

## Ocena frekwencji występowania uwarunkowań białka prionowego *PRNP* u merynosa polskiego starego typu na przykładzie regionu mazowieckiego

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

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie,  
Katedra Szczegółowej Hodowli Zwierząt, Zakład Hodowli Owiec i Kóz  
ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa

Badaniami objęto 5 stad merynosa polskiego starego typu z terenu woj. mazowieckiego, zakwalifikowanych do programu ochrony zasobów genetycznych tej rasy. Maciorki i tryki były w wieku od 2 do 11 lat (łącznie 181 osobników, w tym 12 tryków i 169 maciorek), utrzymywano je systemem alkierzowym, żywiono paszami wyprodukowanymi w gospodarstwie. Od owiec pobrano krew (z żyły jarzmowej) do probówek zawierających EDTA, w celu izolacji DNA genomowego na potrzeby analiz molekularno-genetycznych. W badanej populacji owiec wykazano występowanie pięciu alleli trzęsawki: ALRR, ALRQ, AFRQ, ALHQ i VLRQ. U maciorek stwierdzono wysoką frekwencję allelu ALRR oraz stosunkowo niską genotypu ALRR/ALRR, których zakres występowania powinien być znacząco zwiększony. Stwierdzono też dużą frekwencję allelu VLRQ u maciorek, a przede wszystkim u tryków, co powinno skutkować usunięciem tych zwierząt ze stada. Wykazano, że należy pilnie wprowadzić do wszystkich stad merynosa polskiego starego typu tryki charakteryzujące się genotypem ALRR/ALRR, co pozwoli na uzyskanie u potomstwa opornych genotypów białka prionowego.

**SŁOWA KLUCZOWE:** owce / białko prionowe / genotypy

W 2001 roku Parlament UE ustanowił reguły prawne dotyczące zapobiegania, kontroli i zwalczania pasażowalnych encefalopatii gąbczastych (regulacja nr 999/2001/EC) [7]. W 2003 roku decyzją nr 2003/100/EC [8] Komisja Europejska ustanowiła obowiązkowe tworzenie schematów hodowlanych skierowanych na zwiększanie genetycznej oporności na trzęsawkę u każdej z ras owiec w Europie. Ponadto w regulacji nr 260/2003/EC [9] postanowiono o zwalczaniu pasażowalnej encefalopatii gąbczastej (ang. TSE) u owiec i kóz oraz uregulowano kwestię handlu żywymi owcami i kozami oraz embrionami bydła. Trzęsawka (ang. scrapie), podobnie jak BSE u krów i choroba Creutzfeldta-Jakoba u ludzi, jest naturalnie pojawiającą się formą TSE. Przypuszcza się, że białko prionowe (PrP) jest odpowiedzialne za występowanie trzęsawki u owiec. W genie *PRNP* zaobserwowano sze-

reg polimorfizmów w kodonach 136, 141, 154 i 171, który wydaje się być odpowiedzialny za (genetyczną) oporność lub wrażliwość na trzęsawkę [1, 3, 5, 6].

Stwierdzono, że allele AFRR i ALRR gwarantują najmniejszą wrażliwość na trzęsawkę. Zaobserwowano, że w Wielkiej Brytanii i w Holandii allel VFRQ jest odpowiedzialny za duży stopień wrażliwości na tę jednostkę chorobową, natomiast allel AFRR lub ALRR występował najrzadziej u owiec, u których stwierdzono kliniczne objawy trzęsawki. Dlatego też selekcja na ten allel jest podstawowym narzędziem eliminowania i kontroli trzęsawki u owiec [2, 3, 4, 11].

W związku z powyższym podjęto próbę oceny frekwencji genów i genotypów u owiec rasy merynos polski starego typu, obejmując badaniami 5 stad utrzymywanych na terenie województwa mazowieckiego, zgodnie z obowiązującymi dyrektywami UE oraz zobowiązaniami do działania w tym kierunku.

### Material i metody

Badaniami objęto stada maciorek merynosa polskiego starego typu z terenu woj. mazowieckiego, z powiatów: płockiego (3 stada), ciechanowskiego (1 stado) i grójeckiego (1 stado), zakwalifikowane do programu ochrony zasobów genetycznych tej rasy. Maciorki i tryki były w wieku od 2 do 11 lat (łącznie 181 osobników, w tym 12 tryków i 169 maciorek), utrzymywano je systemem alkiezowym, żywiono paszami wyprodukowanymi w gospodarstwie.

Od zwierząt pobrano krew (z żyły jarzmowej) do probówek zawierających EDTA, w celu izolacji DNA genomowego na potrzeby analiz molekularno-genetycznych.

DNA izolowano z leukocytów krwi owiec, przechowywanej z EDTA. 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. DNA było izolowane z leukocytów metodą chromatografii na minikolumnach silikatowych firmy A&A Biotechnology (Gdańsk, Polska; [www.aabiot.com](http://www.aabiot.com)). Frakcja otrzymanego w ten sposób DNA posłużyła jako matryca do amplifikacji polimorficznego fragmentu genu dla białka prionowego. Genotypowanie alleli trzęsawki prowadzono systemem KASPar®.

System KASPar® oraz procedura genotypowania ([www.kbioscience.co.uk](http://www.kbioscience.co.uk)) polega na stosowaniu metody polimorfizmu punktowego SNP z zastosowaniem starterów wymienionych w tabeli 1.

**Tabela 1 – Table 1**

Startery oraz miejsca genotypowania SNP dla *locus* białka prionowego

The primers and SNP genotyping of the locus of the prion protein

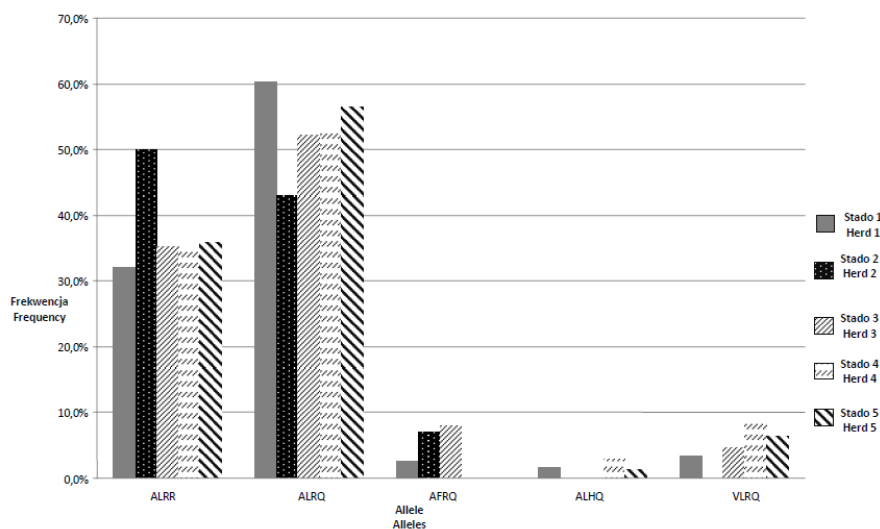
Locus	SNP	Zmiany genotypowania Changes	Lokalizacja Location
<i>PRNP</i> prion protein	AY909542:g.479C>T	C/T	exon 3
<i>PRNP</i> prion protein	AY909542:g.493C>T	C/T	exon 3
<i>PRNP</i> prion protein	AY909542:g.534G>A	G/A	exon 3
<i>PRNP</i> prion protein	AY909542:g.385A>G	A/G	exon 3
<i>PRNP</i> prion protein	AY909542:g.386G>T	G/T	exon 3

Na podstawie odczytu genotypowanych prób DNA, w obrębie maciorek i tryków przedstawiono rozkłady frekwencji alleli i genotypów. Powyższe działanie stanowiło czynność przygotowawczą do następnym etapów badań.

Do obliczeń statystycznych wykorzystano pakiet programu SPSS wersja 12.0 [10]. Za pomocą testu  $\chi^2$  oceniono zakres frekwencji alleli i genotypów u poszczególnych płci w zależności od stada.

### Wyniki i dyskusja

Frekwencję alleli trzęsawki w zależności od stada i płci przedstawiono w tabeli 2. U maciorek frekwencja występowania allelu ALRR okazała się wysoka, szczególnie w stadzie 2. (rys.). W pozostałych stadach wartość omawianej cechy należy poprawić na drodze selekcji. Wysoki udział allelu ALRQ jest często spotykany w populacjach owiec nie selekcyjowanych w kierunku zwiększenia częstotliwości występowania alleli opornych na trzęsawkę. Pozostałe allele występowały sporadycznie. Allel VLRQ, stwierdzony w czterech spośród pięciu badanych stad, powinien być bezwzględnie wyeliminowany, jako nieoporny na trzęsawkę [1, 2, 3, 5, 6, 11]. Z kolei allel ALRQ, występujący najczęściej, jest uważany za obojętny i powinien być eliminowany w drugiej kolejności, tak aby jego frekwencja w stadzie stopniowo się obniżała na rzecz allelu ALRR. Za ciekawe uznać należy występowanie allelu AFRQ w trzech stadach, w sumie u 15 maciorek. Zgodnie z dyrektywą UE [9], zwierzęta takie też powinny być eliminowane ze stada, ze względu na prawdopodobieństwo podatności na trzęsawkę atypową. Jednak podatność tych uwarunkowań oceniana jest na o wiele niższym poziomie niż alleli zawierających w genotypie prionową walinę (V).



Rys. Rozkład frekwencji alleli białka PRNP u maciorek w zależności od stada  
 Fig. Frequency distribution of PRNP prion protein alleles in ewes, depending on the herd

U tryków, ze względu na ich niewielką liczebność i ograniczenie występowania tylko do 4 stad, wskazać należy jedynie na pilną konieczność usunięcia osobników posiadających allel VLRQ. Z danych zawartych w tabeli 2. wynika, że nosicielami tego allelu były 2 tryki i 22 maciorki.

W badanej populacji, spośród stwierdzonych dziewięciu genotypów dwa zawierały allel VLRQ (ALRQ/VLRQ i ALRR/VLRQ) – tabela 3. U maciorek zdecydowanie najczęściej występowały genotypy ALRR/ALRQ i ALRQ/ALRQ. U tryków natomiast, wśród czterech genotypów jakie udało się określić, najczęściej występował ALRR/ALRQ. Występowanie genotypu ALRR/ALRR stwierdzono jedynie u maciorek, co nie jest zadowalające. Stosunkowo duży udział innych genotypów zawierających allel ALRR (z wyjątkiem 5 owiec posiadających go w kombinacji z VLRQ) jest pocieszający, ze względu na możliwości uzyskania wysokowartościowego potomstwa. Natomiast nosicielstwo allelu VLRQ u dwóch tryków, użytkowanych w jednym stadzie, oraz brak rozplodników homozygot ALRR/ALRR we wszystkich stadach jest nie do przyjęcia we współczesnej praktyce hodowlanej [1, 2, 3, 5, 6, 11].

Uwarunkowania trzęsawki w populacjach owiec, które nie były dotychczas poddawane selekcji w kierunku zwiększenia częstotliwości występowania opornych na tę jednostkę chorobową genotypów [3, 5, 11], wskazują na zły stan populacji merynosa polskiego starożytnego typu w analizowanym regionie, co może nie pozostawać bez wpływu na hodowlę tej rasy na terenie całego kraju. Istnieje konieczność podjęcia naprawczych działań hodowlanych, wynikających z wymienionych poniżej wniosków:

- w badanej populacji owiec stwierdzono występowanie pięciu alleli trzęsawki: ALRR, ALRQ, AFRQ, ALHQ i VLRQ oraz dziewięć genotypów u maciorek i cztery u tryków. Najwyższą częstotliwość występowania wykazał allel ALRQ, a następnie ALRR u obu płci oraz genotypy z nimi powiązane;

- stwierdzono u maciorek wysoką frekwencję allelu ALRR oraz stosunkowo niską genotypu ALRR/ALRR, których zakres występowania powinien być znacząco zwiększony we wszystkich badanych stadach;

- wykazano obecność allelu VLRQ zarówno u maciorek, jak i przede wszystkim u tryków, co powinno skutkować bezwzględną koniecznością usunięcia tych zwierząt. Wolnym od tego allelu okazało się jedynie stado 1.;

- należy pilnie sprowadzić do wszystkich stad tryki charakteryzujące się genotypem ALRR/ALRR, co pozwoli na uzyskanie u potomstwa opornych genotypów białka prionowego;

- przeprowadzone prace badawcze wskazują na bezwzględną konieczność prowadzenia określania uwarunkowań genetycznych trzęsawki w całych stadach owiec, ze szczególnym uwzględnieniem tryków. Rozplodniki posiadające allel VLRQ i nie posiadające allelu ALRR nie powinny być wpisywane do ksiąg zarodowych i wprowadzane do hodowli.

## PIŚMIENNICTWO

1. GOMBOJAV A., ISHIGURO N., HORIUCHI M., SERJMYADAG D., BYAMBAA B., SHINAGAWA M., 2003 – Amino Acid Polymorphisms of PrP Gene in Mongolian Sheep. *J. Vet. Med. Sci.* 65 (1), 75-81.

**Tabela 2 – Table 2**

Frekwencja alleli trzęsawki w zależności od stada (n – liczebność)

Frequency of scrapie alleles depending on the herd (n – number)

Wyszczególnienie Specification	Allel – Allele					Ogółem Total	Istotność statystyczna Statistical significance
	ALRR	ALRQ	AFRQ	ALHQ	VLRQ		
<b>Maciorki – Ewes</b>							
Stado 1. – Herd 1	38	71	3	2	4	118	
n	32,2	60,2	2,5	1,7	3,4	100,0	
%							
Stado 2. – Herd 2	36	31	5	0	0	72	
n	50,0	43,1	6,9	0,0	0,0	100,0	
%							
Stado 3. – Herd 3	31	46	7	0	4	88	
n	35,2	52,3	8,0	0,0	4,5	100,0	XX
%							
Stado 4. – Herd 4	35	53	0	3	9	100	
n	35,0	53,0	0,0	3,0	9,0	100,0	
%							
Stado 5. – Herd 5	28	44	0	1	5	78	
n	35,9	56,4	0,0	1,3	6,4	100,0	
%							
Ogółem – Total	168	245	15	6	22	456	
n	36,8	53,7	3,3	1,3	4,8	100,0	
%							
<b>Tryki – Rams</b>							
Stado 2. – Herd 2	0	2	–	–	0	2	
n	0,0	100,0	–	–	0,0	100,0	
%							
Stado 3. – Herd 3	3	5	–	–	0	8	
n	37,5	62,5	–	–	0,0	100,0	
%							
Stado 4. – Herd 4	4	4	–	–	0	8	
n	50,0	50,0	–	–	0,0	100,0	NS
%							
Stado 5. – Herd 5	2	2	–	–	2	6	
n	33,3	33,3	–	–	33,3	100,0	
%							
Ogółem – Total	9	13	–	–	2	24	
n	37,5	54,2	–	–	8,3	100,0	
%							
<b>Ogółem – Total</b>							
Stado 1. – Herd 1	38	71	3	2	4	118	
n	32,2	60,2	2,5	1,7	3,4	100,0	
%							
Stado 2. – Herd 2	36	33	5	0	0	74	
n	48,6	44,6	6,8	0,0	0,0	100,0	
%							
Stado 3. – Herd 3	34	51	7	0	4	96	
n	35,4	53,1	7,3	0,0	4,2	100,0	
%							
Stado 4. – Herd 4	39	57	0	3	9	108	
n	36,1	52,8	0,0	2,8	8,3	100,0	
%							
Stado 5. – Herd 5	30	46	0	1	7	84	
n	35,7	54,8	0,0	1,2	8,3	100,0	
%							
Ogółem – Total	177	258	15	6	24	480	
n	36,9	53,8	3,1	1,3	5,0	100,0	
%							

Istotność statystyczna: XX –  $P \leq 0,01$ ; NS – brak istotności wpływuStatistical significance: XX –  $P \leq 0,01$ ; NS – no significant





2. KAAL L., WINDIG J., 2005 – Rare sheep breeds and breeding for scrapie resistance in the Netherlands. 56<sup>th</sup> 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 A<sub>136</sub>H<sub>154</sub>Q<sub>171</sub> is associated with high susceptibility to scrapie in purebred and crossbred German Merinoland sheep. *Arch. Virol.* 149, 1571-1580.
4. Matthews D., 2005 – Scrapie – an overview; policy issues and potential eradication measures. 56<sup>th</sup> Zjazd Naukowy Europejskiej Federacji Zootechnicznej (EAAP), 5-8 czerwca 2005, Uppsala, Szwecja, 11, 374.
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. *Res. Vet. Sci.* 70, 51-56.
6. POLAK M.P., LARSKA M., LANGEVELD J.P., BUSCHMANN A., GROSCHUP M.H., ZMUDZINSKI J.F., 2010 – Diagnosis of the first cases of scrapie in Poland. *Veterinary Journal* 186, 47-52.
7. Regulacja nr 999/2001/EC – Reguły prawne z zakresu zapobiegania, kontroli i zwalczania pasażowalnych encefalopatii gąbczastych. Unia Europejska, Bruksela 2001.
8. Regulacja nr 2003/100/EC – 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 2003.
9. Regulacja nr 260/2003/EC – Ustanowiono obowiązek zwalczania TSE u owiec i kóz oraz uregulowano handel żywymi owcami i kozami rzeźnymi. Unia Europejska, Bruksela 2003.
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., VITALE F., CARACAPPA S., 2005 – PrP allele frequencies in non-infected Valle del Belice and infected cross-bred flocks. 56<sup>th</sup> Zjazd Naukowy Europejskiej Federacji Zootechnicznej (EAAP), 5-8 czerwca 2005, Uppsala, Szwecja, 11, 376.

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

## Evaluation of the frequency of occurrence of the *PRNP* prion protein in old type Polish Merino in the Mazovian region

### Summary

The study involved 5 herds of old type of Polish Merino qualified for the conservation of genetic resources of the breed. Ewes and rams were aged 2 to 11 years (total: 181, including 12 rams, and 169 ewes), kept in the indoor system, and fed the fodder produced on the farm. Blood samples were collected from the jugular vein of animals into EDTA-containing tubes for the isolation of genomic DNA for the genetic and molecular analysis. In the study population, the occurrence of five sheep scrapie alleles was revealed: ALRR, ALRQ, AFRQ, ALHQ and VLRQ. In the group of ewes, the high frequencies of ALRR allele and relatively low ALRR/ALRR genotype were found; the range of these



latter should be substantially increased. A high frequency of VLRQ allele in both ewes and rams was demonstrated, that should lead to an absolute necessity to remove such animals from the herds. It has been shown that there is an urgent need to bring the rams with genotype ALRR/ALRR to all herds in order to obtain a basis for raising the offspring with resistant prion protein genotypes in the old type of Polish Merino.

**KEY WORDS: sheep / prion protein / genotypes**