

УДК 577:575:636.1

ПЛР-ДІАГНОСТИКА ВАЖКОГО КОМБІНОВАНОГО ІМУНОДЕФІЦИТУ (SCID) У КОНЕЙ

Ю. Ф. Куриленко¹, С. О. Костенко¹, О. В. Дубін¹, М. І. Жежер²
Yura236@ukr.net

¹Національний університет біоресурсів і природокористування України, м. Київ 03041, вул. Героїв Оборони 12

²НФ ПрАТ «Райз-Максимко», пр-т Перемоги, 121 в, 03115 м. Київ

Важкий комбінований імунodefіцит (SCID) — спадкове захворювання арабських та помісних коней, що характеризується повною втратою імунної відповіді внаслідок делеції п'яти пар нуклеотидів в гені ДНК-залежної протеїнкінази С. Протеїнкіназа С є одним з найважливіших ферментів, що бере участь в перебудові сегменту гену під час синтезу В- і Т-клітинних рецепторів. Лошата народжуються здоровими, але гинуть від будь-яких інфекцій, так як припиняють функціонування колостральні антитіла, а власна імунна система не працює належним чином. SCID проявляється лише у гомозиготному стані і характеризується 100 % смертністю, при цьому гетерозиготні тварини не мають ніяких фенотипових проявів хвороби і являються носіями. Тому метою даної роботи був генетичний моніторинг коней арабської породи Ягільницького кінного заводу на наявність мутації SCID.

Матеріалом для дослідження слугували волосяні фолікули 16 голів коней арабської породи. Дослідження проведені за

використання методу ПЛР із використанням специфічних праймерів, за допомогою яких ампліфікується необхідний фрагмент гену розміром 136 або 131 п. н. у здорових та мутантних особин відповідно. Електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації проводили у 8 % нативному поліакриламідному гелі (ПААГ) з наступним аналізом довжин ампліфікованих фрагментів. За результатами проведеного нами моніторингу популяції коней арабської породи на наявність мутації в гені ДНК-залежної протеїнкінази С (DNA-PKc) серед досліджених тварин не було виявлено носіїв SCID. Планується продовжити дослідження на інших популяціях коней арабської породи в Україні.

Ключові слова: АРАБСЬКА ПОРОДА КОНЕЙ, ВАЖКИЙ КОМБІНОВАНИЙ ІМУНОДЕФІЦИТ, SCID, КІНЬ СВІЙСЬКИЙ, МУТАЦІЯ, ПОЛІМЕРАЗНА ЛАНЦЮГОВА РЕАКЦІЯ

PCR-DIAGNOSTICATION OF SEVERE COMBINED IMMUNODEFICIENCY DISEASE (SCID) IN HORSES

Y. F. Kurylenko¹, S. O. Kostenko¹, O. V. Dubin¹, M. I. Zhezher²
Yura236@ukr.net

¹National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Heroiv Oborony str., 15; Kyiv, 03041, Ukraine

²NF PJSC «Rayz-Maksimko», avenue Peremogi, 121 v, 03115, Kyiv

The severe combined immunodeficiency (SCID) is a hereditary disease of the Arabian and cross-breed horses, characterized by a complete loss of the immune response due to a mutation in the gene for DNA-dependent protein kinase C. Protein kinase C is one of the most important enzymes involved in the reconstruction of the gene

segment in the synthesis and T - cell receptor. The foals are born healthy but die of any infections since ceased functioning colostral antibodies, and its own immune system does not work properly. SCID is manifested only in the homozygous state and is characterized by 100 % mortality, while heterozygous animals do not have any phenotypic

manifestations of the disease and are carriers. Therefore, the aim of this work was the genetic monitoring of Arabian breed horses of Yagilnitskiy stud farm for the presence of SCID mutation.

The material for the study was the hair follicles of 16 Arabian horses. Studies carried out using PCR using specific primers with which the desired gene fragment is amplified size 136 or 131 bp from healthy individuals and mutant respectively. Electrophoretic separation of the amplification products was performed in 8% native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) followed by analysis of the lengths of the amplified fragments. Investigations was

conducted with using PCR followed by analysis of the lengths of the amplified fragments. The result of monitoring Arabian horse breed was the presence of mutations in DNA-dependent protein kinase C (DNA-PKc) of test animals showed no carriers SCID. It is planned to continue research on other populations of the Arabian breed of horses in Ukraine.

Keywords: ARABIAN HORSE BREED, IMMUNODEFICIENCY, MUTATION, DNA-PKcs, POLYMERASE CHAIN REACTION

ПЦР-ДИАГНОСТИКА ЖЕСТКОГО КОМБИНИРОВАННОГО ИММУНОДЕФИЦИТА (SCID) У ЛОШАДЕЙ

Ю. Ф. Куриленко¹, С. А. Костенко¹, А. В. Дубин¹, М. И. Жежер²
Yura236@ukr.net

¹Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, г. Киев, ул. Героев Оборона, 12-Б, корп. 7-А, 03041, Украина

²НФ ЧАО «Райз-Максимко», пр-т Победы, 121 в, 03115, г. Киев

Тяжелый комбинированный иммунодефицит (SCID) — наследственное заболевание арабских и поместных лошадей, характеризуется полной потерей иммунного ответа вследствие делеции пяти пар нуклеотидов в гене ДНК-зависимой протеинкиназы С. Протеинкиназа С является одним из важнейших ферментов, участвует в перестройке сегмента гена при синтезе В- и Т-клеточных рецепторов. Жеребята рождаются здоровыми, но погибают от любых инфекций, так как прекращают функционирование колыбельного антитела, а собственная иммунная система не работает должным образом. SCID проявляется только в гомозиготном состоянии и характеризуется 100 % смертностью, при этом гетерозиготные животные не имеют никаких фенотипических проявлений болезни и являются носителями. Поэтому целью данной работы был генетический мониторинг лошадей арабской породы Ягильницкого конного завода на наличие мутации SCID.

Материалом для исследования послужили волосные фолликулы 16 голов лошадей арабской породы. Исследования проведены при использовании метода ПЦР с использованием специфических праймеров, с

помощью которых амплифицируемого необходимый фрагмент гена размером 136 или 131 п.н. у здоровых и мутантных особей соответственно. Электрофоретическое разделение продуктов амплификации проводили в 8 % нативном полиакриламидном геле (ПААГ) с последующим анализом длин амплифицированных фрагментов. По результатам проведенного нами мониторинга популяции лошадей арабской породы на наличие мутации в гене ДНК-зависимой протеинкиназы С (DNA-PKc) среди исследованных животных не было выявлено носителей SCID. Планируется продолжить исследования на других популяциях лошадей арабской породы в Украине.

Ключевые слова: АРАБСКАЯ ПОРОДА ЛОШАДЕЙ, ИММУНОДЕФИЦИТ, МУТАЦИЯ, ДНК-ЗАВИСИМАЯ ПРОТЕИНКИНАЗА, ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ

Важкий комбінований імунодефіцит (SCID — Severe Combined Immunodeficiency Disease) — генетично детерміноване захворювання, що поширене переважно у коней арабської

породи [1, 2]. Однак, слід зауважити, що SCID може спостерігатися також у помісних коней у зв'язку з широким використанням арабської породи для покращення інших.

Перші згадки про цю хворобу датуються 1960 р., коли були відмічені ознаки імунodefіциту в арабських коней австралійської популяції [3]. Вперше хворобу, як синдром, відкрили і описали McGuire і Poppie у 1973 р. [2, 0]. У 1980 р. Perryman і Torbeck показали, що SCID в арабських коней успадковується як аутомомна рецесивна ознака [5]. Лошата народжуються здоровими, але після двохмісячного віку, коли зникають колостральні антитіла, інфікуються і помирають від будь-якої інфекції [0, 6, 7]. Важкий комбінований імунodefіцит (SCID) характеризується повною втратою клітинного та гуморального імунітету, внаслідок чого хворі тварини стають сприйнятливими до будь-яких інфекційних захворювань. SCID проявляється лише у гомозиготному стані і характеризується 100 % смертністю, при цьому гетерозиготні тварини не мають ніяких фенотипових проявів хвороби і являються носіями SCID [0].

Імунodefіцит коней є наслідком рецесивної аутомомної мутації в гені ДНК-залежної протеїнкінази С (DNA PKcs — DNA dependent protein kinase catalytic subunit), що призводить до втрати її ферментативної активності, блокування ключового процесу в дозріванні В- і Т-лімфоцитів і, як наслідок, до імунodefіциту [9]. Молекулярною основою мутації SCID є делеція п'яти пар нуклеотидів із каталітичної субодиниці ДНК-залежної протеїнкінази С. Мутація призводить до зсуву рамки зчитування в кодоні 3155 транскрипту, що призводить до втрати 967 амінокислоти з С-кінця, який включає цілий фосфатидилінозитол-3-кіназний домен, роблячи таким чином неактивною DNA-ПКс. Протеїнкіназа С є одним з найважливіших ферментів, що бере участь в перебудові сегменту гену під час синтезу В- і Т-клітинних рецепторів.

Внаслідок втрати функціональної активності ДНК-залежної протеїнкінази С відбувається часткове блокування рекомбінації V (D)J сегментів — лімфоцитоспецифічного процесу, необхідного для експресії антигенних рецепторів на В- і Т-клітинах. Цей дефект у рекомбінації V (variable), D (diversity) і J (joining) сегментів гену блокує диференціацію В- і Т-лімфоцитів, що викликає імунodefіцит [9].

У 1997 р. лабораторія VetGen (Michigan, USA) розпочала тестування арабських і помісних коней на предмет наявності мутації SCID. З 1997 по 31 грудня 2011 р. було прогенотиповано більше 10000 голів, з яких 15,73 % виявилися носіями і 0,30 % — хворими [00]. Однак, в Україні до цього часу не були досліджені тварини арабської породи.

Мета роботи — генетичний моніторинг коней арабської породи Ягільницького кінного заводу на наявність мутації SCID.

Матеріали і методи

Матеріалом для дослідження були волосяні фолікули коней арабської породи (n=16), що належать Ягільницькому кінному заводу (с. Нагірянкa, Тернопільська обл.). Виділення геномної ДНК проводили за методикою сорбції ДНК на силіцій оксиді [12] з власними модифікаціями.

ПЛР проводили на ампліфікаторі «Терчик» за таким температурним режимом: початкова денатурація — 4 хв за 94 °C; 36 циклів: 20 с за 94 °C, 20 с за 56°C, 20 с за 72 °C; термінальна елонгація — 5 хв за 72 °C.

Реакційна суміш об'ємом 20 мкл містила: 67 mM Tris-HCl (pH 8,8), 17 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01 % Tween-20, 0,2 mM dNTP, 1 од. Tag-полімерази, 100 нг геномної ДНК, 2,0 mM MgCl₂ та 0,3 мкМ праймерів. Нуклеотидні послідовності праймерів були наступними:

GTTGGTCTTGTCATTGAGCTG і
GCATCCGGATATCTGTTTGTC.

Електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації проводили у 8 % нативному поліакриламідному гелі (ПААГ) за використання 0,5×TBE-буфера. Після завершення електрофорезу гель обробляли бромистим етидієм (0,5 мкг/мл), і фотографували ПЛР-продукти за допомогою відеосистеми GelDoc XR System за використання програмного пакету Quantity One (BioRad, США). Молекулярну масу ПЛР-продуктів визначали за маркером GeneRuler 20 bp (Fermentas, Литва).

Результати й обговорення

Оскільки причиною SCID є випадіння 5 bp в гені ДНК-залежної протеїнінази, що призводить до передчасної термінації транскрипції [1, 11], ми застосували достатньо простий метод виявлення мутації SCID, використовуючи специфічні праймери, за допомогою яких ампліфікується необхідний фрагмент гену розміром 136 або 131 п.н. у здорових та мутантних

особин відповідно. У результаті ретельно проведеного електрофорезу не виявлено відмінностей між довжинами фрагментів, які б свідчили про наявність делеції і таким чином про присутність гетерозиготних особин (рис. 1). Отже, результати досліджень показують, що серед досліджених тварин немає носіїв SCID.

За різними даними частота мутантного алеля значно варіює в залежності від регіону. Близько 8–9 % арабських коней з різних країн є прихованими носіями SCID, яких можна виявити лише за допомогою ДНК-технологій [1]. Всесвітня організація арабських коней (The World Arabian Horse Organization — WAHO) не запроваджує обов'язкового тестування арабських коней, не вводить ніяких обмежень до розведення для носіїв SCID, але підтримує концепцію добровільного тестування, виявлення носіїв та заохочує коневласників і селекціонерів до цього.

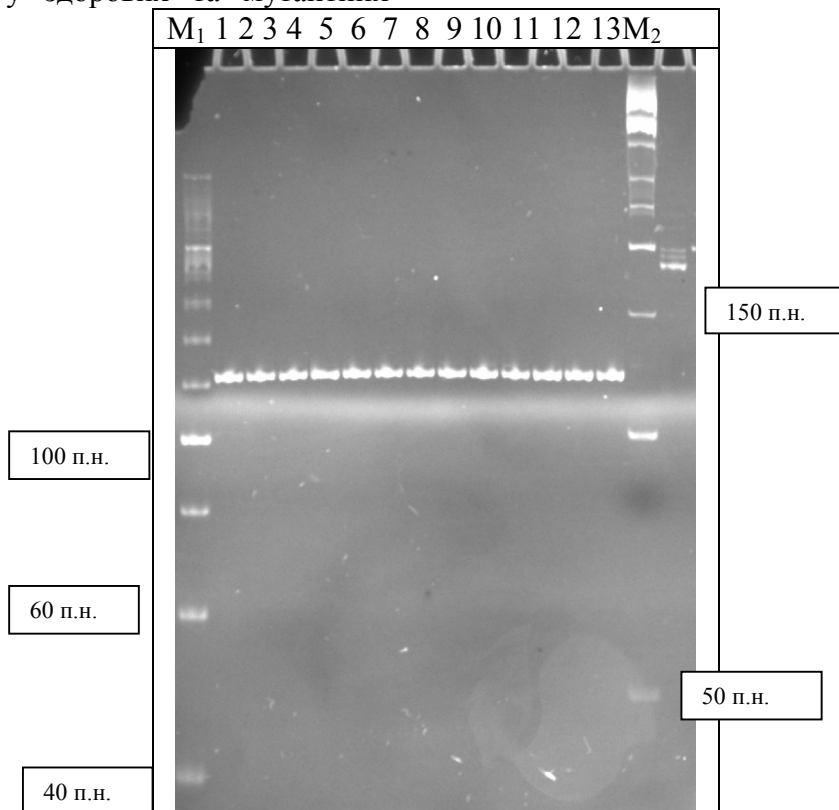


Рис. 1. Електрофореграма результатів ПЛР-аналізу фрагменту DNA-ПКс: M₁ — маркер молекулярних розмірів GeneRuler 20 bp., M₂ — маркер молекулярних розмірів GeneRuler 50 bp

Норвезькою асоціацією арабських коней у 2009 р. були проведені добровільні дослідження. Серед 16 прогенотипованих тварин носіїв не виявлено [00]. Скринінгові дослідження були здійснені Інститутом генетики і цитології НАН Білорусії в 2008 р., з 56 арабських і помісних коней носіїв і хворих не виявлено. У 2005 р. прогенотиповано 128 арабських коней у Словенії, мутантних тварин не знайдено [3]. У 2008 р. вченими з Марокко (Piro M., Benjouad A. et al.) серед 353 арабських та помісних тварин було ідентифіковано 21 носій SCID [11].

Висновки

За результатами проведеного моніторингу популяції коней арабської породи на наявність мутації в гені ДНК-залежної протеїнкінази С (DNA-ПКс) серед досліджених тварин не було виявлено носіїв SCID. Враховуючи імовірність імпорту на територію України арабських коней та необхідність контролю поширення цього захворювання, вважаємо доцільним продовжити ПЛР-діагностику мутації SCID.

Перспективи подальших досліджень. Планується продовжити дослідження на інших популяціях коней арабської породи в Україні.

1. Bercono D., Bailey E. Frequency of the SCID gene among Arabian horses in the USA. *Animal Genetics*, 1998, vol. 29, pp. 41–42.

2. Shin E. K., Perryman L. E., Meek K. Evaluation of the test for identification of Arabian horses heterozygous for the severe combined immunodeficiency trait. *Journal of the American Medical Association*, 1997, vol. 211, pp. 1268–1270.

3. Zavrtanec J., Mesaric M., Majdic G. Genetic monitoring for severe combined immunodeficiency carries in horses in Slovenia. *Slovenian veterinary research*, 2005, no. 42, pp. 37–41.

4. Chrabrova L. A. Geneticheskie anomalii i bolesni loshadei [Genetic abnormalities and diseases of horses]. *Konevodstvo i konniy sport — Horse breeding and equestrian sports*, 2006, no. 6, pp. 19–21 (in Russian).

5. Perryman L. E., Torbeck R. L. Combined immunodeficiency of Arabian horses: confirmation of autosomal recessive mode of inheritance. *Journal of the American Medical Association*, 1980, vol. 176, pp. 1250–1251.

6. Robinson R. Genetic defects in the horse. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 1989, no. 106, pp. 475–478.

7. Ding Q., Bramble L., Yuzbasiyan-Gurkan V., Bell T., Meek K. DNA-PKcs mutations in dogs and horses: allele frequency and association with neoplasia. *Gene*, 2002, vol. 283, pp. 263–269.

8. Perryman L. E. Primary immunodeficiencies of horses. *Veterinary Clinic North American Equine Practice*, 2000, vol. 16, pp. 105–106.

9. Georgescu S. E., Condac E., Dinischiotu A. Molecular basis and diagnostics of SCID in Arabian Horses. *Roumanian Biotechnological Letters*, 2006, vol. 11, no. 5, pp. 2875–2879.

10. Arabian Horse Association, 2012 Available at: http://www.arabianhorses.org/education/genetic/docs/12Genetic_SCID_2012.pdf

11. Piro M., Benjouad A., Tligui N. S. et al. Frequency of the severe combined immunodeficiency disease gene among horses in Morocco. *Equine Veterinary Journal*, 2008, vol. 40, pp. 590–591.

12. Carter M. J., Milton I. D. An inexpensive and simple method for DNA purifications on silica particles. *Nucleic Acids Res.*, 1993, vol. 21, pp. 1044–1046.