

Polimorfizm genu białka prionowego *PrP* u wrzosówki polskiej i owcy żelaźnieńskiej utrzymywanych w stadzie Doświadczalnej Fermy Owiec i Kóz SGGW w Żelaznej*

Roman Niżnikowski, Grzegorz Czub, Marcin Świątek,
Krzysztof Głowacz, Magdalena Ślęzak

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Wydział Nauk o Zwierzętach,
Zakład Hodowli Owiec i Kóz,
ul. Ciszewskiego 8, 02-787 Warszawa

Badaniami objęto stado podstawowe matek i tryków rasy wrzosówka polska i owca żelaźnieńska, utrzymywanych w Doświadczalnej Fermie Owiec i Kóz im. Prof. A. Skoczyłasa w Żelaznej w latach 2009-2011. Zbadano 538 matek stada podstawowego i 29 tryków rozplodowych wrzosówki polskiej oraz 293 matki stadne i 18 tryków rozplodowych owcy żelaźnieńskiej. Wszystkie zwierzęta poddane były ocenie występowania mutacji genu białka prionowego *PrP*. Na podstawie przeprowadzonych prac badawczych stwierdzono mniejsze zróżnicowanie genetyczne w zakresie występowania alleli i genotypów białka prionowego u tryków rozplodowych (3 genotypy i 3 allele u wrzosówki polskiej oraz 2 genotypy i 2 allele u owcy żelaźnieńskiej) aniżeli u matek stada podstawowego (6 genotypów i 3 allele u wrzosówki polskiej oraz 5 genotypów i 3 allele u owcy żelaźnieńskiej). W ostatnim roku badań u obu ras w grupie tryków rozplodowych występowały już tylko osobniki o genotypie ARR/ARR. Stwierdzono nieistotny wpływ roku obserwacji na frekwencję występowania alleli i genotypów białka prionowego u matek stadnych i tryków rozplodowych, z wyjątkiem istotnego oddziaływania stwierdzonego jedynie u tryków rozplodowych rasy wrzosówka polska.

SŁOWA KLUCZOWE: owce / *PrP* / frekwencja alleli i genotypów

Trzęsawka (ang. scrapie), podobnie jak BSE u krów i choroba Creutzfeldt'a-Jakob'a u ludzi, jest naturalnie pojawiającą się formą pasażowalnej encefalopatii gąbczastej (ang. TSE). Z kolei białko prionowe (*PrP*) jest odpowiedzialne za występowanie trzęsawki u owiec. W genie *PrP*, który jest odpowiedzialny za (genetyczną) oporność lub wrażliwość na trzęsawkę [1, 3, 5, 9] zaobserwowano szereg polimorfizmów w kodonach 136, 154 i 171. Ponadto wykazano, że allel ARR gwarantuje najmniejszą wrażliwość na trzęsawkę.

*Praca wykonana w ramach projektu nr N N311 257036

W badaniach prowadzonych w Wielkiej Brytanii i Holandii stwierdzono, że zwierzęta – nosiciele allelu VRQ, w bardzo dużym stopniu są wrażliwe na tę jednostkę chorobową, natomiast allel ARR występował najrzadziej u owiec, u których stwierdzono jej kliniczne objawy. Zwiększenie frekwencji tego allelu uznawane jest za podstawowe narzędzie eliminowania i kontroli trzęsawki u owiec [2, 3, 11]. Nie dziwi więc, że określanie alleli białka prionowego *PrP* zostało zawarte w aktach prawnych Unii Europejskiej i rozporządzeniach krajowych [6, 7, 8].

Celem niniejszej pracy było określenie frekwencji alleli i genotypów białka prionowego u zwierząt pochodzących ze stad zarodowych owiec rasy wrzosówka polska i owca żelaznieńska, utrzymywanych w latach 2009-2011. Obie rasy objęte były programem ochrony zasobów genetycznych.

Material i metody

Badaniami objęto stado macierek i tryków dwóch ras: wrzosówka polska i owca żelaznieńska, utrzymywanych w Doświadczalnej Fermie Owiec i Kóz im. Prof. A. Skoczylasa w Żelaznej. W przypadku wrzosówki polskiej oceniano 538 matek stada podstawowego i 29 tryków rozplodowych, natomiast u owcy żelaznieńskiej – 293 matki stadne i 18 tryków rozplodowych.

DNA izolowano z leukocytów. W celu otrzymania wysokiej jakości DNA, nadającego się po zamrożeniu i rozmrożeniu do wielokrotnego użycia, krew została wstępnie oczyszczona z powodujących modyfikacje w DNA związków hemu przez usunięcie produktów lizy erytrocytów. Określanie alleli białka prionowego prowadzono systemem KASPar®, metodą polimorfizmu punktowego SNP (tab. 1).

Tabela 1 – Table 1

Startery oraz miejsca SNP dla *locus* białka prionowego

Primers and SNP sites of the prion protein locus

Kodon Codon	Startery 3'-5' Primers 3'-5'	SNP	Zmiany Changes	Lokalizacja Localization
171	CACAGTCAGTGGAACAAGCC/ CTTTGCCAGGTTGGGG	AY909542:g.385A>G	A/G	exon 3
171		AY909542:g.386G>T	G/T	exon 3
136		AY909542:g.479C>T;	C/T	exon 3
154		AY909542:g.534G>A	G/A	exon 3

Na podstawie odczytu genotypowanych prób DNA w obrębie ras u matek stada podstawowego i tryków rozplodowych przedstawione zostały frekwencje alleli i genotypów białka prionowego. Do obliczeń statystycznych wykorzystano pakiet statystyczny SPSS wersja 21.0 [10]. Za pomocą testu χ^2 oceniono wyliczone frekwencje alleli i genotypów białka prionowego w obrębie rasy i płci. Liczba stopni swobody (df) została w poszczególnych analizach obliczona według wzoru [(liczba lat – 1) x (liczba genotypów lub alleli – 1)].

Wyniki i dyskusja

Porównanie frekwencji genotypów i alleli białka prionowego w stadach wrzosówki polskiej i owcy żelaźnieńskiej przedstawiono w tabelach 2-9.

Wrzosówka polska

Wyniki badań wykonanych w stadzie podstawowym matek w latach 2009-2011 przedstawiono w tabeli 2. Znalaziono sześć genotypów białka prionowego. Trzy z nich zawierały allel ARR i łącznie miały zdecydowanie największy udział w całym stadzie. Frekwencja najcenniejszego genotypu ARR/ARR wynosiła od 16,0% do 20,1%. Mimo braku wpływu roku na frekwencje genotypów, można zauważyć tendencje do zwiększania się frekwencji genotypów zawierających allel ARR. Układ frekwencji zbliżony był do wykazanych w badaniach Gombojav i wsp. [1], wykonanych na rasach prymitywnych. Natomiast w odniesieniu do frekwencji genotypu ARR/ARR, obserwowano jej wyższy poziom aniżeli wykazany w badaniach przeprowadzonych w stadzie wrzosówki polskiej przez Niżnikowskiego i wsp. [4].

Tabela 2 – Table 2

Frekwencja genotypów białka prionowego u matek stada podstawowego rasy wrzosówka polska w latach 2009-2011

Frequency of prion protein genotypes in foundation stock ewes of Polish Heath Sheep in 2009-2011

Frekwencja (%) Frequency (%)	Rok badań Year of study			n
	2009	2010	2011	
n	175	185	178	538
Genotyp Genotype				
ARR/ARR	16,00	16,80	20,10	95
ARR/ARQ	40,60	46,50	48,30	243
ARR/AHQ	17,10	15,10	15,20	85
ARQ/ARQ	16,00	14,10	10,70	73
ARQ/AHQ	9,70	7,00	5,60	40
AHQ/AHQ	0,60	0,50	0,00	2

$\chi^2=7,538$; $df=10$, $p=0,674$

Analizę wyników wykonaną w odniesieniu do tryków stadnych przedstawiono w tabeli 3. Stwierdzono istotny wpływ roku badań na frekwencje poszczególnych genotypów, wskazując na preferowanie przy wyborze do stada osobników o genotypie ARR/ARR. W 2011 roku frekwencja tego genotypu wynosiła 100%, co doprowadziło od 2012 roku do uzyskiwania potomstwa posiadającego tylko ten allel.

Równocześnie przeprowadzono analogiczne porównania w zakresie frekwencji alleli białka prionowego u owiec stada podstawowego w trzech latach badań.

U matek stadnych stwierdzono występowanie tylko trzech alleli: ARR, ARQ i AHQ (tab. 4). Nie wykazano wpływu roku na frekwencję występowania alleli białka prionowego. Obserwowano jednak nieznaczny wzrost frekwencji allelu ARR, przy równoczesnym obniżaniu dwóch pozostałych.

Tabela 3 – Table 3

Frekwencja genotypów białka prionowego u tryków rozplodowych rasy wrzosówka polska w latach 2009-2011

Frequency of prion protein genotypes in stud rams of Polish Heath Sheep in 2009-2011

Frekwencja (%) Frequency (%)	Rok badań Year of study			n
	2009	2010	2011	
n	11	8	10	29
Genotyp Genotype				
ARR/ARR	45,50	87,50	100,00	22
ARR/ARQ	36,40	12,50	0,00	5
ARR/AHQ	18,20	0,00	0,00	2

 $\chi^2=9,686$; $df=4$, $p=0,046$ **Tabela 4 – Table 4**

Frekwencja alleli białka prionowego u matek stada podstawowego rasy wrzosówka polska w latach 2009-2011

Frequency of prion protein alleles in foundation stock ewes of Polish Heath Sheep in 2009-2011

Frekwencja (%) Frequency (%)	Rok badań Year of study			n
	2009	2010	2011	
n	350	370	356	1076
Allele Alleles				
ARR	44,90	47,60	52,00	518
ARQ	41,10	40,80	37,60	429
AHQ	14,00	11,60	10,40	129

 $\chi^2=0,097$; $df=4$, $p=0,999$

U tryków rozplodowych nastąpiło wyeliminowanie alleli ARQ i AHQ, i w roku 2011 występował już tylko jeden allel – ARR (tab. 5). Wykazanie braku występowania allelu VRQ jest bardzo korzystnym efektem prowadzonych badań. Eliminowanie ze stada zwierząt posiadających ten allel gwarantuje pozyskiwanie potomstwa opornego genetycznie na kliniczne formy trzęsawki.

Tabela 5 – Table 5

Frekwencja alleli białka prionowego u tryków rozplodowych rasy wrzosówka polska w latach 2009-2011

Frequency of prion protein alleles in stud rams of Polish Heath Sheep in 2009-2011

Frekwencja (%) Frequency (%)	Rok badań Year of study			n
	2009	2010	2011	
n	22	16	20	58
Allele Alleles				
ARR	72,70	93,80	100,00	51
ARQ	18,20	6,30	0,00	5
AHQ	9,10	0,00	0,00	2

 $\chi^2=8,405$; $df=4$, $p=0,078$

Podsumowując można stwierdzić, że nie wykazano wpływu roku obserwacji na frekwencję alleli i genotypów u obu grup stada wrzosówki polskiej, z wyjątkiem analizy dotyczącej oceny wpływu roku na frekwencję różnych genotypów u tryków stadnych. Tendencje wykazane u tryków rozplodowych potwierdzają wyniki badań innych autorów, wskazujących na możliwości prowadzenia skutecznej pracy hodowlanej w tym zakresie [2, 3, 9, 11].

Owca żelaźnieńska

Ocenę frekwencji genotypów białka prionowego u matek stadnych i tryków rozplodowych przedstawiono w tabelach 6. i 7. U matek stadnych stwierdzono występowanie pięciu genotypów, a u tryków rozplodowych – dwa. Za pozytywny u matek stadnych uważa się relatywnie wysoki udział genotypów zawierających allel ARR we wszystkich latach badań. Jest on znacznie wyższy niż stwierdzany w badaniach innych autorów, wykonywanych na owcach rodzimych nie selekcionowanych w tym kierunku [1, 3, 5, 9].

Tabela 6 – Table 6

Frekwencja genotypów białka prionowego u matek stada podstawowego owcy żelaźnieńskiej w latach 2009-2011

Frequency of prion protein genotypes in foundation stock ewes of Żelaźnieńska Sheep in 2009-2011

Frekwencja (%) Frequency (%)	Rok badań Year of study			n
	2009	2010	2011	
n	92	100	101	293
Genotyp Genotypes				
ARR/ARR	22,80	28,00	27,70	77
ARR/ARQ	46,70	51,00	52,50	147
ARR/AHQ	5,40	3,00	5,0	13
ARQ/ARQ	20,70	15,00	11,90	46
ARQ/AHQ	4,30	3,00	3,00	10

$\chi^2=4,429$; $df=8$, $p=0,817$

Znacznie mniejsze zróżnicowanie co do liczby genotypów wykazano u tryków rozplodowych (tab. 7). W roku 2011 występował już tylko genotyp ARR/ARR. Wylimitowano genotyp zawierający allel ARQ, który jest charakterystyczny dla owiec ras prymitywnych i muflona europejskiego [1, 4, 5].

Tabela 7 – Table 7

Frekwencja genotypów białka prionowego u tryków rozplodowych owcy żelaźnieńskiej w latach 2009-2011

Frequency of prion protein genotypes in stud rams of Żelaźnieńska Sheep in 2009-2011

Frekwencja (%) Frequency (%)	Rok badań Year of study			n
	2009	2010	2011	
n	7	6	5	18
Genotyp Genotypes				
ARR/ARR	42,90	66,70	100,00	12
ARR/ARQ	57,10	33,30	0,00	6

$\chi^2=4,286$; $df=2$, $p=0,117$

Ocenę frekwencji poszczególnych alleli białka prionowego u matek stadnych i tryków rozplodowych owcy żelaznieńskiej przedstawiono w tabelach 8. i 9. U matek stada podstawowego wykazano występowanie 3 alleli we wszystkich latach badań (tab. 8), natomiast u tryków rozplodowych w roku 2009 i 2010 znaleziono dwa, a w roku 2011 już tylko allel ARR (tab. 9). Obserwowany kierunek zmian, zarówno w stadzie matek stada podstawowego, jak i u tryków rozplodowych należy uznać za właściwy, ze względu na wzrost frekwencji allelu ARR – opornego genetycznie na trzęsawkę, co jest zgodne z wnioskami innych autorów [2, 3, 9, 11].

Tabela 8 – Table 8

Frekwencja alleli białka prionowego u matek stada podstawowego owcy żelaznieńskiej w latach 2009-2011
Frequency of prion protein alleles in foundation stock ewes of Żelaznieńska Sheep in 2009-2011

Frekwencja (%) Frequency (%)	Rok badań Year of study			n
	2009	2010	2011	
n	184	200	202	586
Allele Alleles				
ARR	48,90	55,00	56,40	314
ARQ	46,20	42,00	39,60	249
AHQ	4,90	3,00	4,00	23

$\chi^2=3,007$; $df=4$, $p=0,557$

Tabela 9 – Table 9

Frekwencja alleli białka prionowego u tryków rozplodowych owcy żelaznieńskiej w latach 2009-2011
Frequency of prion protein alleles in stud rams of Żelaznieńska Sheep in 2009-2011

Frekwencja (%) Frequency (%)	Rok badań Year of study			n
	2009	2010	2011	
n	14	12	10	36
Allele Alleles				
ARR	71,40	83,30	100,00	30
ARQ	28,60	16,70	0,00	6

$\chi^2=3,429$; $df=2$, $p=0,180$

Podsumowując można stwierdzić, że nie wykazano wpływu roku obserwacji na frekwencję alleli i genotypów białka prionowego u obu grup stada owcy żelaznieńskiej. Obserwowano mniejszą liczbę alleli i genotypów białka prionowego *PrP* u tryków rozplodowych aniżeli u matek stadnych. Uzyskane rezultaty są efektem pracy hodowlanej, zmierzającej do zwiększania frekwencji alleli i genotypów warunkujących genetyczną oporność na trzęsawkę. Tendencje wykazane u zwierząt dorosłych (matek stadnych i tryków rozplodowych) potwierdzają wskazywane przez innych autorów możliwości prowadzenia skutecznej pracy hodowlanej w tym zakresie [2, 3, 9, 11].

Na podstawie prac badawczych przeprowadzonych w DFOiK Żelazna, dotyczących frekwencji mutacji genu białka prionowego *PrP*, wykazano:

– mniejsze zróżnicowanie genetyczne w zakresie występowania alleli i genotypów białka prionowego u tryków rozplodowych (3 genotypy i 3 allele u wrzosówki polskiej oraz 2

genotypy i 2 allele u owcy żelaźnieńskiej) niż u matek stada podstawowego (6 genotypów i 3 allele u wrzosówki polskiej oraz 5 genotypów i 3 allele u owcy żelaźnieńskiej). W 2011 roku u obu ras w grupie tryków rozplodowych występowały już tylko osobniki o genotypie ARR/ARR.

– brak wpływu roku obserwacji na frekwencje alleli i genotypów białka prionowego w grupach matek stadnych i tryków rozplodowych. Istotne oddziaływanie w tym zakresie stwierdzono jedynie u tryków rozplodowych rasy wrzosówka polska, jednak niewielka liczba zwierząt objętych obserwacjami wymusza ostrożne wnioskowanie.

Wyniki uzyskane w odniesieniu do tryków rozplodowych wskazują na zasadność prowadzenia selekcji w kierunku poprawy frekwencji korzystnych alleli i genotypów białka prionowego PrP oraz potrzebę opracowania programu hodowlanego.

PIŚMIENNICTWO

1. GOMBOJAV A., ISHIGURO N., HORIUCHI M., SERMYADAG D., BYAMBAA B., SHINAGAWA M., 2003 – Amino Acid Polymorphisms of PrP Gene in Mongolian Sheep. *Journal of Veterinary Medical Science* 65 (1), 75-81.
2. KAAL L., WINDIG J., 2005 – Rare sheep breeds and breeding for scrapie resistance in the Netherlands. 56th Zjazd Naukowy Europejskiej Federacji Zootechnicznej (EAAP), 5-8 czerwca 2005, Uppsala, Szwecja, 11, 375.
3. LÜHKEN G., BUSCHMANN S., GROSCHUP M. H., ERHARDT G., 2004 – Prion protein allele A₁₃₆H₁₅₄Q₁₇₁ is associated with high susceptibility to scrapie in purebred and crossbred German Merinoland sheep. *Archives of Virology* 149, 1571-1580.
4. NIŻNIKOWSKI R., GŁOWACZ K., CZUB G., ŚLĘZAK M., ŚWIĄTEK M., 2013 – Polimorfizm genu białka prionowego PrP u krajowych owiec o wlnie mieszanej, merynosa polskiego i muflona europejskiego (*Ovis aries musimon*). *Nauka Przyroda Technologie* 7, 4, #59.
5. O'DOHERTY E., AHERNE M., ENNIS S., WEAVERS E., ROCHE J.F., SWEENEY T., 2001 – Prion protein gene polymorphisms in pedigree sheep in Ireland. *Research in Veterinary Science* 70, 51-56.
6. Regulacja nr 999/2001/EC, 2001 – Reguły prawne z zakresu zapobiegania, kontroli i zwalczania pasażowalnych encefalopatii gąbczastych. Unia Europejska, Bruksela.
7. Regulacja nr 2003/100/EC, 2003 – Decyzja Komisji Europejskiej w sprawie ustanowienia obowiązku tworzenia schematów hodowlanych prowadzących do zwiększenia genetycznej oporności na trzęsawkę u każdej z ras owiec w Europie. Unia Europejska, Bruksela.
8. Regulacja nr 260/2003/EC, 2003 – Ustanowiono obowiązek zwalczania TSE u owiec i kóz oraz uregulowano handel żywymi owcami i kozami bydłecymi. Unia Europejska, Bruksela.
9. REJDUCH B., KNAPIK J., PIESTRZYŃSKA-KAJTOCH A., KOZUBSKA-SOBOCIŃSKA A., KRUPIŃSKI J., 2009 – Frequency of genotypes in the PrP prion protein gene locus in the Polish sheep population. *Acta Veterinaria Hungarica* 57 (1), 30-49.
10. Statistical Product and Service Solution base version 12.0 for Windows. SPSS Inc. USA 2004.
11. VAN KAAM J.B.C.H.M., FINOCCIARO R., VITALE M., PORTOLANO B., VITELA F., CARACAPPA S., 2005 – PrP allele frequencies in non-infected Valle del Belice and infected cross-bred flocks. 56th Zjazd Naukowy Europejskiej Federacji Zootechnicznej (EAAP), 5-8 czerwca 2005, Uppsala, Szwecja, 11, 376.

Roman Niżnikowski, Grzegorz Czub, Marcin Świątek,
Krzysztof Głowacz, Magdalena Ślęzak

Polymorphism of the prion protein *PrP* in Polish Heath Sheep and Żelaźnieńska Sheep flocks from the Experimental Farm in Żelazna

Summary

The study was conducted in the Experimental Farm in Żelazna on foundation stocks and stud rams of two breeds: Polish Heath Sheep and Żelaźnieńska Sheep. The research included 538 foundation stock ewes and 29 stud rams of Polish Heath Sheep and 293 foundation stock ewes and 18 stud rams of Żelaźnieńska Sheep. Identification of the *PrP* prion protein gene was carried out in all animals. Genetic diversity in the frequency of scrapie alleles and genotypes was found to be lower in stud rams (3 genotypes and 3 alleles in Polish Heath Sheep and 2 genotypes and 2 alleles in Żelaźnieńska Sheep) than in foundation stock ewes (6 genotypes and 3 alleles in Polish Heath Sheep and 5 genotypes and 3 alleles in Żelaźnieńska Sheep). In the last year of the study, only rams with the ARR/ARR genotype were noted in stud rams of both breeds. The year of research had no significant effect on the frequency of scrapie alleles and genotypes in the foundation stock ewes and stud rams except in Polish Heath Sheep stud rams.

KEY WORDS: sheep / PrP / frequency of alleles and genotypes