

# Wykrywanie w genomie zwierząt mutacji istotnych gospodarczo na przykładzie podatności świń na stres

Tadeusz Blicharski, Jolanta Kurył,  
Grażyna Faliszewska, Mariusz Pierzchała,  
Grzegorz Grzybowski

IGiHZ PAN w Jastrzębcu

Rozpoznano już wiele dziedzicznych anomalii u różnych gatunków zwierząt, związanych z dysfunkcją, całkowitą utratą funkcji genu (genów) lub całkowitym brakiem określonych produktów genowych. Obiektem zainteresowania genetyków i hodowców są zwłaszcza te defekty, które w widoczny sposób zmieniają status funkcjonalny organizmu i wpływają na zdrowie, rozród lub higienę i jakość produktów konsumpcyjnych. Skala obciążenia puli genowej populacji takimi anomaliami jest trudna do zdefiniowania. Większość z nich ma recesywny charakter i nie ujawnia się w genotypach heterozygotycznych. Jeżeli w genomie powstanie recesywna mutacja niekorzystnie oddziałująca na którąś z cech przystosowawczych, ale jednocześnie wiążąca się korzystnie (z zasady przypadkowo) z priorytetem selekcyjnym, wtedy wystąpienie po pewnym czasie jej skutku biologicznego jest nieuchronne. Priorytet selekcyjny potęguje skalę nagromadzenia defektu w puli genów, co po pewnym czasie prowadzi do nieuniknionych kojarzeń nosicieli i masowego pojawiania się homozygotycznych genotypów recesywnych. Kiedy u potomstwa losowo kojarzonych zwierząt wystąpią pierwsze przypadki fenotypowego ujawniania się defektu, oznacza to, że jego nagromadzenie w puli genowej populacji musi być znaczne.

Na tle powyższych uwarunkowań ujawnia się potrzeba stałego rozwijania badań nad genomem zwierząt gospodarskich, gdyż najskuteczniejszą metodą przeciwdziałania problemom wynikającym z obciążenia populacji recesywnymi anomaliami jest rozpoznanie patologicznej formy ujawniania się wady, a następnie wczesne wykrywanie i eliminowanie nosicieli. Anomalie genowe powstają spontanicznie, co sprawia, że nawet po uwolnieniu populacji od określonego defektu może się on pojawić ponownie, a jego szybkiemu rozprzestrzenieniu sprzyjają współczesne biotechniki rozrodu, międzynarodowy handel zwierzętami i materiałem biologicznym, itp.

Przykładem ogniskującym w sobie wiele różnorodnych zagadnień genetyczno-hodowlanych o istotnym znaczeniu gospodarczym i jednocześnie dobrze charakteryzującym „jastrzębiecki” nurt badań zmian czynnościowych u zwierząt wywołanych zmianami w sekwencji DNA (określa się je jako „defekty” lub choroby genetyczne), są badania nad zespołem gorączki złośliwej świń – MHS (malignant hyperthermia syndrome). Badania tego zagadnienia zostały uwieńczone odkryciem molekularnego podłoża MHS, co otworzyło możliwości niezawodnej identyfikacji mutacji przyczynowej o wielorakim pleiotropowym wpływie na cechy mięsności i jakości tuszy, a także oddziałującym na homeostazę organizmu.

Zagadnienia związane z zespołem gorączki złośliwej świń, które m.in. stymulowały na świecie podjęcie szerokich badań w dziedzinie ludzkiej farmakogenetyki, są także świadectwem na wspólnotę zjawisk biologicznych i dokumentują fakt, iż eksperymenty prowadzone na modelowym gatunku zwierząt gospodarskich mogą być wykorzystane w dziedzinie badań medycznych, bardzo odległych od hodowli. W wielu chorobach genetycznych u ludzi, eksperymentalnym obiektem badań nad etiologią tych dysfunkcji są zwierzęta. Molekularne podłoże chorób dziedzicznych u ludzi i zwierząt jest często identyczne. Taka sytuacja ma miejsce m.in. w przypadku immunologicznej dysfunkcji – niedoboru cząstek adhezyjnych BLAD u bydła i ludzkiego LAD oraz bydłowego zespołu DUMPS i kwasicy orotowej u ludzi. Zespół gorączki złośliwej (MH), wywołowany podaniem drogą wziewną halotanu, występuje także u ludzi (1:15 000 dzieci i 1:100 000 dorosłych) i w wielu przypadkach predyspozycja do MH ma identyczne genetyczne podłoże jak u świń.

W 1986 roku zainicjowano w IGiHZ PAN badania „Zależność między *locus* wrażliwości halotanowej u świń a cechami użytkowymi”, które przekształciły się w szeroki nurt analiz związanych z wykorzystaniem markerów genetycznych w programach mapowania genomu świń. Podjęcie tego zagadnienia miało ścisły związek z ówczesną sytuacją w hodowli świń, zwłaszcza w krajach Europy Zachodniej. W związku z ukierunkowaniem hodowli trzody chlewnej na zwiększanie mięsności tuszy, pojawiła się, najpierw w ograniczonym stopniu, a później w znaczącym ekonomicznie zakresie, genetycznie uwarunkowana wada określana skrótem MHS (znana także pod nazwą PSS – świński syndrom stresowy). Charakterystyczne symptomy obserwowane u niektórych osobników poddawanych narkozie wziewnej z użyciem anestetyku halotanu (tzw. „sztywność halotanowa” mięśni z postępującymi zaburzeniami w krążeniu krwi, co bez natychmiastowego przerwania narkozy prowadziło do śmierci zwierzęcia), to tylko niektóre z przejawów zespołu MHS. Nawet po przerwaniu aplikowania halotanu u dużego odsetka osobników wrażliwych rozwijał się groźny dla życia zespół gorączki złośliwej. Objawiało się to szybkim wzrostem temperatury ciała (do 42°C), co często prowadziło do upadków. Okazało się także, że mięso większości (około 80%) osobników wrażliwych na halotan było po uboju blade (pale), miękkie (soft) i wodniste (exudative), tzw. PSE, co powodowało istotne obniżenie jego wartości technologicznej.

Zagadnienia związane z zespołem MHS oraz obniżeniem wartości technologicznej wieprzowiny (PSE) ujawniły się w Polsce jako problem hodowlano-technologiczny wraz z wprowadzeniem do programów hodowlanych świń rasy landrace, najpierw linii belgijskiej, a następnie niemieckiej. Spowodowało to również w krajowej populacji świń landrace stały wzrost udziału mięsa o cechach PSE. Okazało się wkrótce, że wspomniana wrażliwość świń na aplikowanie drogą wziewną halotanu jest tylko fragmentem szerszego zjawiska, gdyż zwierzęta, u których występowała „sztywność halotanowa” są szczególnie podatne na różnorodne bodźce stresowe. Dotyczyło to nawet takich sytuacji, które w produkcji uznaje się za całkowicie normalne (np. transport, przepędzanie). Mechanizm zaburzeń homeostazy składa się z kaskady potęgujących się zjawisk metabolicznych, które wraz z nasilającymi się zaburzeniami w krążeniu krwi mogą prowadzić do upadku. Bodziec stresowy wyzwała u osobników wrażliwych gwałtowny wpływ jonów wapnia z komórki. Na skutek gwałtownego rozkładu glikogenu dochodzi w mięśniach do spadku pH poniżej wartości 5,8 i wzrostu temperatury powodującej denaturację białek, co z kolei obniża ich zdolność wiązania wody. Po uboju (czynności poprzedzające ubój są dla zwierząt silnie stresogenne) mięso osobników wrażliwych wykazuje cechy PSE.

Tabela 1

Liczebność genotypów w *locus* RYR1 w populacji knurów przebadanych w latach 2004-2007

Rasa	Lata 2004-2005			2006 rok			1.01-3.10.2007 r.		
	genotyp			genotyp			genotyp		
	RYR1 <sup>CC</sup>	RYR1 <sup>CT</sup>	RYR1 <sup>TT</sup>	RYR1 <sup>CC</sup>	RYR1 <sup>CT</sup>	RYR1 <sup>TT</sup>	RYR1 <sup>CC</sup>	RYR1 <sup>CT</sup>	RYR1 <sup>TT</sup>
pbz	599	214	18	312	65	6	218	45	3
wbp	583	52	2	260	11	2	118	9	–
duroc	44	5	–	36	4	–	19	3	–
pietrain	3	11	4	14	9	1	5	3	1
hampshire	9	2	–	7	–	–	4	–	–

Tabela 2

Liczebność genotypów w *locus* RYR1 w populacji loch i loszek przebadanych w latach 2004-2007

Rasa	Lata 2004-2005			2006 rok			1.01-3.10.2007 r.		
	genotyp			genotyp			genotyp		
	RYR1 <sup>CC</sup>	RYR1 <sup>CT</sup>	RYR1 <sup>TT</sup>	RYR1 <sup>CC</sup>	RYR1 <sup>CT</sup>	RYR1 <sup>TT</sup>	RYR1 <sup>CC</sup>	RYR1 <sup>CT</sup>	RYR1 <sup>TT</sup>
pbz	71	12	–	156	24	–	1957	622	23
wbp	82	9	–	138	12	–	1228	97	4
duroc	14	4	–	9	–	–	157	6	–
pietrain	–	1	1	–	1	–	14	30	21
hampshire	–	–	–	–	–	–	5	1	–

Poprzez analizę sprzężeń z polimorficznymi *loci* białek i grup krwi ustalono, że hipotetyczny gen będący sprawcą tego zjawiska (tzw. „gen halotanowy”, zwany także „genem podatności stresowej”) jest umiejscowiony w chromosomie 6. W populacji świń występują osobniki o trzech genotypach: HAL<sup>N</sup>/HAL<sup>N</sup> (genotypy normalne), HAL<sup>N</sup>/HAL<sup>n</sup> (nosiciele mutacji) i HAL<sup>n</sup>/HAL<sup>n</sup> (homozygoty recesywne, wrażliwe na halotan). Uszeregowanie *loci* grupy sprzężeniowej wrażliwości na halotan umożliwiało odróżnienie, już we wczesnym etapie chowu, osobników wrażliwych na czynniki stresowe (homozygot recesywnych) od heterozygot (nosicieli genu recesywnego), bez konieczności poddawania ich testowi narkozy wziewnej. Wspomniana procedura (tzw. haplotypowanie) była jednak stosunkowo uciążliwa, gdyż wymagała testowania wielu markerów, a wnioskowanie utrudniały także przypadki rekombinacji w obrębie *loci* grupy sprzężeniowej. W późniejszych badaniach dotyczących metabolizmu mięśni szkieletowych u świń (wyniki na temat występowania MHS u świń stymulowały także podejmowanie licznych prac z dziedziny ludzkiej farmakogenetyki, gdyż genetyczną podatność na halotan wykazywali także niektórzy pacjenci poddawani narkozie wziewnej) wykazano, że u podłoża anomalii MHS leży wadliwe funkcjonowanie kanałów wapniowych. Polega to na zbyt intensywnym w stosunku do siły bodźca transporcie jonów Ca<sup>++</sup> z reticulum endoplazmatycznego do cytoplazmy komórek. Z tego względu defekt odpowiedzialny za nieprawidłowy metabolizm jonów Ca<sup>++</sup> określa się także jako mutację genu kanału uwalniania jonów wapnia (ang. calcium release channel). Wreszcie, w 1991 roku, badacze kanadyjscy zidentyfikowali mutację genu receptora ryanodiny, jednej z podjednostek kanału wapniowego w mięśniach szkieletowych (stąd oznaczenie RYR1), jako mutację odpowiedzialną za występowanie zespołu MHS. Jest to podstawienie C→T w nukleotydzie nr 1843, a jego wynikiem jest zastąpienie arginy przez cysteinę w 615 pozycji sekwencji aminokwasowej w białku, co istotnie wpływa na jego funkcję biologiczną. Opracowany w Kanadzie molekularny test identyfikacyjny (jego „jasztrzębieką” modyfikację stosuje się w badaniach własnych)

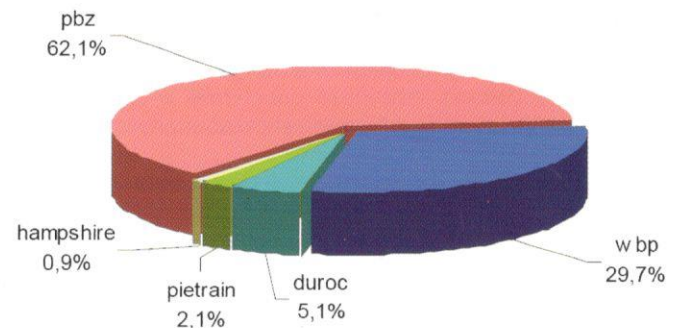
pozwoił na wczesną, niezawodną identyfikację zarówno homozygot, jak i nosicieli mutacji.

Według obecnie stosowanej nomenklatury przy genotypowaniu, RYR1<sup>C</sup> oznacza allel normalny, natomiast zmutowany allel wrażliwości stresowej oznacza się jako RYR1<sup>T</sup>. Genotyp osobnika normalnego oznacza się zatem jako RYR1<sup>C/C</sup>, genotyp nosiciela – RYR1<sup>C/T</sup>, a genotyp osobnika wrażliwego – RYR1<sup>T/T</sup>. Takie nazewnictwo jest synonimem wspomnianych, tradycyjnych oznaczeń: HAL<sup>N</sup>/HAL<sup>N</sup>, HAL<sup>N</sup>/HAL<sup>n</sup> i HAL<sup>n</sup>/HAL<sup>n</sup>.

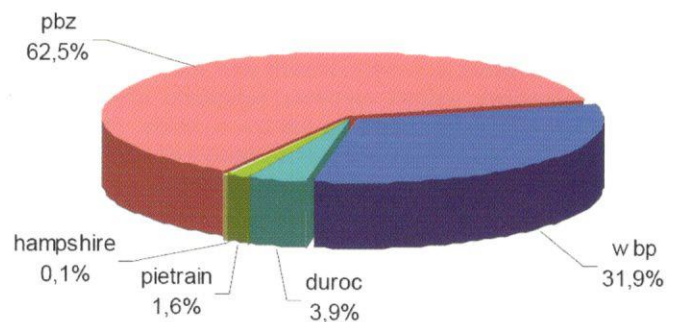
Recesywny allel RYR1<sup>T</sup> (HAL<sup>n</sup>) jest, jak dotąd, jedynym genem o udowodnionym istotnym oddziaływaniu na cechy jakości tuszy i mięsa świń. Ponieważ wpływa korzystnie na wydajność rzeźną, stąd często jest określany jako „główny gen mięsności”. W zakresie mięsności i jakości tuszy czy reprodukcji poszukuje się także innych genów (tzw. QTLs) wpływających

na te cechy, co jest jednym z celów programów mapowania genomu świń.

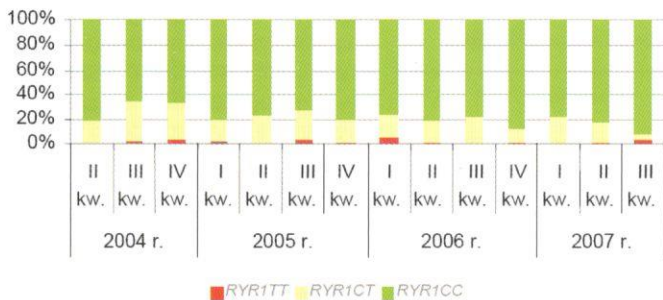
Z informacji przedstawionych w niniejszym artykule wynika, że obecność allelu RYR1<sup>T</sup> w puli genowej populacji może być źródłem obiektywnej sprzeczności w selekcji świń, gdyż doskonalenie cech mięsności (selekcja pozytywna na RYR1<sup>T</sup>) może stwarzać przeszkody w uzyskiwaniu wieprzo-



Rys. 1. Procentowy udział knurów poszczególnych ras zbadanych w kierunku wrażliwości na stres w okresie 1.01.-30.09.2007 r.



Rys. 2. Procentowy udział loch i loszek poszczególnych ras zbadanych w kierunku wrażliwości na stres w okresie 1.01.-30.09.2007 r.



Rys. 3. Udział alleli w locus RYR1 w zbadaanej populacji knurów rasy pbz

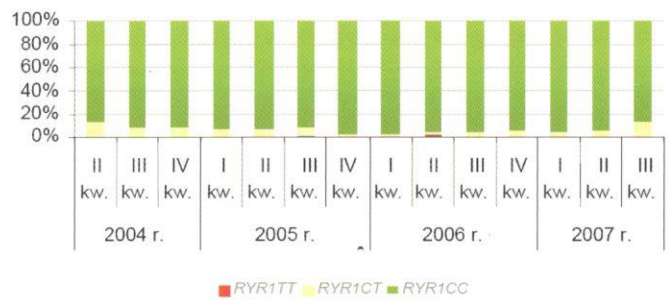
winy o odpowiedniej jakości i przydatności technologicznej. Dlatego monitorowanie materiału hodowlanego pod kątem obciążenia allelem RYR1<sup>T</sup> winno być przedmiotem stałej troski hodowców oraz przemysłu mięsnego. Tylko wczesna informacja o genotypie zwierząt odchowywanych z przeznaczeniem do rozrodu jest obiektywnym narzędziem, które umożliwia odpowiedni dobór zwierząt pod kątem uzyskania założonego celu selekcyjnego i ekonomicznego.

Wykonywane w IGiHZ PAN w Jastrzębcu analizy molekularne, dotyczące wykrywania podatności stresowej świń, mają obecnie charakter szerokiego programu uwalnia krajowej hodowli od tego problemu, który realizowany jest w ścisłej współpracy z Polskim Związkiem Hodowców i Producentów Trzody Chlewnej „POLSUS” (ze strony PZHiPTCh „POLSUS” nadzór nad sprawnym jej przebiegiem sprawuje Pani Martyna Snopkiewicz). Zakład Immunogenetyki Zwierząt IGiHZ PAN posiada ustawowe uprawnienia do przeprowadzania analiz grup krwi i białek krwi oraz markerów DNA, które wykonuje na masową skalę dla potrzeb praktyki hodowlanej.

Molekularnemu monitorowaniu genomu poddawany jest materiał pięciu ras z hodowli zarodowej: pbz, wbp, duroc, pietrain i hampshire. W latach 2004-2007 przebadano łącznie 4588 knurów, loch i loszek użytkowanych rozplodowo lub przeznaczonych do rozrodu. Procentowy udział knurów i loszek poszczególnych ras w ogólnej puli osobników przetestowanych w 2007 r. przedstawiono na rysunkach 1 i 2. W tabelach 1 i 2 podano liczebność genotypów w locus RYR1 w poszczególnych grupach zwierząt przebadanych w latach 2004-2007.

Największą grupę rasową wśród przebadanych loch i knurów stanowią świnię pbz. Udział badanych zwierząt poszczególnych ras (rys. 1 i 2) odpowiada strukturze rasowej całej populacji świń hodowlanych w Polsce.

W pierwszym okresie realizowania programu główną uwagę poświęcono testowaniu materiału męskiego. We wszystkich rasach stwierdzono obecność nosicieli (genotyp RYR1<sup>CT</sup>). Knurów wrażliwych (genotyp RYR1<sup>TT</sup>) nie zidentyfikowano tylko w rasie duroc i hampshire. Allel RYR1<sup>T</sup> występował najczęściej u knurów rasy pbz, prawie 23% to nosiciele (genotyp RYR1<sup>CT</sup>), a 2% stawki to zwierzęta wrażliwe (genotyp RYR1<sup>TT</sup>). Wprawdzie w stawce przetestowanej w 2007 roku odsetek knurów-nosicieli pbz nieco się obniżył (21% osobników), jednak rozpowszechnienie allelu wrażliwości na stres należy uznać za bardzo wysokie. Przyczyną długiego utrzymywania się allelu wrażliwości na stres są także względy formalne. W początkowym okresie przeprowadzanie testowań materiału odchowywanego z przeznaczeniem do rozrodu było dobrowolne i dlatego badania prowadzono tylko w wybranych, najlepszych stadach. Wprowadzenie w 2007 roku obligatoryjności uwalniania stad od allelu wrażliwości na stres spowodowało, że badania zaczęto wykonywać także w stadach nigdy wcześniej nie monitorowanych. Właśnie w tym materiale allel RYR1<sup>T</sup> występował z naj-



Rys. 4. Udział alleli w locus RYR1 w zbadaanej populacji knurów rasy wbp

większą częstością (rys. 3 i 4). Zdecydowanego obniżenia frekwencji tego allelu w grupie knurów oczekiwać można po dłuższym okresie systematycznego niedopuszczania do rozrodu osobników o genotypie RYR1<sup>CT</sup> i RYR1<sup>TT</sup>, co uregulowano odpowiednimi zapisami w programie hodowlanym. Konieczne było także ograniczenie „dopływu” allelu RYR1<sup>T</sup> z populacji loch, potencjalnych matek knurów-reproduktorów i loszek. Odpowiednie zapisy regulujące to zagadnienie także zawarto w programie hodowlanym. Obecnie do stad wprowadzane są jedynie takie loszki remontowe, które pochodzą od obojga rodziców o udokumentowanym genotypie RYR1<sup>CC</sup> lub same zostały przebadane i mają potwierdzony genotyp RYR1<sup>CC</sup>. Tylko takie zwierzęta są dopuszczane do rozrodu. Dotyczy to także loch stadnych, które są już obecne w stadach. Zwierzęta te są sukcesywnie badane i jeśli mają genotyp inny niż RYR1<sup>CC</sup>, są eliminowane ze stada. Ich potomstwo nie trafia do hodowli, a jedynie do produkcji. Mając na uwadze powyższe kryteria, w 2007 roku kontynuowano badania materiału męskiego, główny nacisk kładąc na monitorowanie genomu loch. W trzech kwartałach bieżącego roku przebadano łącznie 4165 osobników. Największe rozpowszechnienie allelu RYR1<sup>T</sup> zanotowano w rasie pbz, a jego skala (prawie 25% całej stawki to lochy o genotypie RYR1<sup>CT</sup> lub RYR1<sup>TT</sup>) jest podobna jak w stawce knurów.

Chociaż zespół gorączki złośliwej to jeden z najwcześniej rozpoznanych defektów metabolicznych, który doczekał się licznych opracowań naukowych dotyczących aspektów fizjologicznych, biochemicznych, genetycznych i hodowlanych, wiedza o możliwym pleiotropowym oddziaływaniu allelu locus RYR1 (HAL) wydaje się wciąż niepełna. W wielu przypadkach trudno *a priori* definitywnie przesądzić o „przydatności” (lub „szkodliwości”) danego allelu w hodowli. Zatem obok kontynuacji prac nad eliminacją allelu RYR1<sup>T</sup> z populacji, jednocześnie konieczne jest pogłębienie wiedzy i badań z tego zakresu.

We wszystkich aktualnie prowadzonych programach hodowlanych uznaje się, iż obecność allelu RYR1<sup>T</sup> w genomie jest niepożądana. Jest to zasadnicza zmiana dotychczasowego podejścia, gdyż przez długi czas uważano, że genotyp RYR1<sup>CT</sup> stwarza przesłanki do uzyskania wysokiej mięsności-tuszy przy jednoczesnym zachowaniu dobrej jakości mięsa. Opinie przetwórców mięsa i ekonomistów wykazały jednak, że sumarycznie biorąc, obecność allelu RYR1<sup>T</sup> w puli genowej populacji jest niepożądana. Dlatego w dyrektywach określonych w krajowym programie hodowlanym stwierdzono, że świnię hodowlaną ras wbp, pbz, duroc i hampshire mają być wolne od tego allelu.

Przedstawione wyniki wskazują, że mimo niezawodności prowadzonych analiz molekularnych DNA, a także dużego zaangażowania sił i środków samej praktyki hodowlanej, do końca 2007 roku z pewnością nie dojdzie do pełnego uwolnienia stad od allelu RYR1<sup>T</sup>. Dla pełnego osiągnięcia tego celu prace winny być kontynuowane w następnych latach.