

**ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ДЕФЕКТ ОСТЕОПЕТРОЗА КРС: СОЗДАНИЕ
ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ДНК-ТЕСТА И АНАЛИЗ ЧАСТОТЫ ВСТРЕЧАЕМОСТИ
ЖИВОТНЫХ-НОСИТЕЛЕЙ МУТАЦИИ В РОССИЙСКИХ ПОПУЛЯЦИЯХ**

Коновалова Е.Н., Костюнина О.В., Романенкова О.С., Волкова В.В.

ФНЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста, Дубровицы, Подольск, Московская обл., Россия

Остеопетроз является летальным генетическим дефектом с простым соматическим рецессивным типом наследования, который первоначально был идентифицирован у мыши и человека. Цель данной работы – изучить клинические признаки болезни, особенности ее наследования, а также мутацию g.114437192_114439942del гена *SLC4A2*, являющуюся причиной остеопетроза у крупного рогатого скота. Разработана тест-система, базирующаяся на анализе ДНК методом АС-ПЦР, позволяющая идентифицировать мутантный аллель гена *SLC4A2*, ассоциированного с остеопетрозом, независимо от пола, возраста и физиологического состояния животных. С использованием разработанной тест-системы проведен скрининг российских популяций крупного рогатого скота абердин-ангусской, симментальской, герефордской и голштинской пород (n=1025), выявлены животные-носители остеопетроза в шести популяциях абердин-ангусской породы с частотой встречаемости 1,1-3,3%. Использование полученных результатов позволит получать информацию о наличии или отсутствии в генотипе животных мутантного аллеля, вызывающего развитие остеопетроза, и может быть рекомендовано в качестве средства профилактики проявления данного генетического дефекта у крупного рогатого скота за счёт исключения скрещивания животных-носителей между собой.

Ключевые слова: крупный рогатый скот, остеопетроз, генетический дефект, породы скота

Проблемы биологии продуктивных животных, 2019, 3: 20-26

Введение

Известно, что летальные генетические дефекты, причиной которых являются различные генные мутации (Петрова, 1997), являются одной из причин недостаточной эффективности отрасли мясного скотоводства, так как приводят к смертности телят или дополнительным затратам на их лечение (Gholap et al., 2014).

Остеопетроз (osteopetrosis, OS, мраморная кость) является летальным генетическим дефектом с простым соматическим рецессивным типом наследования, который первоначально был идентифицирован у мыши и человека (Murphy, 1969). У крупного рогатого скота заболевание встречается среди животных абердин-ангусской, герефордской, симментальской, голштинской и фризской пород (OMIA 000755-9913).. Первый случай заболевания крупного рогатого скота впервые был зарегистрирован в 1970 г. у теленка абердин-ангусской породы (Leipold et al., 1970). В последующем было описано еще несколько случаев заболеваний телят с клинической картиной и результатами гистологического исследования свойственными остеопетрозу (Ojo et al., 1975, Leipold et al., 1977).

Для заболевания характерно проявление следующих клинических признаков: больные телята обычно рождаются мертворожденными в период 250-275 дней стельности, т.е. на 10-30 дней раньше срока; они имеют небольшой размер тела и выраженные аномалии головы (рис.

1): плоский череп, пораженные коренные зубы, брахигнатию (недоразвитие нижней челюсти) и выступающий язык) (Mayers et al., 2010, McClure et al., 2016). Длинные кости укорочены, а их полости заполнены неабсорбированным первичным губчатым веществом, вследствие чего они очень хрупкие и легко ломаются (O'Toole et al., 2011).



Рис. 1а. Голова теленка, больного остеопетрозом (фото Meyers et al., 2010).

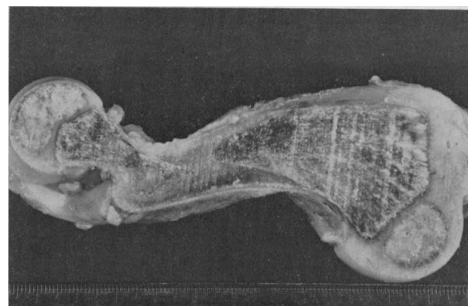


Рис. 1б. Продольный разрез плечевой кости, выявляющий полное отсутствие костномозговой полости (фото Leipold et al., 1970).

Несмотря на достаточно давнюю историю, истинная причина заболевания была установлена только в XXI веке (Mayers et al., 2010). Причиной дефекта, обуславливающего возникновение остеопетроза, является делеция гена члена A2 семейства 4 транспортеров растворенных веществ (анионообменников) (*SLC4A2*) (g.114437192_114439942del), расположенного на хромосоме 4. Мутация охватывает полностью экзон 2 и около половины экзона 3, в результате чего удаляются 2784 пар оснований ДНК (Mayers et al., 2010).

Целью данной работы была разработка тест-системы для выявления мутации g.114437192_114439942del гена *slc4a2*, ассоциированной с заболеванием остеопетроза, и анализ частот встречаемости мутантного аллеля у различных пород крупного рогатого скота.

Материал и методы

Исследования проведены в 2019 г. в лаборатории молекулярных основ селекции ФНЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста. В качестве материала исследований были использованы препараты ДНК, полученные по стандартным методикам (Зиновьева, 2002), накопленные в коллекции ДНК УНУ "Банк генетического материала животных и птиц" (n=1025). Пробы ДНК принадлежали животным 11 популяций абердин-ангусской (n=861), 1 популяции герефордской (n=49), 1 популяции голштинской (n=63) и 1 популяции симментальской пород (n=52).

Для диагностики остеопетроза был использован метод однопробирочной аллель-специфичной ПЦР (АС-ПЦР), для реализации которого посредством использования программы Primer3Plus (<http://primer3plus.com>) были подобраны олигонуклеотидные праймеры, характеристика которых представлена в табл. 1. ПЦР проводили при помощи амплификаторов Analytikjena Flex Cycler Block Assembly 96G и Biometra Professional Thermocycler Standard 96 Gradient (Biometra, Германия) в реакционной смеси объемом 10 мкл, состоящей из 1хПЦР буфера (16.6 мМ (NH₄)₂SO₄, 67.7 мМ Трис-НСl, рН=8.8, 0.1% (v/v) Tween 20, 1.5 мМ MgCl₂), 0,2 мМ смеси динитрофосфатов, 10 пмол каждого из праймеров, 1

Ед. Таq-полимеразы и 1 мкл ДНК. Температурно-временные условия заключались в начальной денатурации (3 мин), 35 последовательных циклах «денатурация (45 с) – отжиг (30 с) – элонгация (40 с)» и заключительной элонгации (4 мин). Температура денатурации, отжига и элонгации составляли 95, 60 и 72°C соответственно.

Таблица 1. Характеристика олигонуклеотидных праймеров для диагностики остеопетроза

Наименование праймера	5'-3'-последовательность	Длина, п.о.	T плавления, °C	GC-содержание, %
OSF	agc ccc tac agt cac agt ca	20	62	55
OSRn	agc agc aga gat cag ctt gg	20	62	55
OSRm	ccg acc ccc tca cat tca aa	20	62	55

Анализ результатов ПЦР-амплификации проводили методом гель-электрофореза в 3%-ном агарозном геле при помощи камеры для электрофореза multisub mini duo (Clever Scientific, Великобритания). Результаты фиксировали при помощи системы геле-документации Biometra Ti5 (Biometra, Германия).

Результаты и обсуждение

Была разработана тест-система для выявления мутации гена g.114437192_114439942del *SLC4A2*, вызывающей проявление остеопетроза крупного рогатого скота. Результаты генотипирования с использованием разработанной тест-системы иллюстрированы на рис. 2. В ходе АС-ПЦР у животных, свободных от мутации, амплифицируется только аллель дикого типа размером 532 пары нуклеотидов, а у животных-носителей мутации – два аллеля: 532 п.н., соответствующий здоровому аллелю и 229 п.н., соответствующий мутантному аллелю. Животные, больные остеопетрозом, являлись бы гомозиготными по мутантному аллелю и показали бы на электрофореграмме только один аллель длиной 229 п.н.

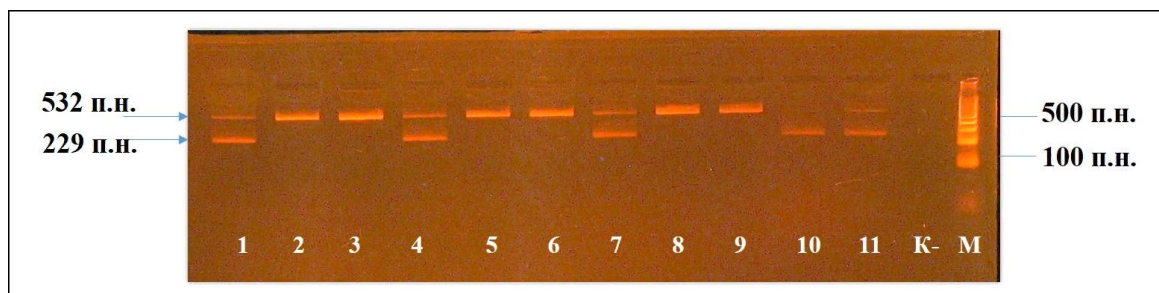


Рис. 2. Электрофореграмма АС-ПЦР для диагностики мутации гена *SLC4A2*, связанной с проявлением остеопетроза крупного рогатого скота. Дорожки 1, 4, 7, 9, 10 – гетерозиготные животные-носители мутантного аллеля (OSC); дорожки 2, 3, 5, 6, 8, 9 – животные, свободные от мутации (OSF); К – отрицательный контроль ПЦР, М – маркер молекулярной массы на 500 п.н. с шагом 100 п.н.

Посредством разработанной тест-системы было проведено генотипирование всего исследуемого поголовья по мутации g.114437192_114439942del гена *SLC4A2*, вызывающей развитие остеопетроза, в ходе которого, как и предполагалось, больных (гомозиготных по рецессивному аллелю) животных, обнаружено не было. OSC-животные были обнаружены в шести из одиннадцати исследованных групп животных абердин-ангусской породы.

Популяционный анализ, представленный в табл. 2, выявил животных-носителей мутантного аллеля, связанного с проявлением остеопетроза, в группах абердин-ангусов №№1, 4, 6, 8, 9 и 11, среди которых были одна популяция коров (1,1% OSC), две популяции телок (1,5 и 2,9% OSC) и три популяции быков (1,9; 2,2 и 3,3% OSC). Среди популяций абердин-ангусской породы № 2, 3, 5, 7 и 10, а также популяций герефордской, голштинской и симментальской пород (№ 12-14) животных-носителей остеопетроза обнаружено не было. В среднем, частота встречаемости животных-носителей остеопетроза среди крупного рогатого скота абердин-ангусской породы составила 0,8%.

Таблица 2. Результаты анализа групп крупного рогатого скота на носительство генетического дефекта остеопетроза

№ популяции	Породы	Группы животных	n	Количество OSC-животных	
				n	%
1	Абердин-ангусская	быки	120	4	3,3
2	Абердин-ангусская	быки	180	0	
3	Абердин-ангусская	коровы	91	0	
4	Абердин-ангусская	быки	46	1	2,2
5	Абердин-ангусская	быки	63	0	
6	Абердин-ангусская	быки	54	1	1,9
7	Абердин-ангусская	быки	72	0	
8	Абердин-ангусская	телки	65	1	1,5
9	Абердин-ангусская	телки	34	1	2,9
10	Абердин-ангусская	телки	46	0	
11	Абердин-ангусская	коровы	90	1	1,1
12	Герефордская	коровы	49	0	
13	Голштинская	быки	63	0	
14	Симментальская	быки	52	0	

Таким образом, по результатам наших исследований частота встречаемости животных-носителей генетического дефекта остеопетроза \bar{x} составила в зависимости от популяции 1,1-3,3%.

Данное наследственное заболевание интересно тем, что причина его стало известна только через 40 лет после проявления первых случаев, чему, безусловно, способствовало развитие методов молекулярной генетики. В настоящее время согласно документам Американской Ассоциации по абердин-ангусской породе в отношении наследственных заболеваний, остеопетроз признан летальным генетическим дефектом и является обязательным для контроля. Животные с признаками заболевания не допускаются к регистрации, а на родословных и племенных сертификатах животных-носителей и их потомков ставятся соответствующие отметки (<https://www.angus.org/pub/dd/ddpolicy08142013.pdf>). Также дефект отслеживается Американской Ассоциацией по симментальской породе (<https://simmental.org/site/index.php/learning-library/dna-genomics/genetic-conditions>).

Анализ животных, зарегистрированных в Американской Ассоциации по абердин-ангусской породе за 2017 г., показал наличие животных-носителей остеопетроза в частоте 1,7% (Коновалова, 2017). Более детальное изучение динамики распространения OSC-животных в период 2017-2019 гг. показал тенденцию к снижению количества таких

животных, что свидетельствует об успешной профилактической работе в отношении данного генетического дефекта (www.angus.org/Pub/GeneticConditions.aspx).

За три года (2017–2018–2019 среди животных абердин-ангусской породы, зарегистрированных в Американской Ассоциации, выявлена следующая динамика частоты встречаемости OSC: коровы: 2,9 – 3,3 – 0; быки: 0,3 – 0 – 0. Примечательно, что в 2017 году частота встречаемости животных-носителей остеопетроза среди коров была почти на порядок выше по сравнению с группой быков. В 2018 году среди быков OSC-животных обнаружено не было, однако к настоящему времени в текущем году уже выявлено два животных-носителя, что составляет на сегодняшний день 0,09%.

В целом, анализируя зарубежные и полученные в ходе наших исследований данные, следует отметить, что частота встречаемости мутантного аллеля гена *SLC4A2*, вызывающего проявление остеопетроза, относительно низкая и не превышает 5%, что, несомненно, является заслугой первых ученых, раскрывших молекулярную основу заболевания (Mayers et al., 2010). Однако, наличие в популяциях даже единичных животных-носителей данного дефекта, в частности, среди животных абердин-ангусской породы, указывает на необходимость его контроля во избежание распространения.

Наши исследования не выявили мутации гена *SLC4A2*, связанной с остеопетрозом, среди животных герефордской, голштинской и симментальской пород, однако, это не означает, что проявление этой мутации исключено при исследовании других популяций данных пород.

Заключение

В связи с отсутствием на территории России каких-либо контрольных мер в отношении генетических дефектов, наша страна подвергается опасности распространения животных-носителей с последующим клиническим проявлением наследственных аномалий. Поэтому, даже наличие единичных животных-носителей любого генетического дефекта является поводом для организации контроля.

В нашем исследовании животные-носители мутантного аллеля гена *SLC4A2*, вызывающего проявление остеопетроза, были выявлены только у животных абердин-ангусской породы. Разработанная нами тест-система относится к способам профилактики генетических заболеваний крупного рогатого скота. Она представляет собой достаточно простой, коммерчески доступный метод, позволяющий осуществлять раннее выявление животных-носителей генетического дефекта остеопетроза независимо от пола и возраста. Её практическое применение даст возможность получать информацию о наличии в генотипе животных мутации g.114437192_114439942del гена *SLC4A2*, что позволит разрабатывать селекционные программы, избегающие спаривания животных-носителей между собой. На сегодняшний день данный подход является лучшей стратегией в профилактике наследственных заболеваний (Whitlock, 2010), в частности остеопетроза, так как даёт возможность использовать животных-носителей генетического дефекта без выбраковки и, соответственно, без потери генетического потенциала стада, и в перспективе получать от них здоровых телят.

Исследования проведены в рамках выполнения задания Министерства образования и науки Российской Федерации № АААА-А18-118021590138-1 в 2017-2019 гг.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зиновьева Н.А. Введение в молекулярную генную диагностику сельскохозяйственных животных. – Подольск-Дубровицы: изд. ВИЖ, 2002. – 112 с.

2. Коновалова Е.Н., Гладырь Е.А., Костюнина О.В., Зиновьева Н.А. Генетические дефекты мясных пород крупного рогатого скота и стратегии их контроля // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. – 2017. – № 7. – С. 42-51.
3. Петрова Е.В. Основы классической генетики. – Саратов: Добродей, 1997. – 80 с.
4. Gholap P.N., Kale D.S., Sirothia A.R. Genetic diseases in cattle: a review // Res. J. Anim. Veter. Fish. Sci. – 2014. – Vol. 2. – No. 2. – P. 24-33.
5. Leipold H.W., Cook J.E. Osteopetrosis in Angus and Hereford calves // Am. J. Path. – 1997. – Vol. 86. – P. 745-748.
6. Leipold H.W., Doige C.E., Kaye M.M, Gribb P.H. Congenital osteopetrosis in Aberdeen Angus calve // Can. Vet. J. – 1970. – Vol. 11. – No. 9. – P. 181-185.
7. McClure M., McClure J. Genetic disease and trait information for IDB genotyped animals in Ireland (Expanded Edition). – Shinagh, Bandon: Highfield House Co Publ., 2016, 89 p.
8. Meyers S.N., McDanel T.G., Swist S.L., Marron B.M., Steffen D.J., Toole D.O., O'Connell, J.R., Beaver J.E., Sonstegard T.S, Smith T.P. A deletion mutation in bovine SLC4A2 is associated with osteopetrosis in Red Angus cattle // BMC Genomics. – 2010. – Vol. 11. – P. 337.
9. Murphy H.M. A review of inherited Osteopetrosis in the mouse. Man and other mammals also considered // Clin. Orthop. Relat. Res. – 1969. – Vol. 65. – P. 97-109.
10. Ojo S.A., Leipold H.W., Cho D.Y., Guffy M.M. Osteopetrosis in two Hereford calves // J. Am. Veter. Med. Assoc. – 1975. – Vol. 166. – P. 781-783.
11. O'Toole D., Swist S., Steadman L., Johnson G.C. Neuropathology and craniofacial lesions of osteopetrotic Red Angus Calves // Veterinary Pathology. – 2012. – Vol. 544. – P. 2217.
12. Whitlock B.K. Heritable birth defects in cattle // In: Applied reproductive strategies conference proceedings. – Nashville, Tennessee, 2010. – P. 146-151.

REFERENCES

1. Gholap P.N., Kale D.S., Sirothia A.R. Genetic diseases in cattle: a review. *Res. J. Anim., Veter. Fish. Scies.* 2014, 2(2): 24-33.
2. Konovalova E.N., Gladyr' E.A., Kostyunina O.V., Zinov'eva N.A. [Genetic defects of the beef cattle and the strategies of their control]. *Veterinariya, zootekhniiya i biotekhnologiya - Veterinary medicine, zootechny and biotechnology.* 2017, 7: 42-51. (In Russian)
3. Leipold H.W., Cook J.E. Osteopetrosis in Angus and Hereford calves. *Am. J. Path.* 1997, 86: 745-748.
4. Leipold H.W., Doige C.E., Kaye M.M, Gribb P.H. Congenital osteopetrosis in Aberdeen Angus calve. *Can. Vet. J.* 1970, 11(9): 181-185.
5. McClure M., McClure J. *Genetic Disease and Trait Information for IDB Genotyped Animals in Ireland* (Expanded Edition). Shinagh, Bandon: Co. Cork Publ, 2016, 89 p.
6. Meyers S.N., McDanel T.G., Swist S.L., Marron B.M., Steffen D.J., Toole D.O., O'Connell, J.R., Beaver J.E., Sonstegard T.S, Smith T.P. A deletion mutation in bovine SLC4A2 is associated with osteopetrosis in Red Angus cattle. *BMC Genomics.* 2010, 11: 337.
7. Murphy H.M. A review of inherited Osteopetrosis in the mouse. Man and other mammals also considered. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 1969, 65: 97-109.
8. Ojo S.A., Leipold H.W., Cho D.Y., Guffy M.M. Osteopetrosis in two Hereford calves. *J. Am. Veter. Med. Assoc.* 1975, 166: 781-783.
9. O'Toole D., Swist S., Steadman L., Johnson G.C. Neuropathology and craniofacial lesions of osteopetrotic Red Angus Calves. *Veterinary Pathology.* 2012, 544: 2217.
10. Petrova E.V. *Osnovy klassicheskoi genetiki* (Fundamentals of the classic genetics). Saratov: Dobrodeya Publ., 1997, 80 p. (In Russian)
11. Whitlock B.K. Heritable birth defects in cattle. In: *Applied reproductive strategies conference proceedings.* Nashville, Tennessee, 2010, P. 146-151.
12. Zinov'eva N.A. *Vvedenie v molekulyarnuyu gennuyu diagnostiku sel'skokhozyaistvennykh zhivotnykh* (Introduction in the molecular gene diagnostics of the agricultural animals). Podol'sk-Dubrovitsy: VIZH Publ., 2002, 112 p. (In Russian).

Osteopetrosis genetic defect in cattle: the creation of the diagnostic DNA test and analysis of the mutation carriers frequency in Russian populations

Konovalova E.N., Kostyunina O.V., Romanenkova O.S., Volkova V.V.

*Ernst Federal Science Center for Animal Husbandry, Podolsk - Dubrovitsy,
Moscow oblast, Russian Federation*

ABSTRACT. Osteopetrosis is a lethal genetic defect with a simple somatic recessive mode of inheritance, which was originally identified in mice and humans. The aim of this work is to study the clinical signs of the disease, the features of its inheritance, as well as the mutation g.114437192_114439942del of the SLC4A2 gene, which is the cause of osteopetrosis in cattle. A test system was developed based on DNA analysis by the ACP-PCR method, which allows identification of the mutant allele of the SLC4A2 gene associated with osteopetrosis, regardless of gender, age and physiological state of the animals. Using the developed test system, screening of Russian cattle populations of Aberdeen-Angus, Simmental, Hereford and Holstein breeds (n = 1025) was carried out, animals-carriers of osteopetrosis were detected in six populations of Aberdeen-Angus breed at a frequency of 1.1-3 3%. The use of the obtained results will provide information on the presence or absence of a mutant allele in the genotype of animals, causing the development of osteopetrosis, and can be recommended as a means of preventing the manifestation of this genetic defect in cattle by eliminating the crossing of carrier animals with each other.

Key words: cattle, Aberdeen Angus, Holstein, Simmental, Hereford, genetic defect, osteopetrosis.

Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh - Problems of Productive Animal Biology, 2019, 3: 20-26

Поступило в редакцию: 15.06.2019

Получено после доработки: 04.07.2019

Коновалова Елена Николаевна, с.н.с., к.б.н., +7(496) 765-11-04, +7(905) 725 63 90;
Konoval-elena@yandex.ru;

Костюнина Ольга Васильевна, зав. лаб., д.б.н., +7(496) 765-11-02; kostolan@yandex.ru;

Романenkova Ольга Сергеевна, н.с., к.б.н., y7tteaip@mail.ru;

Волкова Валерия Владимировна, с.н.с., к.б.н., moonlit_elf@mail.ru