

Ocena wpływu polimorfizmu wybranych genów na występowanie mastitis u krów^{*)}

GRAŻYNA SENDER, AGNIESZKA KORWIN-KOSSAKOWSKA,
KARIMA GALAL ABDEL HAMEID, BEATA PRUSAK

Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN, 05-552 Wólka Kosowska, Jastrzębiec

Sender G., Korwin-Kossakowska A., Hameid K. G. A., Prusak B.

Association of the polymorphism of some genes with the occurrence of mastitis in cattle

Summary

The purpose of this study was to investigate the association of the lactoferrin alleles and interaction of BoLA-DRB3 and lactoferrin alleles with the somatic cell count in cow milk. The polymorphism of the lactoferrin gene was identified in blood samples collected from 125 cows. Udder health was determined by test - day milk somatic cell count. Lactoferrin genotype BB was significantly ($p < 0.01$) associated with a decrease of the somatic cell count in cow milk. Due to the small sample the relationship between interaction of BB lactoferrin genotype and BoLA-DRB3*16 with somatic cell count were not established.

Keywords: mastitis, genetic markers, lactoferrin gene

Zapalenie wymienia należy do najbardziej kosztownych i trudnych do opanowania metodami weterynaryjnymi chorób bydła mlecznego. Stwierdzono genetyczne różnice w podatności krów na tę chorobę (5). Mechanizmy różnic w genetycznej skłonności do zachorowania nie zostały jeszcze do końca poznane. Przypuszcza się, że występowanie tej choroby zależy od wielu genów. Identyfikacja tych genów pozwoliłaby na zwiększenie efektywności selekcji bydła mlecznego w kierunku poprawy zdrowia wymienia poprzez prowadzenie selekcji wspomaganej markerami genetycznymi. Poszukiwanie markerów genetycznych obejmuje, między innymi, poszukiwanie genów, których produkty wpływają bezpośrednio na poziom badanej cechy (6).

Do identyfikacji markera genetycznego *mastitis* konieczne jest wykorzystanie informacji o funkcji genu w organizmie. Ważne jest również znalezienie powiązania pomiędzy różnymi allelami genu a występowaniem choroby.

Geny głównego układu zgodności tkankowej (MHC) odgrywają ważną rolę w regulacji odpowiedzi immunologicznej. Z tego powodu zainteresowano się związkiem pomiędzy genami BoLA klasy II a występowaniem *mastitis* u krów (3, 10-12). Produkty genów BoLA klasy II odgrywają ważną rolę podczas prezentacji antygeny limfocytom T oraz wpływają na liczbę i rodzaj komórek T (1). Spośród genów BoLA klasy II najbardziej obiecujący wydaje się związek genu BoLA-

-DRB3 z zapaleniem wymienia (7). Gen ten u bydła zlokalizowano na 23 chromosomie. W genie BoLA-DRB3 ekson 2 jest ważny funkcjonalnie, ponieważ koduje miejsce wiązania peptydów i w związku z tym wpływa na możliwość immunologicznego rozpoznawania obcych białek. Dotychczasowe badania wskazują na powiązanie miejsc polimorficznych w eksonie 2 tego genu z występowaniem stanu zapalnego wymienia u krów (7).

Badania genów warunkujących podatność na *mastitis* dotyczą również polimorfizmu genu laktoferyny. Laktoferyna jest białkiem wielofunkcyjnym, ale jego głównym zadaniem jest zapobieganie infekcjom bakteryjnym. Jest to spowodowane prawdopodobnie dużym powinowactwem laktoferyny do jonów Fe^{3+} , czerpaniem ich ze środowiska i pozbawieniem bakterii żelaza koniecznego do ich wzrostu (2). Gen laktoferyny występuje w chromosomie 22 u bydła i jest zbudowany z 17 eksonów. Mimo że mechanizm działania laktoferyny nie został jeszcze do końca poznany, wiadomo, że poziom tego białka wzrasta znacznie podczas infekcji gruczołu mlekowego. Prowadzone były prace nad poszukiwaniem powiązania pomiędzy polimorfizmem genu laktoferyny a występowaniem *mastitis* u krów (4, 8). Z powodu ważnej roli genów BoLA-DRB3 i laktoferyny w reakcji na infekcje bakteryjne, geny te zostały włączone do badań, których celem dalekosiężnym jest identyfikacja markerów genetycznych *mastitis*. Badanie markerów genetycznych obejmuje również określenie współdziałania genów BoLA-DRB3 i laktoferyny na występowanie *mastitis*.

^{*)} Badania finansowane z grantu KBN 2PO6D03026.

Celem badań było określenie wpływu polimorfizmu genu laktoferyny i interakcji genotypu BoLA-DRB3 i laktoferyny na liczbę komórek somatycznych w mleku krów.

Materiał i metody

Badaniami objęto 125 krów rasy holsztyńskiej utrzymywanych w oborze należącej do Instytutu Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębcu. Do określania stanu zdrowia wymienia posłużyły wyniki comiesięcznych badań liczby komórek somatycznych (wskaźnik zapalenia wymienia) oznaczone w próbkach mleka pobieranych w czasie kontroli użyteczności mlecznej badanych zwierząt. Ocenę stanu zdrowia wymienia przeprowadzono na podstawie nie mniej niż pięciu oznaczeń liczby komórek somatycznych w próbkach mleka w czasie co najmniej jednej laktacji.

Próbki krwi pobrane od krów posłużyły do określenia polimorfizmu genów BoLA-DRB3 i laktoferyny. DNA izolowano z leukocytów krwi wykorzystując gotowy zestaw do izolacji DNA Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega). Do określenia polimorfizmu genu BoLA-DRB3 wykorzystano metodę MPT-PCR (multi-primer target PCR) (7). Polimorfizm genu laktoferyny określano metodą RFLP-PCR. Do amplifikacji fragmentu DNA o długości 301 par zasad wykorzystano primery dobrane we wcześniejszych badaniach (9). Otrzymany fragment DNA trawiono enzymem restrykcyjnym EcoR1. Miejsce restrykcyjne znajdowało się w intronie 6 tego genu. W wyniku trawienia enzymem restrykcyjnym otrzymano dwa allele. W przypadku nie występowania miejsca restrykcyjnego otrzymano allel A o długości 301 par zasad. Natomiast allel B był trawiony na dwa fragmenty o długości 201 i 100 par zasad (9).

Opracowanie statystyczne materiału miało na celu wykazanie zależności pomiędzy genotypem genu laktoferyny a liczbą komórek somatycznych. Przeanalizowano również zależność pomiędzy interakcją genotypu BoLA-DRB3 i laktoferyny a stanem zdrowia gruczołu mlekowego mierzonego liczbą komórek somatycznych. Do obliczeń wykorzystano procedurę GLM pakietu SAS. W modelu statystycznym służącym do analizy logarytmu liczby komórek somatycznych w mleku badanych krów uwzględniono: genotyp badanych zwierząt, powtarzalność wyników dotyczących zwierzęcia zagnieżdżonego w genotypie (lub interakcji genotypów BoLA-DRB3 i laktoferyny), numer laktacji, rok i sezon badania, dzień laktacji i wydajność mleka. Wpływ dnia laktacji i wydajności mleka na liczbę komórek somatycznych uwzględniono w modelu jako regresję. Istotność różnic pomiędzy poziomem liczby komórek somatycznych w grupach krów reprezentujących różne genotypy laktoferyny i różne interakcje genotypów BoLA-DRB3 i laktoferyny wykonano za pomocą testu Duncana. W modelu nie uwzględniono wpływu buhaja, ponieważ badane zwierzęta pochodziły po 54 ojcach (średnio 2,5 córki na buhaja). W przypadku takiej struktury populacji można założyć, że wpływ genotypu ojca był losowy.

Wyniki i omówienie

W badanej populacji krów stwierdzono częstość allelu A laktoferyny wynoszącą 80% natomiast allelu B

Tab. 1. Zależność pomiędzy liczbą komórek somatycznych a genotypem laktoferyny ($\bar{x} \pm se$)

Genotyp laktoferyny	n	Liczba komórek somatycznych (log)
AA	83	5,76 ^a ± 0,44
BB	5	5,47 ^b ± 0,40
AB	37	6,03 ^c ± 0,37

Objaśnienie: a, b, c – średnie oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy $p \leq 0,01$

20%. Częstości alleli laktoferyny były zbliżone do podawanych wcześniej przez innych autorów (9).

W tab. 1 przedstawiono liczbę komórek somatycznych w zależności od genotypu laktoferyny. Najniższą liczbę komórek somatycznych stwierdzono w grupie krów z genotypem BB. Grupa ta różniła się istotnie ($p < 0,01$) od grupy krów z allelem AA oraz krów heterozygotycznych (tab. 1). Najwyższą liczbą komórek somatycznych charakteryzowały się krowy o genotypie AB laktoferyny i różniły się istotnie ($p < 0,01$) od zwierząt z pozostałymi genotypami. Niestety, grupa osobników z korzystnym pod względem występowania *mastitis* allelem B była nieliczna i dlatego badania te wymagają potwierdzenia na większym materiale. Badany polimorfizm występował w intronie 6 genu laktoferyny. Zmiana ta nie miała charakteru funkcjonalnego i nie przekładała się na sekwencję kodowanych białek. Jednakże omawiany polimorfizm może być cennym markerem liczby komórek somatycznych w mleku. W dotychczasowych badaniach nie znaleziono istotnych zależności pomiędzy polimorfizmem genu laktoferyny występującym w eksonach a występowaniem *mastitis*. Autorzy przypuszczają, że mogło to być spowodowane zbyt małą liczbą badanych zwierząt (4). Liczebność badanych zwierząt (4) była nieco mniejsza niż w naszych badaniach, a jednak poszukiwano zależności pomiędzy polimorfizmem genu laktoferyny a występowaniem *mastitis*. W świetle innych wyników (4) tym cenniejsze wydaje się oszacowanie istotnych różnic liczby komórek somatycznych w zależności od genotypu laktoferyny w tak niewielkiej populacji.

We wcześniejszych badaniach genów determinujących podatność na zapalenie gruczołu mlekowego,

Tab. 2. Zależność pomiędzy liczbą komórek somatycznych a interakcją genotypów BoLA-DRB3 i laktoferyny ($\bar{x} \pm se$)

Wybrane genotypy BoLA-DRB3 i laktoferyny	n	Liczba komórek somatycznych (log)
AA 16/n	18	5,60 ^a ± 0,50
AA 23/n	13	6,48 ^b ± 0,53
AA n/n	50	5,60 ^a ± 0,38
AB 16/n	10	5,59 ^a ± 0,44
AB 23/n	5	6,85 ^c ± 0,42
AB n/n	19	5,94 ^d ± 0,32

Objaśnienie: jak w tab. 1.

przeprowadzonych na tym samym materiale, stwierdzono powiązanie allelu BoLA DRB3.2*16 z obniżeniem liczby komórek somatycznych w mleku krów (7). Podobne wyniki w stosunku do allelu BoLA DRB3.2*16 uzyskali również inni autorzy (10-12). Stwierdzili oni istotny spadek liczby komórek somatycznych w grupie krów będących nosicielkami tego allelu. W związku z tym w badanej populacji przeanalizowano wpływ interakcji genotypów BoLA-DRB3 i laktoferyny na liczbę komórek somatycznych (tab. 2). Krowy o genotypach AA i AB laktoferyny oraz będące jednocześnie nosicielkami allelu BoLA-DRB3*16 charakteryzowały się istotnie ($p < 0,01$) niższą liczbą komórek somatycznych w mleku w stosunku do krów będących nosicielkami allelu BoLA-DRB3*23. Również zwierzęta o genotypie laktoferyny AA nie będące nosicielkami allelu BoLA-DRB3*16 i 23 miały istotnie niższą liczbę komórek somatycznych w stosunku do krów o genotypie laktoferyny AA będących nosicielkami allelu BoLA-DRB3*23. Z drugiej strony, krowy o genotypie AB laktoferyny, u których nie występował allelu BoLA-DRB3*16, charakteryzowały się istotnie ($p < 0,01$) wyższą liczbą komórek somatycznych. Z powodu zbyt małej liczebności nie wszystkie warianty interakcji mogły być przeanalizowane. Jednakże najmniej korzystna z punktu widzenia występowania *mastitis* wydaje się interakcja genotypów BoLA-DRB3*23 i AB laktoferyny. Badanie interakcji dwóch genów wykazało, że nałożenie się wpływu dwóch genów pozwoliłoby wyeliminować z populacji osobniki najbardziej pogarszające liczbę komórek somatycznych.

Podsumowując, najbardziej korzystnym z punktu widzenia ograniczenia występowania *mastitis* wydaje się genotyp BB laktoferyny, jednakże występuje on w populacji bydła z niską częstotliwością. Warto zaznaczyć, że zwierzęta charakteryzujące się tym genotypem nie były spokrewnione. Z powodu niskiej frekwencji genotypu BB laktoferyny niemożliwe było uwzględnienie wpływu interakcji genotypu BB lakto-

feryny i BoLA-DRB3*16 na liczbę komórek somatycznych w mleku krów. Oczekuje się, że osobniki, u których występuje ta interakcja, będą najmniej podatne na zapalenie wymienia, wymaga to jednak dalszych badań.

Piśmiennictwo

1. Buczek J., Deptuła W., Gliński Z., Jarosz J., Stosik M., Wernicki A.: Immunologia porównawcza i rozwojowa zwierząt. Wyd. Naukowe PWN, Warszawa 2000, 277-345.
2. Fang W., Oliver S. P.: Identification of lactoferrin-binding proteins in bovine mastitis-causing *Streptococcus uberis*. FEMS Microbiol. Lett. 1999, 176, 91-96.
3. Kelm S. C., Detilleux J. C., Freeman A. E., Kehrl M. E., Dietz A. B., Fox L. K., Butler J. E., Kasckovics I., Kelley D. H.: Genetic association between parameters of innate immunity and measures of mastitis in periparturient Holstein cattle. J. Dairy Sci. 1997, 80, 1767-1775.
4. Li G., Zhang Y., Sun D., Li N.: Study on the polymorphism of bovine lactoferrin gene and its relationship with mastitis. Animal Biotechnol. 2004, 15, 67-76.
5. Sender G.: Odporność na mastitis jako składowa celu hodowlanego w programach doskonalenia bydła mlecznego. Prace Mat. Zoot. 2001, 12 zesz. specj. 1-61.
6. Sender G., Korwin-Kossakowska A., Stepińska U.: Wykorzystanie markerów genetycznych w programie zwalczania mastitis. Medycyna Wet. 2003, 59, 853-856.
7. Sender G., Korwin-Kossakowska A., Galak B.: Wpływ polimorfizmu genu BoLA-DRB3 na występowanie mastitis u krów. Medycyna Wet. 2005, 61, 540-542.
8. Seyfert H. M., Henke M., Interthal H., Klusmann U., Koczan D., Natour S., Pusch W., Senft B., Steinhoff U. M., Tuckoricz A., Hobom G.: Defining candidate genes for mastitis resistance in cattle: the role of lactoferrin and lysozyme. J. Anim. Breed. Genet. 1996, 113, 269-276.
9. Seyfert H. M., Kuhn C.: Characterization on a first bovine lactoferrin gene variant, based on an EcoRI polymorphism. Anim. Genet. 1994, 25, 54.
10. Sharif S., Mallard B. A., Sargeant J. M.: Presence of glutamine at position 74 of pocket 4 in the BoLA-DR antigen binding groove is associated with occurrence of clinical mastitis caused by *Staphylococcus* species. Vet. Immunol. Immunopathol. 2000, 76, 231-238.
11. Sharif S., Mallard B. A., Wilkie B. N., Sargeant J. M., Scott H. M., Dekkers J. C. M., Leslie K. E.: Associations of the bovine major histocompatibility complex DRB3 (BoLA-DRB3) alleles with occurrence of disease and milk somatic cell score in Canadian dairy cattle. Anim. Genet. 1998, 29, 185-193.
12. Starkenburg R. J., Hansen L. B., Kehrl M. E., Chester-Jones H.: Frequencies and effects of alternative DRB3.2 alleles of bovine lymphocyte antigen for Holsteins in milk selection and control lines. J. Dairy Sci. 1997, 80, 3411-3419.

Adres autora: doc. dr hab. Grażyna Sender, ul. Główna 26, 05-500 Żabieniec; e-mail: g.sender@ighz.pl