

Zastosowanie diagnostyki molekularnej do wykrywania schorzeń o podłożu genetycznym u koni

MARTA GAJEWSKA, MONIKA MIKULSKA*, ELŻBIETA WIRTH-DZIĘCIOŁOWSKA*

Zakład Genetyki i Hodowli Zwierząt Laboratoryjnych Centrum Onkologii – Instytut ul. W. K. Roentgena 5, 02-781 Warszawa

*Katedra Genetyki i Ogólnej Hodowli Zwierząt Wydziału Nauk o Zwierzętach SGGW, ul. Przejazd 4, 05-840 Brwinów

Gajewska M., Mikulska M., Wirth-Dzięciołowska E.

Molecular diagnosis in testing genetic diseases in horses

Summary

In some populations of domestic animals genetic defects are a serious economical problem. Thus it seems very important for contemporary animal breeders to collect information about genetic diseases prior to diagnosis of carrier animals. It should be pointed out that effective therapy exists for the majority of these types of diseases. At present the main way of dealing with this problem involves detecting heterozygous individuals and excluding them from breed stocks.

The article reports 3 genetic diseases with known genetic backgrounds: HYPP – hyperkalemic periodic paralysis, SCID – severe combined immune-deficiency disease, LWFS – lethal white foal syndrome. It also reports the results of genetic testing for identifying carrier animals and decreasing the level of defective alleles in the population.

Keywords: genetic disease, horse

Informacje o dziedzicznych cechach organizmu zakodowane w sekwencji nukleotydów kwasu deoksyrybonukleinowego (DNA) są przekazywane komórkom potomnym w trakcie podziału komórkowego. Powielenie tych informacji następuje w procesie replikacji DNA, czyli dobudowywania do matrycy rodzicielskiego łańcucha DNA komplementarnego łańcucha potomnego. Nad prawidłowością przebiegu tego procesu czuwa kompleks białek, które zdolne są również do przeprowadzania naprawy ewentualnych błędów zachodzących w trakcie powielania informacji genetycznej. Dokładność naprawy nie jest stuprocentowa, stąd raz na 10^9 - 10^{10} nukleotydów pojawiają się pomyłki. Zmiany w DNA mogą dotyczyć pojedynczych nukleotydów lub większych fragmentów genomu. Ich wynikiem może być zamiana jednego aminokwasu na inny w białku powstającym w procesie transkrypcji i translacji lub zmiana sensu zakodowanej informacji genetycznej, a nawet całkowite zahamowanie syntezy enzymu.

Mutacje mogą mieć różne skutki, począwszy od niewielkich zmian aktywności danego enzymu, aż po całkowitą utratę zdolności katalitycznych (np. przez utratę powinowactwa do substratu) lub wytworzenie nowego szlaku metabolicznego (np. przez stworzenie konformacji przestrzennej tworzącej powinowactwo do substratu innego niż dotychczas). Zmiany właściwości danego enzymu mogą mieć swoje odzwierciedlenie w fenotypie osobnika obciążonego mutacją.

Mutacje spontaniczne pojawiają się we wszystkich populacjach. Jeżeli dana grupa osobników podlega prawom doboru naturalnego, powstająca zmiana jest pod-

dawana weryfikacji przez środowisko. Zwiększa się wtedy częstość występowania alleli korzystnych dla organizmu w danych warunkach środowiskowych. W warunkach kontrolowanego doboru i selekcji osobników przeznaczonych do rozrodu, frekwencja poszczególnych alleli ulega zmianie, a preferowane są warianty genetyczne korzystne dla człowieka. W takiej sytuacji może dojść do zwiększenia częstości występowania alleli wadliwych, które są sprzężone z cechą pożądaną przez hodowców. Inną przyczyną rozpowszechnienia defektywnego allelu w populacji może być dopuszczenie do rozrodu bezobjawowego nosiciela niepożądanego mutacji.

Jeżeli defekt genetyczny sprzężony jest z konkretną cechą (najlepiej jednogenną), to jego wykrycie jest stosunkowo proste. Trudniej, jeśli brak jest ewidentnego sprzężenia lub gdy cecha sprzężona może ulegać daleko posuniętym modyfikacjom. Defekty genetyczne dają się jednoznacznie zdefiniować jako określona zmiana sekwencji konkretnego odcinka DNA (zazwyczaj genu). Dlatego wykrycie takiej zmiany i opracowanie odpowiedniego testu laboratoryjnego pozwala na jednoznaczne stwierdzenie, czy obserwowane schorzenie jest spowodowane mutacją genetyczną, czy też jest to fenotypia o innej etiologii. Testy oparte na analizie polimorfizmu DNA pozwalają także na wykrywanie bezobjawowych nosicieli. Jest to szczególnie ważne w hodowli koni, którą charakteryzuje długi odstęp międzypokoleniowy. Klacz daje w ciągu całego życia niewiele źrebiąt, a wysoki koszt wyhodowania jednego osobnika praktycznie uniemożliwia prowadzenie kojarzeń testowych.

Obecnie, przy użyciu testów na poziomie DNA, są wykrywane trzy schorzenia genetyczne u koni: okresowy paraliż u koni połączony z podwyższonym poziomem potasu w surowicy (HYPP – hyperkalemic periodic paralysis), złożony niedobór odporności o ostrym przebiegu (SCID – severe combined immunodeficiency disease), syndrom białego źrebięcia (LWFS – lethal white foal syndrome).

Okresowy paraliż u koni połączony z podwyższonym poziomem potasu w surowicy (HYPP – hyperkalemic periodic paralysis lub Impressive syndrome).

Defekt ten występuje u koni quarter horse (qh), a także pojawia się u innych ras, które z nimi krzyżowano. Konie quarter horse są obecnie najliczniejszą rasą w USA. Startują w wyścigach sprinterskich na ćwierć mili (stąd nazwa), a także chętnie są wykorzystywane w rajdach długodystansowych. Ponadto utrzymywane są jako konie rekreacyjne i startujące w różnej rangi pokazach.

Wada HYPP występuje u potomków ogiera Impressive rasy qh, w którego genotypie prawdopodobnie zaszła mutacja w jednym z genów kontrolującym kanał sodowy mięśni szkieletowych (SCN4A – Sodium channel, voltage-gated, type IV, alpha subunit). Ogier ten dawał potomstwo o bardzo muskularnym fenotypie, co jest cechą pożądaną w tej rasie i co zyskało mu uznanie w oczach sędziów i hodowców. Dlatego też został szeroko użyty jako reproduktor. Doprowadziło to do rozpowszechnienia się opisywanej mutacji i uwarunkowanego przez nią schorzenia.

Podstawowym objawem są napadowe ataki drżenia, sztywnienia lub nawet paraliżu mięśni. Może im towarzyszyć pocenie się i ogólne osłabienie, które często prowadzi do śmierci zwierzęcia. W trakcie ataku gwałtownie wzrasta częstotliwość oddechów, które mogą przechodzić w zduszony charkot. Atak trwa od kilku minut do godziny i jego wystąpienie nie jest bezpośrednio związane z wysiłkiem fizycznym ani stosowaną dietą. Poza tym u koni z HYPP częściej obserwuje się występowanie różnych dolegliwości, jak np. otarcia czy słuźczenia powstałe w trakcie treningu, które co prawda nie są specyficzne dla tej choroby, jednak ich wystąpienie u koni z tą wadą jest częściej spotykane niż u innych (6, 9).

Schorzenie jest uwarunkowane genem autosomalnym o niepełnej dominacji. W przypadku heterozygot wada ta zazwyczaj ujawnia się dopiero u osobników dorosłych, choć także konie młode mogą wykazywać objawy HYPP. U zwierząt homozygotycznych objawy chorobowe występują już w okresie neonatalnym, co przejawia się niewydolnością układu oddechowego (charczący, rzęzący oddech) i często trudnościami związanymi z polykaniem, a także ślinotokiem oraz obniżeniem masy ciała. Około 50% źrebiąt homozygotycznych pada w pierwszym roku życia, dalsze 30% do ukończenia 5 lat (10).

Zwierzęta obciążone tą wadą powinny być otoczone szczególną opieką. Muszą mieć zapewnioną dostateczną ilość ruchu przez regularne treningi i dietę o niskiej zawartości potasu.

Przyczyną opisanego schorzenia jest prosta, jednokleotydomowa mutacja punktowa, w wyniku której guanidyna została zamieniona na cytozynę (G-C). Powoduje to, że aminokwas fenyloalanina zostaje podstawiony przez leucynę w domenie transmembranowej IVS-3 genu SCN4A, kodującego podjednostkę alfa kanału sodowego w komórkach mięśni szkieletowych. Mutacja ta wywołuje patologiczne zmiany przepuszczalności pompy sodowo-potasowej powodując naddepolaryzację mięśni, co prowadzi do paraliżu (14).

Testowanie nosicielstwa niepożądanego allelu można przeprowadzić w różny sposób. Jedną z możliwości jest elektromiografia polegająca na ustaleniu zmian patologicznych w mięśniach (9). Innym sposobem jest podanie soli KC1 – w ilości 0,2 g/kg m.c. w celu wywołania objawów drżenia (paraliżu) (9). Stosowany jest także test genetyczny DNA – oparty na reakcji PCR i hybrydyzacji z allelospecyficzną sondą (14) pozwalający na jednoznaczne zdiagnozowanie podłoża schorzenia, a także na ocenę czy testowany osobnik jest homo- czy heterozygotą. W związku z tym, że defekt ujawnia się u zwierząt dorosłych, przeprowadzenie testu przed zakwalifikowaniem zwierzęcia do rozrodu pozwala na wyeliminowanie nosicieli przed wprowadzeniem ich do hodowli. Daje to potencjalną szansę ograniczenia frekwencji wadliwego allelu w populacji.

Złożony niedobór odporności o ostrym przebiegu (SCID – severe combined immunodeficiency disease). Jest to letalna wada występująca u koni czystej krwi arabskiej uwarunkowana recesywnym genem autosomalnym.

Pierwszy przypadek opisano w 1973 r. w USA. Początkowo sądzono, że około 25% populacji amerykańskich koni czystej krwi arabskiej jest nosicielami SCID, a ok. 2,5% urodzonych źrebiąt pada w wyniku tej choroby (11). Badania prowadzone w ostatnich latach określają frekwencję wadliwego allelu na 8,4%, zaś śmiertelność na skutek SCID jest szacowana na poziomie 18/10 000 urodzonych źrebiąt arabskich (2). Poprzednie wysokie wyniki są tłumaczone niereprezentatywną próbą we wcześniejszych badaniach (wyniki opracowano na podstawie materiału zebranego w stadach, w których wystąpił SCID, a nie dla całości populacji).

W opisanych przypadkach dochodzi do różnych, mieszanych infekcji, najczęściej układu oddechowego w postaci np. zapalenia płuc, ale także stanów zapalnych skóry i innych infekcji związanych z postępującą utratą odporności. Źrebięta zaczynają chorować przeważnie około 25 dnia życia (między 14-45 dniem), a więc po zaniku odporności biernej nabytej wraz z siarą. Zejście śmiertelne następuje najczęściej przed 5-tym miesiącem życia. U chorych źrebiąt liczba limfocytów spada poniżej 1000/mm³ (norma dla zdrowych wynosi od 2500 do 3000/mm³). Sekcje padłych źrebiąt wykazują również niedorozwój grasicy i węzłów chłonnych (4).

Gen odpowiedzialny za wystąpienie tej wady wykryto na podstawie analizy genetycznego podłoża podobnych schorzeń występujących u innych gatunków zwierząt i człowieka (1, 5). Zmutowany allel powstał

przez delecję (utrata) 5 par zasad w genie kodującym podjednostkę katalityczną DNA – zależnej kinazy białkowej (DNA-protein kinase, catalytic subunit, DNA – PKcs). Jedną z funkcji DNA-PKcs jest katalizowanie somatycznej rekombinacji (V(D)J) immunoglobulin i receptorów limfocytów T (TCR- T-cell receptor). Defekt podjednostki katalitycznej uniemożliwia ten proces, co powoduje brak dojrzewania limfocytów T i B, jak również obniżenie poziomu immunoglobulin (w pierwszym rzędzie immunoglobulin M) (17, 5).

Do wykrywania schorzenia opracowano test oparty na analizie DNA. W reakcji PCR namnożony zostaje fragment genu DNA – PKcs, zawierający miejsce, w obrębie którego może zajść opisywana mutacja. Otrzymane fragmenty dla allelu prawidłowego i zmutowanego różnią się między sobą długością (odpowiednio 166 i 169 par zasad) (2). Inną możliwością jest hybrydyzacja produktu PCR z allelospecyficzną sondą (16). Analiza DNA pozwala na identyfikację koni chorych, a przede wszystkim będących nosicielami zmutowanego allelu.

Niezwykle istotne jest wczesne przeprowadzenie odpowiednich badań laboratoryjnych lub testów genetycznych. Pozwala bowiem na odróżnienie źrebiąt obciążonych SCID od tych, u których doszło do uszkodzenia układu immunologicznego na skutek czynników innych niż genetyczne (np. źrebięta, które w odpowiednim czasie nie nabyły odporności pochodzenia siarowego również mogą wykazywać podwyższoną podatność na podobne infekcje).

Syndrom białego źrebięcia (LWFS – Lethal White Foal Syndrome).

Overo jest jednym z dwóch typów umaszczenia srokatego, szczególnie cenionym w USA. Atrakcyjne srokate umaszczenie, tzw. overo frame jest uwarunkowane genem o niepełnej dominacji i jest charakterystyczne dla osobników heterozygotycznych. Kojarzenie dwóch osobników umaszczonych w tym typie powoduje, że 1/4 potomstwa rodzi się obciążona letalną wadą genetyczną. Żrebięta te przychodzą na świat niebieskookie, o maści prawie białej, choć mogą mieć kilka barwnych włosów lub plam, zazwyczaj w okolicy ogona lub/i pyska. Takie białe umaszczenie jest wynikiem braku melanocytów w skórze i włosach. Przypuszcza się, że w niektórych przypadkach może także występować głuchota. W ciągu kilku godzin po urodzeniu źrebięta wykazują zaburzenia funkcjonowania układu pokarmowego, zbliżone do objawów występujących u noworodków, które nie oddały smółki. Pojawiają się silne bóle brzuszne, ponieważ z powodu braku zwojów nerwowych podśluzówki jelit sterujących ruchami perystaltycznymi nie dochodzi do przesuwania treści przez układ pokarmowy. Leczenie tego schorzenia zarówno środkami farmakologicznymi jak i metodą operacyjną jest nieskuteczne.

Gen odpowiedzialny za to schorzenie został poznany dzięki podobnie działającym genom u innych gatunków. U myszy jeden z typów łaciatości (piebald)

jest związany z wrodzonym brakiem zwojów autonomicznych w okrężnicy (defektem określanym w piśmiennictwie jako *congenital aganglionosis* lub *megacolon aganglionosis*) – objawiającym się podobnie jak u białych źrebiąt overo (12). Podobny syndrom zaobserwowano u szczurów o specyficznym typie łaciatości (sl- spotting lethal). U ludzi występuje analogiczne schorzenie – choroba Hirschsprunga. U osób dotkniętych tą chorobą stwierdza się wrodzony brak zwojów autonomicznych w okrężnicy (*megacolon aganglionosis*), a także hipopigmentację, dwukolorowe tęczęwki oczu i w niektórych przypadkach głuchotę. Wszystkie te objawy związane są z mutacją w genie receptora B endoteliny – EDNR B (u ludzi schorzenie uwarunkowane jest wielogenowo, jakkolwiek mutacja EDNR B wydaje się mieć kluczowe znaczenie) (13). Gen ten jest związany z neonatalnym rozwojem melanocytów i jelitowych zwojów nerwowych (*enteric ganglia*), które w procesie embriogenezy wywędrowują z tego samego obszaru cewy nerwowej.

Opisywany gen składa się z 7 eksonów i 6 intronów. Metodami analizy molekularnej DNA wykryto u koni overo, w sekwencji cDNA mutację w pierwszej domenie transmembranowej, w kodonie 118 polegającą na zamianie nukleotydów TC na AG, a co za tym idzie zamianę aminokwasu izoleucyny na lizynę. Prowadzi to prawdopodobnie do zaburzeń w lokalizacji receptora lub uniemożliwia jego wiązanie z ligandem. Efektem końcowym jest praktycznie unieczynnienie szlaku metabolicznego (15).

Podobne schorzenie obserwowano także u źrebiąt rasy clydesdale, które w wieku ok. 4-9 miesięcy wykazywały zaburzenia w funkcjonowaniu układu pokarmowego, jednak o łagodniejszym przebiegu niż w przypadku LWFS. U koni tych stwierdzono również niedorozwój zwojów nerwowych jelit i wykazano sprzężenie pomiędzy tym schorzeniem a umaszczeniem sabino charakteryzującym się dużymi odmianami na głowie i nogach, a także białymi plamami na brzuchu i podgardlu (8).

U ludzi stwierdzono kilka niezależnych mutacji w genie EDNR B prowadzących do powstania syndromu Hirschsprunga, który może ujawniać się z różnym natężeniem. Możliwe, że defekt obserwowany u źrebiąt po rodzicach sabino jest związany także z inną mutacją w obrębie tego samego genu.

Analiza DNA mająca na celu wykrycie mutacji w genie EDNR B została oparta na technice PCR z zastosowaniem allelospecyficznych starterów. Fragment prawidłowy amplifikowany w wyniku reakcji ma długość 118 par zasad (pz), zaś charakterystyczny dla formy zmutowanej – 136 pz. (15).

Umaszczenie srokate – zarówno typu overo, jak i spotykane w Polsce, a określane przez hodowców amerykańskich jako tobiano, podlega działaniu szeregu genów modyfikatorów, które wpływają na wielkość, kształt i rozmieszczenie białych plam. Badania wykazały, że niektóre konie heterozygotyczne pod względem genu

LWFS, nie wykazują jego działania fenotypowo i są jednolicie umaszczone. Często także rodzą się zupełnie zdrowe źrebięta o białej sierści pochodzące po rodzicach srokatach (zarówno overo jak i tobiano), u których pochopnie zdiagnozowano syndrom LWFS (7).

Opisane schorzenia dotyczą populacji koni amerykańskich. Zarówno konie quarter horse, jak i o umaszczeniu overo nie są w Polsce hodowane (jakkolwiek pojedyncze osobniki overo były już sprowadzane przez prywatnych właścicieli). Badania prowadzone w latach 80-tych przez prof. J. Kitę i wsp. (4), w których analizowano poziom immunoglobulin w surowicy i liczbę limfocytów w krwi obwodowej, nie wykazały obecności w polskiej populacji koni czystej krwi arabskiej osobników obciążonych SCID.

Przyczyny omawianych schorzeń zostały gruntownie zanalizowane w momencie, kiedy frekwencja warunkujących je genów w populacji stała się na tyle wysoka, że zaczęły stanowić problem ekonomiczny.

Gen powodujący wystąpienie syndromu białego źrebięcia (LSWF) jest stale utrzymywany w populacji, bowiem warunkuje pożądane umaszczenie overo. Stosowane testy genetyczne umożliwiają wykrycie heterozygot o „uśpionym” fenotypie oraz lepsze planowanie kojarzeń. Podobnie, w przypadku urodzenia białego źrebięcia można jednoznacznie określić jego genotyp (modyfikatory mogą powodować nie tylko zmniejszenie obszaru białych plam, ale także ich rozszerzenie na niemal całą powierzchnię ciała).

HYPP jest sprzężony z inną korzystną z punktu widzenia hodowców cechą, jaką jest silna muskulatura. Także i w tym przypadku trudno jest więc wyeliminować wadliwy allel z populacji, tym bardziej, że objawy pojawiają się często dopiero u osobników dorosłych, które już zostały użyte do rozrodu. Wczesne określenie genotypu osobnika pozwala na odpowiednie ustawienie sposobu żywienia (pasza o niskiej zawartości potasu) oraz właściwy trening. Ponadto, stanowi dodatkowe kryterium selekcyjne przy wyborze zwierząt do hodowli. W informacjach podawanych przez hodowców koni qh często pojawia się stwierdzenie, że konie przez nich oferowane do sprzedaży są „Impressive free”, czyli wolne od wadliwego allelu rozpoznawanego w populacji przez wspomnianego ogiera. Dzięki tym działaniom frekwencja wadliwego allelu w populacji jest obecnie oceniana na 0,02% (3).

W przypadku SCID, schorzenia warunkowanego genem recesywnym, test DNA umożliwia wykrycie bezobjawowych nosicieli i ewentualne wyeliminowanie ich z hodowli, zaś w przypadku źrebiąt dostarcza informacji o celowości prowadzenia terapii. Zarówno HYPP jak i SCID są defektami stosunkowo niedawno poznanymi. Wykorzystywanie w hodowli ogiera Impressive to lata 70-te, zaś SCID rozprzestrzenia się w populacji amerykańskich koni czystej krwi arabskiej od lat 20-tych XX wieku (2). Obrazuje to jak szybko mutacja wprowadzona do populacji przez pojedynczego osobnika może stać się problemem zarówno ho-

dowlanym, jak i ekonomicznym. Jedyne defekt związane z umaszczeniem overo jest schorzeniem o dużo starszym rodowodzie. Występuje nie tylko u koni paint horse, ale także u ras nigdy z nimi nie krzyżowanych, wykazujących jednak ten sam typ umaszczenia (7).

Po przeprowadzeniu testu genetycznego, zarówno hodowca jak i potencjalny nabywca otrzymuje precyzyjną informację o tym, czego może spodziewać się po danym osobniku i jego ewentualnym potomstwie. Cenne wydaje się zatem zbieranie informacji dotyczących schorzeń, których podłożem są prawdopodobnie zmiany na poziomie DNA. Wychwycenie tego typu defektów stwarza możliwość określenia sposobu ich dziedziczenia oraz wyjaśnienia podłoża genetycznego (opracowanie testów). Pozwoli to na odróżnianie fenotypii i monitorowanie frekwencji defektywnych alleli w zagrożonych stadach.

Piśmiennictwo

1. Bailey E., Reid R. C., Skow L. C., Mathiason K., Lear T. L., McGuire T. C.: Linkage of the gene for equine combined immunodeficiency disease to microsatellite markers HTG8 and HTG4; syntenies and FISH mapping to ECA9. *Animal Gen.* 1997, 28, 268-273.
2. Bernoco D., Bailey E.: Frequency of the SCID gene among Arabian horses in the USA. *Animal Gen.* 1998, 29, 41-42.
3. Bowling A. T., Byrns G., Spier S.: Evidence for a single pedigree source of the hyperkalemic periodic paralysis susceptibility gene in quarter horses. *Animal Gen.* 1996, 27, 279-81.
4. Kita J., Frymus T., Crisman M. W., Perryman L. E.: Survey of arabian foals in Poland for immune system disorders. *J. Eq. Vet. Sci.* 1985, 5, 290-292.
5. Leber R., Wiler R., Perryman L. E., Meek K.: Equine SCID: mechanistic analysis and comparison with murine SCID. *Vet. Immunol. Immunopathol* 1998, 65 (1), 1-9.
6. Maxon-Sage A., Parente E. J., Beech J., Lindborg S., May L. L., Teleis D. C.: Effect of highintensity exercise on arterial blood gas tensions and upper airway and cardiac function in clinically normal quarter horses and horses heterozygous and homozygous for hyperkalemic periodic paralysis. *Am. J. Vet. Res.* 1998, 59 (5), 615-618.
7. Metallinos D. L., Bowling A. T., Rine J.: A missense mutation in the endothelin-B receptor gene is associated with the Lethal White Foal Syndrome: an equine version of Hirschsprung Disease. *Mamm. Genome* 1998, 9, 426-431.
8. Murray M. J., Parker G. A., White N. A.: Megacolon with myenteric hypoganglionosis in a foal. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1988, 192, (7), 917-919.
9. Naylor J. M., Jones V., Berry S. L.: Clinical syndrome and diagnosis of hyperkalemic periodic paralysis in quarter horses. *Equine Vet. J.* 1993, 25 (3), 174-177.
10. Naylor J. M., Nickel D. D., Trimino G., Card C., Lightfoot K., Adams G.: Hyperkalemic periodic paralysis in homozygous and heterozygous horses: a co-dominant genetic condition. *Equine Vet. J.* 1999, 31 (2), 153-159.
11. Poppie M. J., McGuire T. C.: Combined immunodeficiency in foals in Arabian breeding: evaluation of mode of inheritance and estimation of prevalence of affected foals and carrier mares and stallions. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1977, 170 (1), 31-33.
12. Pristley A., Beamish H. J., Gell D., Amatoucci A. G., Muhlmann-Diaz M. C., Singleton B. K., Smith G. C., Blunt T., Schalkwyk L. C., Bedford J. S., Jackson S. P., Jeggo P. A., Taccioli G. E.: Molecular and biochemical characterisation of DNA-dependent protein kinase-defective rodent mutant irs-20. *Nucleic Acids Res.* 1998, 26 (8), 1965-73.
13. Puffenberger E. G., Hosoda K., Washington S. S., Nakao K., Wit D de., Yanagisawa M., Chakravarti A.: A missense mutation of the endothelin-B receptor gene in multigenic Hirschsprung's disease. *Cell* 1994, 79, 1257-1266.
14. Rudolph J. A., Spier S. J., Byrns G., Hoffman E. P.: Linkage of hyperkalemic periodic paralysis in quarter horses to the horse adult skeletal muscle sodium channel gene. *Animal Gen.* 1992, 23 (3), 241-250.
15. Santschi E. M., Purdy A. K., Valberg S. J., Vrotsos P. D., Kaese D., Mickelson J. R.: Endothelin receptor B polymorphism associated with lethal white foal syndrome. *Mamm. Genome* 1998, 9, 306-309.
16. Shin E. K., Perryman L. E., Meek K.: Evaluation of a test for identification of Arabian horses heterozygous for the severe combined immunodeficiency trait. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1997, 211 (10), 1268-1270.
17. Weiler R., Leber R., Moore B. B., VanDyk L. F., Perryman L. E., Meek K.: Equine severe combined immunodeficiency: a defect in V(D)J recombination and DNA-dependent protein kinase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995, 92 (25), 11485-11489.

Adres autora: dr inż. Marta Gajewska ul. W. K. Roentgena 5, 02-781 Warszawa; e-mail: mgajewska@coi.waw.pl