiast trzeci obejmuje 5529 pz (białko: 1842 aa; masa cz. 214034 Da). Funkcjonalne białko jest częścią kompleksu transportowego, który bierze udział w przenoszeniu melanosomów (organeli melanocytów, zawierających melaninę) do obrzeży komórki (dendrytów) w celu przeniesienia do keratynocytów, czyli żywych komórek naskórka (6, 8, 9, 10, 11).

Genetycznym podłożem LFS jest jednonukleotydomowa delecja g.138235715del w 30. eksonie genu *MYO5A*. Wskutek tej zmiany w obrębie genu dochodzi do przesunięcia otwartej ramki odczytu, co skutkuje wystąpieniem w sekwencji aminokwasowej przedwczesnego kodonu STOP (12 aminokwasów po mutacji). Ma to miejsce w wysoce konserwatywnym regionie genu. W białku zmiana zlokalizowana jest w tzw. domenie DIL, która jest miejscem wiązania różnych składników komórkowych i bierze udział w ich transporcie wokół komórki. Gdy w konsekwencji zmiany powstaje białko, skrócone o 379 aminokwasów na C-końcu, nie jest ono w stanie prawidłowo wiązać ładunku do wewnątrzkomórkowego transportu. Ten kompleks transportowy, z udziałem miozyny Va, odpowiada również za poruszanie różnymi ładunkami (tj. mRNA, receptory glutaminianu, granulki wydzielnicze) w dendrytach neuronu. Zakłócenia w tym obszarze, w związku z opisaną mutacją, są bezpośrednią przyczyną letalnych defektów układu nerwowego u zwierząt dotkniętych LFS. Taki efekt plejotropowy może występować z uwagi na wspólne pochodzenie komórek melanocytów i m.in. kilku rodzajów neuronów, które powstają z embrionalnych komórek macierzystych pochodzących z grzebienia nerwowego. Zespół dziedziczony jest w trybie autosomalno-recesywnym, co oznacza, że jedynie homozygoty recesywne, posiadające dwa allele z mutacją, będą wykazywały neurologiczne objawy choroby, prowadzące do śmierci (1, 10, 11). Schemat analizowanego genu, jak i produktu białkowego wraz z uwzględnieniem zmiany został przedstawiony na **rycinie 2**.

Dotychczas nie opracowano skutecznego leczenia LFS. Ze względu na złożoność objawów neurologicznych zespół ten jest trudny w diagnostyce i może być mylony z innymi chorobami wieku neonatalnego. Jednakże testy genetyczne pod kątem mutacji genu *MYO5A*



Ryc. 2. Schemat przedstawiający lokalizację genu *MYO5A*, zmiany g.138235715del oraz charakter zmiany w produkcie białkowym. Przerwane linie pomiędzy eksonami odwzorowują introny. Opracowanie własne na podstawie bazy Ensembl oraz Brooks i wsp., 2010

mogą pozwolić na skuteczną identyfikację nosicieli tych zaburzeń i tym samym ograniczyć ich kojarzenie (10).

Pęcherzowe oddzielanie się naskórka typu łączącego (EBJ)

Jest to dziedziczna choroba skóry, która występuje u zwierząt hodowlanych, w tym owiec, bydła, koni i psów, jak również u ludzi. U koni objawia się powstawaniem licznych pęcherzy w obrębie skóry oraz oddzielaniem się naskórka. Jest to konsekwencją niedostatecznej syntezy strukturalnych składników połączeń międzykomórkowych. Pęcherze łatwo pękają, pozostawiając na skórze oraz błonach śluzowych rozległe nadżerki, wokół których powstają wysięki i strupy. Często tworzą się one w obrębie jamy ustnej, uniemożliwiając żrebięciu ssanie. Innym objawem może być również dysplazja zębów, czyli zaburzenie ich rozwoju. Przychodzące na świat żrebięta często posiadają już uszkodzenia skóry lub pojawiają się one w ciągu dwóch pierwszych dni życia. W wyniku rozległych zmian dochodzi do utraty białka surowicy, a nawet sepsy. Konie dotknięte EBJ, ze względu na zakażenia, najczęściej się usypia (12, 13, 14, 15).

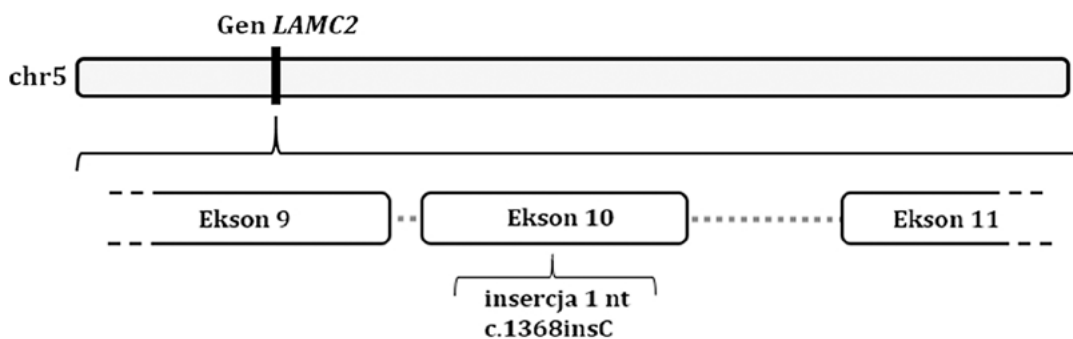
EBJ dziedziczy się jako cecha autosomalna recesywna. Wykazano, że mutacje sprawcze dla EBJ zlokalizowane są w jednym z trzech genów – *LAMA3*, *LAMB3*, *LAMC2*. Kodują one odpowiednio łańcuch $\alpha 3$, $\beta 3$ i $\gamma 2$ – podjednostki polipeptydowe, budujące heterotrimeryczne białko błonowe – lamininę 332. Białko to jest wydzielane

przez keratynocyty i bierze udział m.in. w adhezji komórkowej. W szczególności jest ono związane z filamentami stabilizującymi połączenia skórno-naskórkowe. W genach tych zidentyfikowano dwie mutacje związane z inicjacją EBJ u koni, w zależności od ich rasy (13, 16).

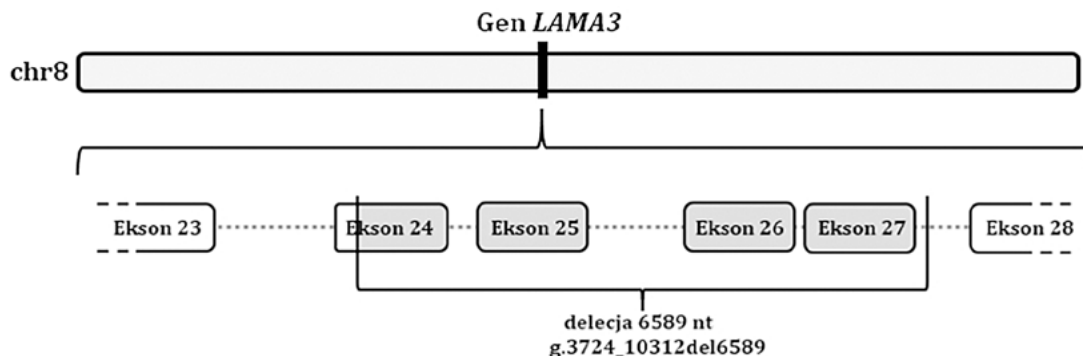
W 2002 r. zaobserwowano, że zmiana c.1368insC jest związana z występowaniem EBJ u belgijskich koni pociągowych. Powyższa insercja cytozyny występuje w 10. eksonie genu *LAMC2* (laminin subunit gamma 2 gene), który liczy 51499 pz i leży w chromosomie 5. konia (ECA5). Gen koduje podjednostkę $\gamma 2$ lamininy 332, która składa się z 1190 aminokwasów (masa cz. 13084,6 Da). Konsekwencją mutacji jest przesunięcie ramki odczytu podczas translacji, wskutek czego pojawia się przedwczesny kodon STOP. Produktem jest wówczas skrócona postać łańcucha lamininy 332, co znacznie ogranicza jej adhezyjne właściwości i przyczynia się do defektów naskórka. Istotne powiązanie tej zmiany z EBJ zauważono również wśród włoskich koni pociągowych, koni bretońskich i rasy comtois (6, 8, 9, 12, 16, 17). Schemat lokalizacji genu *LAMC2* i charakter zmiany zostały przedstawione na **rycinie 3**.

Badania koni rasy american saddlebred wskazały inną mutację, g.3724_10312del6589, jako silnie związaną z inicjacją EBJ. Zmiana występuje w obrębie genu *LAMA3* (laminin subunit alpha 3 gene), który zlokalizowany jest w chromosomie 8. koni (ECA8) i obejmuje 76988 pz. Produkt białkowy tego genu, podjednostka $\alpha 3$ lamininy 332, składa się z 1732 aa (masa cz. 191602 Da).

Ryc. 3. Schemat przedstawiający lokalizację genu *LAMC2* oraz zmiany c.1368insC. Przerwane linie pomiędzy eksonami odwzorowują introny. Opracowanie własne na podstawie bazy Ensembl oraz Milenkovic i wsp., 2003



Ryc. 4. Schemat przedstawiający lokalizację genu *LAMA3* oraz zmiany g.3724_10312del6589. Przerwane linie pomiędzy eksonami odwzorowują introny. Opracowanie własne na podstawie bazy Ensembl oraz Graves i wsp., 2009



Podjednostka $\alpha 3$ znajduje się głównie w tkance nabłonkowej i odpowiada częściowo za stabilizację lamininy 332. Zidentyfikowana delecja usuwa prawie w całości cztery eksony (tj. 24, 25, 26 i 27), powodując tym samym skrócenie białka o 169 aminokwasów w miejscu domen, zawierających miejsca dla wiązania integryn (białek adhezyjnych). Skutkiem tego jest pogorszenie właściwości adhezyjnych cząsteczki lamininy 332, co jest przyczyną rozszczepienia naskórka w obrębie błony podstawnej (6, 8, 9, 13). Lokalizację chromosomową omawianego genu oraz schemat zmiany przedstawiono na **rycinie 4**.

Obecnie EBJ jest uznawane za chorobę śmiertelną i nie opracowano skutecznego leczenia. Rozpatruje się możliwość przeszczepiania skóry. Dużym utrudnieniem w diagnostyce choroby jest fakt, że charakteryzuje się ona bezobjawowym nosicielstwem. Oznacza to, że jedynie osobniki posiadające dwa allele z mutacją będą wykazywać objawy choroby. Stanowi to duże zagrożenie dla rozprzestrzenienia się choroby w populacji. Ważnym aspektem jest zatem skuteczna diagnostyka koni pod kątem EBJ z użyciem testów genetycznych, aby zapobiec kojarzeniu nosicieli defektu (13).

Podsumowanie

Choroby genetyczne zwierząt stanowią poważny problem dla hodowców. Określenie mutacji sprawczej i sposobu dziedziczenia pozwala na opracowanie i wprowadzenie testów genetycznych umożliwiających diagnostykę badanych chorób u zwierząt hodowlanych. Wprowadzenie diagnostyki chorób zwierząt hodowlanych za pomocą badań DNA coraz częściej pozwala na bezpieczne kojarzenie osobników. Testy genetyczne umożliwiają identyfikację nosicieli alleli ryzyka w przypadku bezobjawowego dziedziczenia w trybie autosomalno-recesywnym. Odróżnienie osobników zdrowych od nosicieli może pozwolić na uniknięcie kojarzeń obciążonych ryzykiem. Ponadto stopniowe wykluczanie nosicieli z kojarzeń umożliwi w efekcie całkowite usunięcie zmutowanego allelu z linii hodowlanych. Diagnostyka genetyczna jest również kluczowa w przypadku chorób dziedzicznych w sposób dominujący, charakteryzujących się niespecyficznymi i heterogennymi objawami. Eliminacja narodzin chorych osobników jest istotna zwłaszcza w przypadku letalnych wad genetycznych. Ze względu na dobrostan zwierząt obowiązkiem hodowców jest zmniejszenie ryzyka tego zjawiska.

W artykule przedstawiono jedynie wybrane ze scharakteryzowanych do tej pory letalnych defektów

genetycznych koni. U wielu z nich nadal poszukuje się podłoża molekularnego. Identyfikacja mutacji sprawczych dla poszczególnych chorób daje możliwość opracowania testów genetycznych. Diagnostyka genetyczna może być z powodzeniem traktowana jako uzupełnienie bądź alternatywa dla diagnostyki klinicznej.

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

Piśmiennictwo

- Bellone R.R.: Pleiotropic effects of pigmentation genes in horses. *Anim. Genet.* 2010, **41**, 100–110.
- Lipka K.R., Charon K.M.: Dziedziczne zaburzenia u koni związane z umaszczeniem. *Życie Wet.* 2015, **90**, 364–368.
- Vrotsos P.D., Santschi E.M., Acvs D.: The impact of the mutation causing overo lethal white syndrome on white patterning in horses. *AAEP Proceedings.* 2001, **47**, 385–391.
- Ayala-Valdovinos M.A., Galindo-García J., Sánchez-Chiprés D., Duifhuis-Rivera T.: New test for endothelin receptor type B (EDNRB) mutation genotyping in horses. *Mol. Cell. Probes.* 2016, **30**, 182–184.
- Online Mendelian Inheritance in Animals: OMIA, <http://omia.org/home/> (aktualizacja: 03.2018).
- Ensembl Database (release 92), <http://www.ensembl.org/index.html> (aktualizacja: 03.2018).
- Bowling A.T.: *Horse Genetics.* CAB International. 1996.
- The National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp> (aktualizacja: 03.2018).
- UniProt Database, <https://www.uniprot.org/> (aktualizacja: 03.2018).
- Brooks S.A., Gabreski N., Miller D., Brisbin A., Brown H.E., Streeter C., Mezey J., Cook D., Antczak D.F.: Whole-genome SNP association in the horse: identification of a deletion in myosin Va responsible for Lavender Foal Syndrome. *PLoS Genet.* 2010, **6**.
- Desnos C., Huet E., Darchen F.O.: „Should I stay or should I go?": myosin V function in organelle trafficking. *Biol. Cell.* 2007, **99**, 411–423.
- Cappelli K., Brachelente C., Passamonti F., Flati A., Silvestrelli M., Capomaccio S.: Carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in dogs – a longitudinal study. *BMC Vet. Res.* 2012, **23**, 34.
- Graves K.T., Henney P.J., Ennis R.B.: Partial deletion of the *LAMA3* gene is responsible for hereditary junctional epidermolysis bullosa in the American Saddlebred Horse. *Anim. Genet.* 2009, **40**, 35–41.
- Medeiros G.X., Riet-Correa F., Armien A.G., Dantas A.F.M., de Galiza G.J.N., Simões S.V.D.: Junctional epidermolysis bullosa in a calf. *J. Vet. Diagnostic Invest.* 2012, **24**, 231–234.
- Capt A., Spirito F., Guaguere E., Spadafora A., Ortonne J. P., Mene-guzzi G.: Inherited junctional epidermolysis bullosa in the german pointer: establishment of a large animal model. *J. Invest. Dermatol.* 2005, **124**, 530–535.
- Spirito F., Charlesworth A., Linder K., Ortonne J.P., Baird J., Mene-guzzi G.: Animal models for skin blistering conditions: absence of laminin 5 causes hereditary junctional mechanobullous disease in the Belgian Horse. *J. Invest. Dermatol.* 2002, **119**, 684–691.
- Milenkovic D., Chaffaux S., Taourit S., Guérin G.: A mutation in the *LAMC2* gene causes the Herlitz junctional epidermolysis bullosa (H-JEB) in two French draft horse breeds. *Genet. Sel. Evol.* 2003, **35**, 249–256.

Mgr Angelika Andrzejewska,

e-mail: angelika.andrzejewska888@gmail.com