Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy
im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich
w Bydgoszczy
Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt

Agnieszka Magdalena Markowska

POLIMORFIZM GENU BIAŁKA PRIONOWEGO OWIEC W KODONACH 127, 141, 151, 171 I 189

Praca doktorska
wykonana pod kierunkiem
prof. dr hab. inż. Sławomira Mroczkowskiego
oraz promotora pomocniczego
dr inż. Ewy Grochowskiej
w Zakładzie Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt

Bydgoszcz 2013

Ci, którzy przyszli później
Dorzucili wiele odkryć do tego
Co było poznane wcześniej
Ich przykład powinien
Pobudzić do dokonania
Nowych odkryć

L. Valla

Składam serdeczne podziękowania:

- Promotorowi Panu *Prof. dr hab. Sławomirowi Mroczkowskiemu*
- Promotorowi pomocniczemu Pani *dr inż. Ewie Grochowskiej*
- Kierownikowi studiów doktoranckich Panu *Prof. dr hab. Markowi Bednarczykowi*

za cenne uwagi merytoryczne, sugestie, poświęcony czas, cierpliwość, zaangażowanie, a przede wszystkim za wiarę w młodych naukowców.

Wyrazy wdzięczności składam również na ręce tych, którzy w minimalnym chociaż stopniu mieli wpływ na powstanie niniejszej pracy.

1. STRESZCZENIE 4
2. SUMMARY 6
3. WSTĘP I CEL PRACY 8
4. PRZEGLĄD LITERATURY 10
4.1. Pasażowalne encefalopatie gąbczaste 10
4.1.1. Czas inkubacji chorób wywołanych przez priony 13
4.1.2. Drogi zakarzenia chorobami wywołanymi przez priony 14
4.1.3. Etiologia trzęsawki 15
4.2. Badania nad prionami 19
4.2.1. Budowa białka prionowego i jego funkcje 20
4.2.2. Teorie prionu 21
4.3. Gen *PRNP* 22
5. MATERIAŁ I METODY 31
5.1. Materiał zwierzęcy 31
5.2. Izolacja DNA 33
5.3. Analiza jakościowa i ilościowa DNA 34
5.4. PCR 34
5.5. PCR-RFLP 35
6. WYNIKI I DYSKUSJA 38
6.1. Polimorfizm w kodonie 127 39
6.2. Polimorfizm w kodonie 141 42
6.3. Polimorfizm w kodonie 151 51
6.4. Polimorfizm w kodonie 171 60
6.5. Polimorfizm w kodonie 189 67
6.6. Frekwencja genotypów 69
7. PODSUMOWANIE I WNIOSKI 75
8. PIŚMIENNICTWO 78

1. STRESZCZENIE

Agnieszka Magdalena Markowska

POLIMORFIZM GENU BIAŁKA PRIONOWEGO OWIEC W KODONACH: 127, 141, 151, 171 I 189

Scrapie jest chorobą dotykającą małe przeżuwacze, należącą do grupy pasażowalnych encefalopatii gąbczastych. Naukowo stwierdzono wpływ polimorfizmów w kodonach: 136, 154 i 171 genu białka prionowego owiec (*PRNP*) na podatność/oporność na klasyczną postać trzęsawki, natomiast w kodonie 141 na jej atypową formę. Dotychczas naukowcy wykryli polimorfizm pojedynczego nukleotydu w ponad 30 kodonach. Celem pracy było zbadanie polimorfizmu genu białka prionowego w kodonach: 127, 141, 151, 171 i 189 owiec pochodzących z Polski, Słowacji i Włoch. Ponadto oszacowano frekwencje alleli oraz genotypów w poszczególnych tripletach oraz porównano badane populacje owiec pod względem zmienności w tym zakresie. Badana przeprowadzono na 424 owcach: z Polski: ile de france, wrzosówka, kamieniecka; ze Słowacji: cigája, lacaune, lacaune x cigája oraz zošľachtená valaška x lacaune; z Włoch: apennine i apennine x merynos derivertia. Materiał genetyczny, jaki stanowiło DNA, wyizolowany został z obwodowej krwi owiec przy pomocy zestawu MasterPure™ DNA Purification Kit for Blood Version II firmy Epicentre Technology według protokołu B2 o nazwie DNA Purtification for 200µl of Whole Blood (with RBC Lysis). Do detekcji polimorfizmów genu białka prionowego owiec użyto metody PCR-RFLP przy użyciu odpowiednich enzymów restrykcyjnych:

- *Hae*III dla kodonu 127 w celu wykrycia glicyny (G), waliny (V) lub seryny (S), *Mnl*I dla kodonu 141 w celu wykrycia leucyny (L) lub fenyloalaniny (F),
- *Ava*II dla kodonu 151 w celu wykrycia cysteiny (C) lub argininy (R),
- *Mbo*I dla kodonu 171 w celu wykrycia lizyny (K),
- *Alu*I dla kodonu 189 w celu wykrycia glutaminy (Q), histydyny (H) lub argininy (R).

Cała badana populacja owiec była monomorficzna pod względem kodonu 127 i 189. Wykryto homozygoty odpowiednio: G127G oraz Q189Q. Pod względem zmienności genetycznej w kodonie 141 najbardziej zróżnicowana okazała się rasa cigája pochodząca ze Słowacji, w której stwierdzono występowanie allela L z częstością 76, 67% oraz F 23,33% w tej rasie. Owce z Polski i Włoch, jak i pozostałe osobniki ze Słowacji były homozygotami L141L. Nie wykryto mutacji warunkującej kodowanie lizyny w triplecie 171 w całej poddanej badaniu populacji owiec. W kodonie 151 wykryto SNP odpowiedzialny za kodowanie zarówno cysteiny, jak i argininy we wszystkich stadach owiec. Częstość, z jaką wystąpił allel C wynosiła: 11,39% dla grupy owiec z Polski, 4,27% - ze Słowacji i 2,46% - z Włoch, natomiast allela R odpowiednio: 88,61%, 95,73% i 97,54%. Haplotypy te wystąpiły w układach homozygotycznych: R151R, C151C i heterozygotycznych R151C w całej badanej populacji owiec.

W badaniach własnych wykryto 3 allele z częstością: 90,45% - $G_{127}L_{141}R_{151}X_{171}Q_{189}$, 8,61% - $G_{127}L_{141}C_{151}X_{171}Q_{189}$ oraz 0,94% - $G_{127}F_{141}R_{151}X_{171}Q_{189}$. Haplotypy te utworzyły pięć genotypów, które wystąpiły z frekwencją: GLRXQ/GLRXQ 82,08%, GFRXQ/GFRXQ 0,71%, GLCXQ/GLCXQ 0,47%, GLRXQ/GLCXQ 16,27% i GLRXQ/GFRXQ 0,47% dla całej badanej populacji owiec.

Słowa kluczowe: owce, PCR-RFLP, polimorfizm, *PRNP*, scrapie

2. SUMMARY

Agnieszka Magdalena Markowska

POLYMORPHISM OF THE OVINE PRION PROTEIN GENE AT CODONS: 127, 141, 151, 171 I 189

Scrapie is a fatal disease that belongs to the group of Transmissible Spongiform Encephalopathy (TSE). Polymorphisms of the ovine prion protein gene (*PRNP*) at codons 136, 154 and 171 are responsible for susceptibility/resistance to classical scrapie and at codon 141 to atypical scrapie. The researchers found single polymorphism nucleotide (SNP) in over 30 codons. The aim of this study was to research the polymorphisms of the *PRNP* at codons: 127, 141, 151, 171 and 189 in sheep from Poland, Slovakia and Italy. It is also estimated allele and genotype frequencies in particular codons populations studied and compared in terms of variation of sheep in this regard. This research was conducted to on ovine breeds and crossbreds (n=424): from Poland: Ile de France, Wrzosówka, Kamieniecka sheep; from Slovakia: Tsigai, Lacaune, Tsigai x Lacaune and Lacaune x Improved Wallachian; from Italy Apennine and Apennine x Derivertia Merino. DNA was extracted from the whole blood using MasterPure™ DNA Purification Kit for Blood Version II Epicentre Technology by the protocol B2 DNA Purtification for 200µl of Whole Blood (with RBC Lysis). To research polymorphisms of *PRNP* gene the PCR-RFLP method was used by restriction enzymes:

- *Hae*III for codon 127 to detect amino acid glycine (G), valine (V) or serine (S),
- MnlI for codon 141 to detect amino acid leucine (L) or phenylalanine (F)
- AvaII for codon 151 to detect amino acid cysteine (C) or arginine (R),
- MboI for codon 171 to detect amino acid lysine (K),
- AluI for codon 189 to detect amino acid glutamine (Q), histidine (H) or arginine (R).

The whole population of sheep was monomorphic at codon: 127 and 189. Homozygous G127G and Q189Q were found. At codon 141 SNP was only found in breed Tsigai from Slovakia. Allele L was detected with frequency 76,67% and allele F with 23,33% in this breed. The population of sheep from Poland and Italy and also rest of sheep from Slovakia was homozygous L141L. SNP at codon 171 responsible for coding amino acid lysine was not found. At codon 151 allele C was detected with frequency 11,39% for Polish sheep, 4,27% for Slovakian sheep and 2,46% for Italian sheep. Also at codon 151 allele R was found with frequency as above: 88,61%, 95,73% and 97,54%. Homozygous: R151R, C151C and heterozygous R151C were detected.

In the investigated sheep population allele were detected: $G_{127}L_{141}R_{151}X_{171}Q_{189}$ with frequency 90,45%, $G_{127}L_{141}C_{151}X_{171}Q_{189}$ with frequency 8,61% and $G_{127}F_{141}R_{151}X_{171}Q_{189}$ with frequency 0,94%. These haplotypes formed five genotypes with frequency: 82,08% for GLRXQ/GLRXQ, 0,71% for GFRXQ/GFRXQ, 0,47% for GLCXQ/GLCXQ, 16,27% for GLRXQ/GLCXQ and 0,47% for GLRXQ/GFRXQ for the whole population of sheep examined.

Key words: PCR-RFLP, polymorphism, scrapie, sheep, *PRNP*

3. WSTĘP I CEL PRACY

Owce od wieków wykorzystywane są przez ludzi w celu pozyskania mięsa, mleka, wełny, czy skór. Wraz z rozwojem i postępem w nauce i technice oraz poszerzającą się świadomością na temat zachodzących w środowisku procesów zaczęto zwracać uwagę również na choroby dotykające zwierzęta gospodarskie, które w sposób bezpośredni lub pośredni wpływają na zdrowie człowieka.

Scrapie choroba prionowa owiec należy do grupy pasażowalnych encefalopatii gąbczastych. Pierwsze wzmianki na temat tej jednostki chorobowej pochodzą ze Szkocji z 1782 roku. W języku polskim nosi nazwę trzęsawka. Czynnikiem infekcyjnym wywołującym scrapie jest patogenna forma białka prionowego kodowanego przez gen białka prionowego. Naukowo stwierdzono, że polimorfizmy w kodonie: 136, 141, 154 i 171 powiązane są z opornością/podatnością na klasyczną lub atypową formę scrapie. W genie białka prionowego (*PRNP*) wykryto polimorfizmy oraz ciche mutacje punktowe w ponad trzydziestu kodonach.

Konieczne są dalsze badania w celu głębszego poznania natury białek prionowych oraz ich oddziaływań na organizmy zwierząt i ludzi. Naukowo udowodniono przepasażowanie się czynnika patogennego na inne gatunki. W związku z letalnym charakterem chorób prionowych, w tym także scrapie, wprowadzono regulacje prawne między innymi: Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) NR 999/2001, Rozporządzenie Komisji (WE) NR 260/2003, Rozporządzenie Komisji (WE) NR 1492/2004 czy Decyzja Komisji 2003/100/WE, które świadczą o wadze pasażowalnych encefalopatii gąbczastych (TSE - Transmissible Spongiform Encephalopathies). Na podstawie uregulowań prawnych na poziomie ogólnoeuropejskim, a także poszczególnych państw, przedsięwzięto szereg działań mających na celu badanie przyczyn, zwalczanie skutków, oraz zapobiegania rozprzestrzeniania się chorób prionowych dotykających zarówno ludzi, jak i zwierzęta. Badania nad scrapie dotyczą nie tylko polimorfizmu genu białka prionowego, czemu poświęcona jest niniejsza rozprawa, ale również mają na celu tworzenie programów hodowlanych ograniczających lub eliminujących w dalszej

hodowli osobniki podatne na trzęsawkę, a także zbadanie wpływu genotypów na cechy użytkowe małych przeżuwaczy.

Ze względu na brak powiązania polimorfizmów w kodonie: 127, 151 oraz 189 genu *PRNP* z opornością/podatnością owiec na klasyczną i atypową postać scrapie, a także bardzo rzadkie występowanie polimorfizmu pojedynczego nukleotydu warunkującego kodowanie lizyny w triplecie 171, nie wykonuje się rutynowych testów pod tym kątem. Nie mniej jednak ze względu na wykrycie pojedynczych mutacji nukleotydowych w ponad 30 tripletach podjęto działania w kierunku zbadania zmienności w wybranych wyżej wymienionych kodonach w stadach owiec z Polski, Słowacji i Włoch. Są to pierwsze tego typu badania w Polsce. Odpowiednio dobrane enzymy restrykcyjne wykorzystane w metodzie PCR-RFLP pozwoliły na wykonanie genotypowania również dla kodonu 141, który powiązany jest z wrażliwością na Nor98.

Celem pracy było zbadanie polimorfizmu genu białka prionowego w kodonach: 127, 141, 151, 171 i 189 owiec pochodzących z Polski, Słowacji i Włoch. Ponadto oszacowano frekwencje alleli oraz genotypów w poszczególnych tripletach oraz porównano badane populacje owiec pod względem zmienności w tym zakresie.

4. PRZEGLĄD LITERATURY

4.1. Pasażowalne encefalopatie gąbczaste

Choroby prionowe należą do grupy letalnych pasażowalnych encefalopatii gąbczastych, które stanowią część większej rodziny nazywanej amyloidazami mózgowymi. Termin amyloid wprowadził w 1854 roku niemiecki lekarz Rudolph Virchow (Sipe i Cohen, 2000). Włókna amyloidowe zbudowane są z monomerów białkowych z dominacją drugorzędowej struktury β i odkładane w przestrzeni pozakomórkowej mózgu. W przypadku TSE substancją gromadzącą się jest patogenna forma białka prionowego PrP^{Sc} (pathogenic, scrapie associated prion protein), która odpowiedzialna jest za zwyrodnienia układu nerwowego (UN) (Prusiner, 2004). Choroby prionowe dotykają zarówno ludzi jak i zwierzęta oraz stanowią problem ekonomiczno-gospodarczy, a przede wszystkim zdrowotny. Pierwszą opisaną chorobą wywołaną tym czynnikiem etiologicznym jest scrapie, w języku polskim nazywana trzęsawką. Wzmianki o tej jednostce chorobowej dotykającej owce i kozy pochodzą z 1732 roku ze Szkocji (Schneider i wsp., 2008). Encefalopatia gąbczasta dotykająca ludzi, czyli choroba Creutzfeldta-Jakoba CJD (Creutzfeldt-Jakob Disease) została opisana dopiero w 1920 roku przez Creutzfeldta, a następnie w 1921 roku przez Jakoba. Wraz z pogłębiającą się wiedzą przez kolejne dekady opisano postać jatrogenną iCJD (Iatrogenic Creutzfeldt–Jakob Disease), sporadyczną sCJD (Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease), rodzinną fCJD (Familial Creutzfeldt-Jakob Disease) oraz nowy wariant nvCJD (variant Creutzfeldt–Jakob Disease) (Brown, 1998; Prusiner, 2004). W 1936 roku doniesiono o syndromie Gertsmanna-Sträusslera-Scheinkera GSS, chociaż pierwsze wzmianki na temat tej choroby pojawiły się w 1913 i 1928 roku (za Deptuła i Pawlikowska, 2000; Hörnlimann i wsp. 2006;). W 1957 roku opisano chorobę Kuru znaną potocznie „śmiejąca się śmierć" dotykającą plemię Fore zamieszkujące Góry Wschodnie Papui Nowej Gwinei (Gajdusek, 1977). Śmiertelna rodzinna bezsenność FFI (Fatal Familiar Insomia), jako ostatnia do tej pory choroba prionowa dotykająca ludzi została zdiagnozowana w połowie lat osiemdziesiątych we Włoszech (Hörnlimann i wsp. 2006). W 1947 wykryto zakaźną encefalopatię norek TME (Transmissible Mink Encephalopathy). Pod koniec lat sześćdziesiątych XX

wieku wykryto, a następnie potwierdzono w 1983 roku chroniczną wyniszczającą chorobę zwierzyny płowej CWD (Chronic Wasting Disease) (Prusiner, 2004). W 1986 roku w południowej Anglii rozpoznano podczas rutynowego badania histopatologicznego gąbczastą encefalopatię bydła BSE (Bovine Spongiform Encelophaty) znaną również, jako choroba wściekłych krów (Prusiner, 2004). Od 1986 do 1994 roku zdiagnozowano 19 przypadków TSE zwierząt żyjących w niewoli w brytyjskich ogrodach zoologicznych egzotycznych. Wyodrębniono gąbczastą encefalopatię egzotycznych zwierząt kopytnych EUE (Exotic Ungulate Encephalopathy) oraz gąbczastą encefalopatię kotowatych FSE (Feline Spongiform Encephalopathy) (Kirkwood i Cunningham, 1994; Hörnlimann i wsp., 2006). W 1998 roku zdiagnozowano pierwszy przypadek atypowej postaci scrapie w Norwegi (Benestad i wsp., 2003). W roku 2005 opisano gąbczastą encefalopatię małp naczelnych w ogrodach zoologicznych ZPSE (Zoo Primate Spongiform Encephalopathy). Pojawiły się również informacje na temat gąbczastej encefalopatii dużych kotów (Capitive Large Cats), ryb FSE (Bovo i wsp. 1999) i strusi OSE (za Barszcz i wsp., 2010).

Jednostki chorobowe, które należą do TSE mają zbliżone do siebie podstawowe objawy kliniczne takie jak: niemożność ruchów spowodowana mimowolnymi drżeniami mięśni, zaburzenia koordynacji ruchowej, nadwrażliwość na bodźce środowiskowe, lękliwość, nadpobudliwość czy agresja. Choroby prionowe charakteryzuje bardzo długi czas inkubacji i stosunkowo krótki ich przebieg. U zwierząt gospodarskich dotkniętych TSE obserwuje się również spadek mleczności oraz masy ciała przy zachowanym apetycie (Wooldridge i Wood, 1991; za Polak i Żmudziński, 2000; za Sołtysiak i Barcikowska, 2002). Wyróżnić możemy trzy etapy rozwoju chorób prionowych:

- **Infekcja oraz replikacja białka prionowego** - tkanki systemu limfoidalnego (węzły chłonne, kępki Peyera, grasica, śledziona) stanowią pierwszy ośrodek akumulacji i namnażania się patogennej izoformy białka prionowego (Andreoletti i wsp., 2000; Heggeba i wsp., 2000; za Polak i Żmudziński, 2000; za Larska i Polak, 2003).

- **Migracja PrP^{Sc}** - wykrycie obecności białka prionowego patogennego w leukocytach oraz płytkach krwi wskazywać może na istotną rolę w transporcie PrP^{Sc} w organizmie (za Larska i Polak, 2003). Badania naukowców potwierdzają występowanie PrP^{Sc} również: w tkance mięśniowej, tkance limfatycznej węzłów chłonnych, zwojach nerwów grzbietowych, zwoju nerwu trójdzielnego, rdzeniu kręgowym, płynie rdzeniowo-mózgowym, sercu, płucach, grasicy, wątrobie, śledzionie, żołądku, trzustce, końcowym odcinku jelita cienkiego i początkowym jelita grubego, siatkówce, moczu, leukocytach, płytkach krwi, a także w układzie rozrodczym (Blattler, 2002; Heggebø i wsp., 2003; Buschmann i wsp., 2004; za Polak i Żmudziński, 2000; za Polak i Rola., 2005; za Wierzbicka i Deptuła, 2008, za Kaczor i Domoń, 2009). Badania przeprowadzone na owcach dotkniętych trzęsawką wykazały akumulację białek prionowych typu scrapie w nerkach w miejscu, w którym przedostają się z krwi lub są absorbowane z uryny (Sisó i wsp., 2008).
- **Neurodegeneracja komórek** - czynnik zakaźny odkłada się głównie w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN), doprowadzając do zwyrodnień mózgowia, nerwów czuciowych i obwodowych oraz rdzenia przedłużonego (Prusiner, 1998; za Polak i Żmudziński, 2000; za Larska i Polak, 2003; za Polak i Rola, 2005; za Wierzbicka i Deptuła, 2008; za Wiśniewska i Mroczkowski, 2009). Na poziomie komórkowym kumulacja PrP^{Sc} powoduje dysfunkcję komórki, a następnie jej neurodegradację prowadzącą do śmierci. Odkładanie się nieaktywnych białek fibrylarnych prowadzi do wakuolizacji oraz nagromadzenia się patogennej formy białka prionowego w postaci włókien amyloidowych, płytek lub złogów wokół jąder komórkowych w dendrytach istoty szarej mózgu. Obserwuje się również zwyrodnienie i zanik neuronów w OUN (Prusiner, 2004; za Deptuła i Pawlikowska, 1999; za Polak i Żmudziński, 2000; za Strzelec i Niżnikowski, 2004; za Wierzbicka i Deptuła, 2008).

4.1.1. Czas inkubacji chorób wywołanych przez priony

Badania prowadzone nad chorobami prionowymi nie potwierdzają obecności przeciwciał, jako odpowiedzi immunologicznej ze strony organizmu na czynnik zakaźny (Prusiner, 1998). Podaje się, iż przyczyną braku odpowiedzi ze strony układu odpornościowego (UO) jest długi czas inkubacji choroby, podobieństwa PrP^{Sc} do PrP^{C} (normal cellular prion protein - komórkowa forma białka prionowego) oraz związanej z tym nabytej tolerancji na czynnik zakaźny (Prusiner, 1998).

Amyloidazy mózgowe należą do chorób letalnych. Okres inkubacji oraz trwania choroby zależy między innymi od gatunku oraz wieku osobnika. CJD charakteryzuje się najdłuższym okresem inkubacji od roku do 30 lat (Ridley i Baker, 1995). Jednostka ta dotyka ludzi między 50 a 75 rokiem życia. Sama choroba trwa od miesiąca do 3 lat (Rabenau i wsp., 2001). Najkrótszy czas inkubacji podaje się w przypadku śmiertelnej rodzinnej bezsenności, który trwa do roku, a sama choroba od 5 miesięcy do 7 lat u ludzi w przedziale wiekowym 20-72 lat (Prusiner, 2004). Natomiast BSE bydła, dotyka zwierzęta w wieku 3-5 lat, choroba trwa od 1 do 6 miesięcy (Prusiner, 2004), a średni czas inkubacji wynosi około 5 lat (Prusiner, 1998; 2004). Scrapie inkubuje się do kilku lat w organizmie, trwa od 2 do 24 tygodni i dotyka zwierzęta w wieku 2-5 lat (Lühken i wsp., 2007; McIntyre i wsp., 2008; Fast i Groschup, 2013). Atypowa postać trzęsawki wykrywana jest u osobników powyżej 6 roku życia (Benestad i wsp., 2008; Fast i Groschup, 2013). Ze względu na rzadkie przypadki występowania oraz brak monitoringu: chronicznej wyniszczającej choroby zwierzyny płowej, encefalopatii egzotycznych zwierząt kopytnych, kotowatych, dużych kotów, małp naczelnych w ogrodach zoologicznych, ryb i strusi oraz zakaźnej encefalopatii norek, dane dotyczące przebiegu tych jednostek chorobowych są niepełne. Na podstawie badań eksperymentalnych polegających na zakażeniu zdrowych osobników czynnikiem patogennym, stwierdzono wydłużony czas inkubacji uwarunkowany barierą międzygatunkową. Bariera ta związana jest z różnicami w konformacji przestrzennej PrP^{C} różnych gatunków zwierząt oraz człowieka, poziomem homologii (Prusiner, 1998, 2004; za Salwa i Iwanicki, 2004; za Polak i Rola, 2005; Hörnlimann i wsp.

2006), jak i z podobieństwem białka prionowego ssaków (Lee i wsp., 1998; za Salwa i Iwanicki, 2004; za Wierzbicka i Deptuła, 2008).

4.1.2. Drogi zakażenia chorobami wywołanymi przez priony

Wyróżniamy dwie drogi zakażenia organizmu patogenną formą białka prionowego:

- **Egzogenna** – przedostanie się formy PrP^{Sc} do organizmu z środowiska zewnętrznego drogą pokarmową, dożylną, dootrzewną, doustną, domózgową, podskórną, przez skórę, z matki na potomstwo podczas porodu i karmienia. Również transfuzja krwi, transplantacja opony twardej mózgu, stosowanie ludzkiego hormonu wzrostu i gonadotropiny, iniekcje domózgowe oraz zabiegi neurochirurgiczne stanowić mogą przyczynę wystąpienia TSE (Liberski i wsp., 1990; Healy i Evans, 1993; Hannah i wsp., 2001; za Larska i Polak, 2003; za Salwa i Iwanicki, 2004; za Polak i Rola, 2005; za Wierzbicka i Deptuła, 2008; za Kaczor i Domoń, 2009).
- **Endogenna** – powstanie izoformy białka prionowego w organizmie na skutek mutacji w genie białka prionowego (*PRNP* – prion protein gene) (Charon i Świtoński, 2012).

Białko prionowe komórkowe syntetyzowane jest w rybosomach, gdzie poddawane jest obróbce potranslacyjnej i transportowane przez aparat Golgiego i pęcherzyki sekrecyjne do błony komórkowej, z którą związane jest czynnościowo i morfologicznie. W błonie następuje zakotwiczenie białka prionowego poprzez grupę glikozylofosfatydyloinozytolową (GPI - Glycosylo Phosphatidil Inositol Anchor) (Prusiner, 2004; za Kaczor i Domoń, 2009). Wyróżnić możemy dwie drogi gromadzenia się patogennej formy białka PrP^{Sc} na poziomie komórkowym:

- **Zmiana konformacji przestrzennej białek prionowych w wyniku błędnej obróbki potranslacyjnej –** błędy w procesie translacji warunkują włączanie aminokwasów w innej kolejności. Spowodowane jest to zmianami w strukturze mRNA (messenger ribonucleic acid -matrycowy kwas rybonukleinowy) PrP^{C} łączy się z PrP^{Sc} na poziomie błony komórkowej tworząc heterodimer. Ten z kolei

dzieli się na dwie cząsteczki PrP^{Sc} zaczynając lawinowy proces przekształcania białek prionowych komórkowych w patogenne, narzucając odmienną konformację przestrzenną (Chesebro, 1998; za Deptuła i Pawlikowska, 1999; za Wierzbicka i Deptuła, 2008).

- **Nagromadzenie się form patologicznych w cytosolu** - nieprawidłowo pofałdowane białka prionowe, charakteryzujące się nieodpowiednią konformacja przestrzenną (struktura drugorzędowa) w stosunku do białka prionowego komórkowego, rozkładane są przez proteinazy w lizosomach (Prusiner, 1998; za Deptuła i Pawlikowska, 1999; za Wierzbicka i Deptuła, 2008). Badania przeprowadzone przez zespół DebBurmana wykazały, że białka opiekuńcze chaperonowe (chaperon proteins): GroEL oraz Hsp 104 odpowiedzialne są za cofanie nieprawidłowych białek prionowych do cytosolu na drodze transportu wstecznego, gdzie ulegają degradacji pod wpływem enzymów proteolitycznych. Zaburzenia w tym procesie powodują gromadzenie się złogów włóknistych w lizosomach ponad poziom fizjologiczny, a następnie na skutek rozerwania struktur przedostanie się PrP^{Sc} do błony cytoplazmatycznej i zakotwiczenie grupą GPI (DebBurman i wsp., 1997; za Salwa i Iwanicki, 2004).

4.1.3. Etiologia trzęsawki

Scrapie jest chorobą neurodegeneracyjną należącą do grupy TSE wywoływaną przez patogenne białka prionowe, które poprzez akumulację w OUN prowadzą do śmierci. W Polsce ta jednostka chorobowa nazywana jest również: trzęsawką, drżączką bądź chorobą kłusową owiec i kóz. Pierwsze wzmianki na temat scrapie pochodzą z 1732 roku z terenów Szkocji, natomiast pierwsze raporty pochodzące z Niemiec, Francji i Anglii odnotowano pomiędzy 1750, a 1980 rokiem. Nie mniej jednak wzmianki na temat choroby dotykającej małe przeżuwacze pochodzą z łacińskich przekazów (Hunter, 1993). Problemy z właściwym rozpoznaniem scrapie polegały na zbliżonych syndromach kilku chorób oraz odmiennością w nazwie w zależności od regionu czy kraju np.: „goggles", „rubbing disease", „scratchie" w Anglii; „la tremblante", „la maladie convulsive" we Francji;

„basqvilla disease", „prurigo lumbag" w Hiszpanii; „Petermännchen", „die Traberkrankheit", „Reiber-Uebel" czy „die Seuche" w Niemczech, „surlokar" na Węgrzech czy „rida" w Islandii (Hunter, 1993; Schneider i wsp., 2008). Pierwsze przypadki scrapie zanotowano w Stanach Zjednoczonych w 1947 roku (Alexander i wsp., 2005), na terenie Węgier w 1959 (Hunter, 1993), we Włoszech w regionie Piedemont w 1976 roku (Acutis i wsp., 2004), w Japonii w 1982 (Hunter, 1993), w Grecji w 1986 (Bilinis i wsp., 2004), w Rumunii w 2002 (Otelea i wsp., 2011), w Polsce w 2009 roku (Polak i wsp., 2009). Na terenie Niemiec od 1973 do 1998 odnotowano niespełna 20 przypadków owiec chorych na scrapie (Junghans i wsp., 1998), a na Słowacji pierwszy potwierdzony przypadek scrapie opublikowano w 2003 roku (Matúšková i wsp., 2003). We Włoszech w latach 2004-2007 wykryto 187 przypadków scrapie (Vaccari i wsp., 2007). Jak podaje Hörnlimann do 2006 Australia, Nowa Zelandia oraz Argentyna należały do krajów wolnych od scrapie (Hörnlimann i wsp., 2006). Odnotowano jednak przypadki wystąpienia trzęsawki w przypadku owiec importowanych z Anglii należących do ras suffolk i hampshire: w 1938 w Kanadzie, w 1947 w stanie Michigan, w 1952 w Australii, w 1953 w Nowej Zelandii, w 1965 w Południowej Afryce, w 1969 w Kolumbii, w 1970 w Kenii, w 1977 w Brazylii, a także w 1940 w Indiach u mieszańców lokalnej rasy himalajskiej z importowaną rasą rambouillet z Francji (Hunter, 1993).

Różnice pomiędzy klasyczną a atypową postacią trzęsawki wykazuje się na tle biochemicznym, histopatologicznym oraz epidemiologicznym (Erhardt i wsp., 2009; Simmons i wsp., 2010). Zakłada się również, iż Nor98 powstaje samorzutnie (Buschmann i wsp., 2009). Badania prowadzone przez naukowców na całym świecie dowiodły, że polimorfizm w kodonach 136, 154 i 171 powiązany jest z opornością/podatnością owiec na klasyczną trzęsawkę (Goldmann i wsp., 1994; Belt i wsp., 1995; Lühken i wsp., 2004). Genotypy zostały podzielone na 5 klas wrażliwości na scrapie według DEFRA (The Department for Environment, Food and Rural Affairs, 2006). Klasyfikacja ta pozwoliła na tworzenie programów hodowlanych mających na celu selekcję zwierząt o genotypach najbardziej opornych na trzęsawkę. Strategie przygotowania programów hodowlanych opierających się

na modelach matematycznych uwzględniających wytyczne Unii Europejskiej oraz DEFRA mają na celu zmniejszenie frekwencji allela $V_{136}R_{154}Q_{171}$ oraz wyeliminowanie osobników o genotypach należących do klas o wysokiej podatności na scrapie (Drögemüller i wsp., 2004; Roden i wsp., 2006). Pojawił się jednak problem związany ze zmniejszeniem zmienności genetycznej oraz wzrostem inbredu przy wyborze jednego genotypu. Ponadto wykrycie atypowej formy tej choroby u zwierząt należących przede wszystkim do klas opornych na klasyczną formę scrapie stworzyło zagrożenie infekcją formy Nor98 (Benkel i wsp., 2007).

Kliniczne objawy scrapie związane są ze stadem, rasą, regionem, a także krajem, z którego pochodzą owce (Goldmann i wsp., 1994; Dawson i wsp., 1998). Obserwuje się je u osobników między 2 a 5 rokiem życia. Bardzo rzadko objawy kliniczne obserwowane są w przypadku osobników młodych poniżej 18 miesiąca, bądź starych (Hörnlimann i wsp., 2006; Fast i Groschup, 2013). Na Islandii odnotowano jednak przypadek 6 miesięcznego jagnięcia z objawami scrapie (Polak i Żmudziński, 2008). Objawy scrapie uzależnione są również od szczepu, którym owca została zainfekowana (Goldmann i wsp., 1994; za Piestrzynska-Kajtoch i Rejduch, 2006; za Kaczor i Domoń, 2009). W przebiegu choroby wyróżnić możemy trzy fazy:

- **Wczesna faza kliniczna** – od 1 do 2 miesięcy – obserwowane są zmiany w jakości wełny, apatia, podniecenie, zaburzenia równowagi przy gwałtownych zmianach kierunku ruchu czy częste pobieranie małych ilości wody (za Polak i Żmudziński, 2000).
- **Pełna faza kliniczna** – od 1 do 2 miesięcy – widoczny jest znaczny spadek masy ciała przy zachowanym apetycie, problemy z przełykaniem, ślinienie oraz zgrzytanie zębami, świąd, ocieranie się oraz drapanie prowadzące do wyłysienia i uszkodzeń pokrywy ciała, ataksja, nadwrażliwość na bodźce środowiskowe takie jak ruch, dźwięk czy dotyk, a także agresja w stosunku do ludzi i psów pasterskich (za Polak i Żmudziński, 2000).
- **Późna faza kliniczna** – od 2 do 4 tygodni –następuje ogólne osłabienie organizmu, zaleganie, niechęć do ruchu spowodowana trudnościami przy wstawaniu, upadanie, brak koordynacji ruchowej, niepewny chód

przypominający kłusowy (wysokie unoszenie kończyn przednich, przy jednoczesnym podkurczaniu kończyn tylnych), otępienie i drżenie mięśni (za Polak i Żmudziński, 2000).

Celem wykrycia scrapie stosuje się badania histopatologiczne na materiale pobranym z rdzenia przedłużonego owcy. Badania te dają możliwość wykrycia degeneracji neuronów oraz wakuolizacji, czyli zmian gąbczastych w mózgu. Metoda immunohistochemiczna polega na wybarwianiu miejsc, gdzie białko prionowe występuje. Natomiast tak zwane szybkie testy umożliwiają diagnostykę przyżyciową stwierdzającą obecność prionów w tkance limfatycznej przed wystąpieniem objawów klinicznych choroby (za Polak i Żmudziński, 2008; Fast i Groschup, 2013).

W roku 1998 w Norwegi (Benestad, i wsp., 2003) zdiagnozowano pierwszy przypadek scrapie z nietypowymi dla klasycznej formy objawami, a mianowicie brakiem świądu, nerwowością i wzmożoną niezbornością ruchową (Benestad, i wsp., 2003, 2008; za Polak i wsp., 2007). Atypowa, nazywana również Nor98 forma trzęsawki dotyka zwierzęta starsze powyżej 5 roku życia o genotypach należących do klas opornych na klasyczną postać scrapie wg DEFRA (Fast i Groschup, 2013). Atypowa postać trzęsawki charakteryzuje się dłuższym czasem inkubacji oraz odmiennym profilem glikozylacji białka prionowego: masa cząsteczkowa 13-31kDa, w stosunku do klasycznej postaci 18-30kDa. Białko PrP^{Sc} gromadzi się w postaci wakuol w móżdżku i korze mózgowej. Obserwuje się większą degradację białka prionowego patogennego pod wpływem trawienia proteinazą K (Benestad i wsp., 2003; za Polak i wsp., 2007; za Larski Z., 2011). W Portugali do roku 2004 wykryto 7 przypadków scrapie, które różniły się miejscem gromadzenia patogennej formy białka prionowego oraz degradacją pod wpływem proteinazy K. Osobniki były nosicielami alleli warunkujących oporność na klasyczną postać trzęsawki: $A_{136}R_{154}R_{171}$, $A_{136}R_{154}Q_{171}$ i $A_{136}H_{154}Q_{171}$ (Orge i wsp., 2004). Ministerstwo Rolnictwa i Leśnictwa Nowej Zelandii – państwa wolnego od klasycznej postaci trzęsawki w 2010 roku przedstawiło raport o wystąpieniu Nor98 (MacDiarmid S. (2010).

W Polsce przypadki atypowej postaci trzęsawki zdiagnozował testem ELISA i potwierdził systemem Western blotting zespół Polaka (Polak i wsp.,

2010). Stwierdzono cztery przypadki atypowej postaci scrapie. Trzy dotyczyły zwierząt padłych w kolejno: 109, 84 i 96 miesiącu oraz owcy żywej w 132 miesiącu życia. Zwierzęta należały do klasy: G2 i G3 oporności/podatności na trzęsawkę i nie wykazywały objawów klinicznych klasycznej formy choroby (Polak i wsp., 2009).

4.2. Badania nad prionami

Pojęcie białkowego czynnika zakaźnego – prion - **pro**teinaceous **in**fectious particie na łamach magazynu „Science" wprowadził w 1982 roku Stanley Prusiner. W 1997 otrzymał nagrodę Nobla w dziedzinie fizjologii i medycyny za odkrycie „*prostych białek mogących być czynnikami chorobotwórczymi*". Już w latach 30 ubiegłego stulecia angielscy, francuscy i niemieccy weterynarze prowadzili badania dotyczące trzęsawki, mające na celu identyfikację czynnika zakaźnego, polegające między innymi na wszczepianiu do mózgu i rdzenia kręgowego zdrowych zwierząt czynnika infekcyjnego (Brown i Bradley, 1998). Od 1936 roku powszechnie wiedziano o zakaźnej naturze scrapie dzięki eksperymentom prowadzonym przez Cuille i Chelle (Prusiner, 2004). Swoje zasługi w badaniach nad TSE ma zespół Gajduska, który to w 1957 roku odkrył chorobę kuru w górach Papuy-Nowej Gwinei (Gajdusek, 1977). W 1966 roku w wyniku eksperymentu przepasażowano tę chorobę na szympansy (Hörnlimann i wsp., 2006), potwierdzając teorię wirusa o powolnym działaniu, jako czynnika infekcyjnego wysuniętą przez Sigurdssona w 1954 roku (Gajdusek, 1977; Liberski i Bartosiewicz, 2001). W 1972 Diener przedstawił hipotezę mówiącą, że czynnikiem zakaźnym wywołującym scrapie jest viroid, czyli naga, kolista i samo replikująca się cząsteczka RNA (Diener,1972; za Deptuła i Pawlikowska, 1999; za Strzelec i Niżnikowski, 2004). Badania zespołu Alper z Hammersmith Hospital in London sugerowały jednak brak kwasów nukleinowych DNA, bądź RNA w czynniku zakaźnym, które degradowane są pod wpływem światła UV lub promieniowania jonizującego (Alper i wsp., 1967; Rabenau i wsp., 2001). W 1966 roku Alper i współpracownicy wysunęli najpierw teorię polisacharydów, jako czynników infekcyjnych (Alper i wsp., 1966), a potem w 1978 roku zasugerowali lipidy (Alper i wsp., 1978). Jednak to badania

Griffith, który w 1967 roku wysunął hipotezę mówiącą, że czynnikiem patogennym warunkującym wystąpienie encefalopatii gąbczastych jest białko o odmiennej konformacji przestrzennej (Griffith, 1987) naprowadziły zespół Prusinera do prowadzenia badań w kierunku protein. Naukowcy pod kierunkiem Prusinera wykazali występowanie dwóch form: białka prionowego komórkowego PrP^{C} oraz jego patogennej formy scrapie PrP^{Sc} (Prusiner, 1998; Hörnlimann i wsp., 2006). Białko prionowe komórkowe jest syntetyzowane przez organizmy: ssaków, ptaków, owadów czy grzybów nitkowatych (za Wierzbicka i Deptuła, 2008). Białka zakaźne drożdży piekarniczych *Saccharomyces cerevisiae:* URE2p URE3 i Sup35p (PSI^{+}) tworzą nowe formy poprzez zmianę konformacji przestrzennej prowadząc do namnożenia się tej formy bez udziału materiału genetycznego (Prusiner, 1998; za Deptuła i Pawlikowska, 1999; Brown, 2009).

4.2.1. Budowa białka prionowego i jego funkcje

Białko prionowe jest sialoglikoproteidą hydrofobową. Masa cząsteczkowa PrP^{C} wynosi 33-35 kD i ulega degradacji pod wpływem: proteinazy K, nukleaz, trypsyny, formaliny, detergentów (np.: fenol, kwas mrówkowy, zasada sodowa etc.), promieniowania UV i jonizującego, a także w wyniku sterylizacji termicznej. Forma PrP^{Sc} natomiast ulega degradacji do masy cząsteczkowej 27-30 kD. Białko prionowe komórkowe jest rozpuszczalne w wodzie i detergentach w przeciwieństwie do jego formy patogennej (Carp, 1985; Prusiner, 1998; za Deptuła i Pawlikowska, 1999; Rabenau i wsp. 2001). Domena C-końcowa białka prionowego komórkowego składa się z trzech α helis: H1 143-152 hydrofilowa, H2 171-192 i H3 199-226 hydrofobowe stanowiących 38-43% oraz 2 β-nici ok.3-14%, natomiast białko prionowe typu scrapie jest β-harmonijką, w której 19-30% stanowią &-helisy, a 38-43% β-nici (Prusiner, 1998; za Salwa i Iwanicki , 2004; Hörnlimann i wsp., 2006, za Kaczor i Domoń, 2009) Liniowa struktura jest oporna na czynniki fizyko-chemiczne. Owcze białko prionowe zbudowane jest z 255 aminokwasów przed obróbką translacyjną, natomiast po obróbce translacyjnej z 210 aminokwasów. Zawiera reszty kwasu sialowego, mostek dwusiarczkowy oraz dwa miejsca glikozylacji (Prusiner, 2004, za Kaczor

i Domoń, 2009). Białko to występuje na powierzchni komórek gleju, neuronów, leukocytów, neutrofilach, płytkach krwi, monocytach, tkankach limfoidalnych i immunocytach (Blättler, 2002; za Wierzbicka i Deptuła, 1999; 2008).

Przyjmuje się występowanie białek prionowych w trzech typach (Wickner, 1997; za Deptuła i Pawlikowska, 1999):

- PrP^{Sc} stabilne wykazujące możliwość pasażu tylko w obrębie gatunku
- PrP^{Sc} zachowujące pierwotne właściwości po pasażu na inny gatunek
- PrP^{Sc} niestałe niezachowujące pierwotnych właściwości

Rola fizjologiczna białka prionowego nie została dokładnie poznana, dlatego też sugeruje się, iż odgrywa rolę w cyklu okołodobowym komórki oraz jej wzroście i różnicowaniu, a także przy indukcji receptora acetylocholiny. Pełni funkcję ochronną przed stresem oksydacyjnym oraz programową śmiercią komórki i jest odpowiedzialne za rozwój mięśni. Bierze udział w transbłonowym przekazywaniu sygnałów, asymilacji ligandów oraz w gospodarce jonowej miedzi oraz aktywacji komórek T (Reisner, 2002; Turu i wsp., 2008; za Strzelec i Niżnikowski, 2004; za Wierzbicka i Deptuła, 2008). Prawdopodobnie bierze udział w procesach metabolizmu miedzi(II) (Woźna, 2009).

Białko prionowe komórkowe jest wysoko konserwatywne. Podobieństwo u ssaków jest na poziomie od 84 do 97%. Między owcą a bydłem wynosi 97,3% (dotyczy 7 aminokwasów), natomiast między bydłem a człowiekiem 89,3% (dotyczy 30 aminokwasów) (Wopfner i wsp., 1998; za Deptuła i Pawlikowska, 1999; za Salwa i Iwanicki, 2004; za Wierzbicka i Deptuła, 2008).

4.2.2. Teorie prionu

Obowiązująca teoria prionu Prusinera przedstawia prion, jako małą białkową infekcyjną cząstkę oporną na czynniki modyfikujące kwasy nukleinowe, które mogą, ale nie muszą ich zawierać (Prusiner, 1982; 1998). Model zaproponowany przez Prusinera, Weissmanna i Hooda przedstawia izoformę PrP^{Sc}, jako tą, która wymusza zmianę struktury drugorzędowej białka prionowego komórkowego, tworząc kompleksy heterodimerów

(Prusiner, 2004). Obok obowiązującej teorii prionu powstały alternatywne teorie:

- **Hipoteza powolnego wirusa „slow virus”** – wysunięta w latach 50-tych ubiegłego stulecia przez Björna Sigurdssona i potwierdzona w latach 60-tych przez Daniela Carletona Gajduska oraz Williama Hadlow (Prusiner, 1998). Scrapie wywołana miała być wirusem o bardzo długim okresie inkubacji, czyli tak zwanym wirusem powolnym (slow virus). (Prusiner, 1998). Natomiast Heino Diringer i Laura Manuelidis uważali, że cząsteczka wirusa o długości 10nm, jako czynnik zakaźny jest chroniona przed szkodliwymi dla niego czynnikami fizyko-chemicznymi specjalnym kapsydem (Hörnlimann i wsp., 2006).
- **Hipoteza Virino** – wysunięta w 1979 roku (Dickinson i Outram, 1979) oraz potwierdzona w 1982 (Kimberlin, 1982). Zakłada, że kwas nukleinowy jest mniejszy od wiriodu i nie zawiera białek, ale stanowi matrycę do ich produkcji. Bardzo mała masa cząsteczkowa stanowić może o niemożliwości detekcji kwasu nukleinowego z badanego preparatu. Białko połączone z kwasem nukleinowym pochodzącym z komórki gospodarza tłumaczy brak odpowiedzi immunologicznej. Zaburzenia regulacji funkcji biochemicznych wywołanych przez kawas nukleinowy mają być przyczyną wywołania choroby (Carp i wsp, 1985; Hörnlimann i wsp., 2006).

4.3. Gen białka prionowego *PRNP*

Gen białka prionowego zarówno u ludzi, bydła, owiec czy myszy zbudowany jest z trzech eksonów. Region kodujący białko nazywany otwartą ramką odczytu (OFR – Open Reading Frame) występuje wewnątrz trzeciego eksonu (Prusiner, 1999). Podobieństwo między sekwencją ludzką a owczą jest na poziomie 65,4%, natomiast bydła a owiec 94% (Castiglioni i wsp., 1998).

Owczy gen *PRNP* zbudowany jest z 31412 par zasad i składa się z eksonów o długości odpowiednio 52, 98 i 4028 par zasad oraz z dwóch intronów o długości 2421 i 14031 par zasad. Natomiast region niekodujący

3`UTR (untranslated region - region niekodujący) ma długość 3246 par zasad, a OFR 768 par zasad. Gen białka prionowego owiec znajduje się w długim ramieniu 13 chromosomu w pozycji 13q17-q18 (Castiglioni i wsp., 1998; Lee i wsp., 1998; Tranulis, 2002; za Piestrzyńska-Kajtoch i Rejduch, 2006; Charon i Świtoński, 2012,). PrP^C jest produktem potranslacyjnym kodowanym przez 256 kodonów owczego genu *PRNP* i zbudowane z 210 aminokwasów (Fast i Groschup, 2013).

Polimorfizm genu białka prionowego owiec wykryto w ponad 30 kodonach (Goldmann W., 2008; Niżnikowski R., 2011). W poniższym zestawieniu podano wykryte i opisane mutacje punktowe SNP (single nucleotide polymorphism - polimorfizm pojedynczego nukleotydu) odpowiedzialne za podstawienia jednonukleotydowe warunkujące włączanie do sekwencji łańcucha polipeptydowego odmiennych aminokwasów.

Kodon	**DNA**	**Symbol**	**Aminokwas**	**Autor**
83	GGC	G	GLICYNA	Acin i wsp., 2004
	GGG	G	GLICYNA	
85	-	R	ARGININA	Lan i wsp., 2006
	-	G	GLICYNA	
94	-	G	GLICYNA	Meydan i wsp., 2013
	-	G	GLICYNA	
101	CAG	Q	GLUTAMINA	Acin i wsp., 2004
	CGG	R	ARGININA	
103	-	N	ASPARAGINA	Acin i wsp., 2013
	-	H	HISTYDYNA	
112	ATG	M	METIONINA	Ikeda i wsp., 1995
	ACG	T	TREONINA	
	ATC	I	IZOLEUCYNA	Zhang i wsp., 2004
116	GCA	A	ALANINA	Ün i wsp., 2008
	-	E	KWAS GLUTAMINOWY	
	CCA	P	PROLINA	Seabury i Derr, 2003

123	-	A	ALANINA	Acin i wsp., 2013
	-	T	TREONINA	
127	GGC	G	GLICYNA	Lan i wsp., 2006
	AGC	S	SERYNA	Gombojav i wsp., 2003
	GTC	V	WALINA	
	GCC	A	ALANINA	Goldmann i wsp., 2005
128	-	L	LEUCYNA	Meydan i wsp., 2013
	-	I	IZOLEUCYNA	
132	-	M	METIONINA	Meydan i wsp., 2013
	-	L	LEUCYNA	
135	-	S	SERYNA	Meydan i wsp., 2013
	-	R	ARGININA	
136	GCC	A	ALANINA	Baylis i wsp., 2000
	GTC	V	WALINA	
	ACC	T	TREONINA	Acutis i wsp., 2004
137	ATG	M	METIONINA	Thorgeirsdottir i wsp., 1999
	ACG	T	TREONINA	
	-	V	WALINA	Meydan i wsp., 2013
138	AGC	S	SERYNA	Thorgeirsdottir i wsp., 1999
	AAC	N	ASPARAGINA	
	CGC	R	ARGININA	Ün i wsp., 2008
	-	M	METIONINA	
	AGT	S	SERYNA	DeSilva i wsp., 2003
141	CTT	L	LEUCYNA	Acin i wsp., 2004
	TTT	F	FENYLOALANINA	
142	ATA	I	IZOLEUCYNA	Zhou i wsp., 2005
	ACA	T	TREONINA	
	AAA	K	LIZYNA	Vaccari i wsp., 2007
143	CAT	H	HISTYDYNA	DeSilva i wsp., 2003
	CGT	R	ARGININA	
145	-	G	GLICYNA	Acin i wsp., 2013
	-	V	WALINA	

146	-	N	ASPARAGINA	Zhang i wsp., 2004
	-	S	SERYNA	
	-	L	LIZYNA	Meydan i wsp., 2013
151	CGT	R	ARGININA	Acin i wsp., 2004
	GGT	G	GLICYNA	
	CAT	H	HISTYDYNA	
	TGT	C	CYSTEINA	Tranulis i wsp., 1999
152	TAC	Y	TYROZYNA	Zhang i wsp., 2004
	TTC	F	FENYLOALANINA	
154	CGT	R	ARGININA	Alvarez i wsp., 2006
	CTT	L	LEUCYNA	
	CAT	H	HISTYDYNA	Baylis i wsp., 2000
159	-	R	ARGININA	Meydan i wsp., 2013
	-	R	ARGININA	
160	-	Y	TYROZYNA	Meydan i wsp., 2013
	-	N	ASPARAGINA	
163	-	Q	GLUTAMINA	Meydan i wsp., 2013
	-	H	HISTYDYNA	
167	AGA	R	ARGININA	DeSilva i wsp., 2003
	AG?	S	SERYNA	
168	CCA	P	PROLINA	Goldmann i wsp., 2006
	CTA	L	LEUCYNA	
171	CAG	Q	GLUTAMINA	Baylis i wsp., 2000
	CAT/CAC	H	HISTYDYNA	
	CGG	R	ARGININA	
	AAG	K	LIZYNA	Billinis i wsp., 2004
172	TAT	Y	TYROZYNA	Acin i wsp., 2004
	GAT	D	KWAS ASPARGINOWY	
173	-	S	SERYNA	Ün i wsp., 2008
	-	N	ASPARAGINA	

175	CAG	Q	GLUTAMINA	Acin i wsp., 2004
	GAG	E	KWAS GLUTAMINOWY	
176	AAC	N	ASPARAGINA	Acin i wsp., 2004
	AAA	K	LIZYNA	
179	-	V	WALINA	Ün i wsp., 2008
	-	E	KWAS GLUTAMINOWY	
180	CAT	H	HISTYDYNA	DeSilva i wsp., 2003
	TAT	Y	TYROZYNA	
185	ATC	I	IZOLEUCYNA	Otelea i wps., 2011
	ACC	R	ARGININA	
189	CAA	Q	GLUTAMINA	Barbar i wsp., 2009
	CTA	L	LEUCYNA	Gombojav i wsp., 2003
	CGA	R	ARGININA	
193	-	T	TREONINA	Meydan i wsp., 2013
	-	S	SERYNA	
195	ACC	T	TREONINA	DeSilva i wsp., 2003
		S	SERYNA	
196	ACC	T	TREONINA	DeSilva i wsp., 2003
	-	S	SERYNA	
211	CGA	R	ARGININA	Bossers i wsp., 2000
	CAA	Q	GLUTAMINA	
231	AGG	R	ARGININA	Acin i wsp., 2004
	CGG	R	ARGININA	
237	CTG	L	LEUCYNA	Belt i wsp., 1995
	CTC	L	LEUCYNA	
	CCC	P	PROLINA	Heaton i wsp., 2010
241	CCT	P	PROLINA	Babar i wsp., 2008
	TCT	S	SERYNA	Benkel i wsp., 2007

W przypadku genu *PRNP* owiec mutacje te mają znaczenie funkcjonalne, a mianowicie mogą wpływać na zmianę struktury przestrzennej białka prionowego. SNP, jako forma polimorfizmu DNA, czyli występowania dwóch lub więcej alleli w danym locus, wykrywane są przy zastosowaniu odpowiednich technik analizy DNA takich jak: sekwencjonowanie (Kutzer i wsp., 2002), PCR-SSCP (single strand conformation polimorphism - polimorfizm konformacji pojedynczych nici DNA), DGGE (denaturating gradient gel electrophoresis – elektroforeza w gradiencie czynnika denaturującego) (Belt i wsp., 1995; Thorgeirsdottir i wsp., 1999), TGGE (temperature gradient gel electrophoresis – elektroforeza w gradiencie temperatury), real-time PCR (PCR w czasie rzeczywistym), ASA (allele specific amplification), ARMS (amplification refractory mutation system), AFLP (amplified fragment length polymorphism – polimorfizm długości amplifikowanych fragmentów). Metod identyfikacji SNP jest znacznie więcej, jednak wybierając właściwą technikę należy kierować się oczekiwanym celem badań, ilością osobników poddawanych badaniu, czułością metody oraz sprzętem, jakim dysponujemy. Najczęściej stosowaną techniką detekcji polimorfizmu pojedynczego nukleotydu jest PCR-RFLP (restricted fragment length polymorphism – polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych). Powielony pożądany fragment DNA za pomocą reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR – polymerase chain reaction) zostaje pocięty przez właściwie dobrane enzymy restrykcyjne na krótsze odcinki o ściśle określonych długościach. Pojawienie się mutacji punktowych zmieniających sekwencję nukleotydów w genie uniemożliwia rozpoznanie miejsca cięcia przez określone restryktazy danego odcinka DNA (Słomski, 2004; Charon i Świtoński, 2012).

Nazwy genotypów w tripletach genu *PRNP* utworzono od symboli aminokwasów, które są kodowane przez trójki nukleotydów. Badania prowadzone przez wiele zespołów naukowych (między innymi: Guo i wsp., 2003; Goldmann i wsp., 2005; Niżnikowski i wsp., 2006; Wiśniewska i wsp., 2006; Groschup i wsp., 2007) wykazały powiązanie SNP w kodonach 136, 154 i 171 z podatnością/opornością owiec na scrapie. W triplecie 136: aminokwas alanina (A) kodowane są przez trójkę nukleotydów G**C**C,

powiązana jest z opornością, a walina (V) kodowana przez G**T**C z podatnością na scrapie. W kodonie 154: arginina (R) włączana przez nukleotydy C**G**T warunkuje podatność, natomiast histydyna (H) przez C**A**T częściową oporność na trzęsawkę. W triplecie 171 arginina (R) kodowana przez C**G**G powiązana jest z opornością, glutamina (Q) C**A**G oraz histydyna (H) CA**T** z podatnością. Do najczęściej obserwowanych, rutynowo określanych w badaniach oraz mających istotny wpływ na oporność/podatność na scrapie należą haplotypy: $A_{136}R_{154}R_{171}$, $A_{136}R_{154}Q_{171}$, $A_{136}H_{154}Q_{171}$, $A_{136}R_{154}H_{171}$ oraz $V_{136}R_{154}Q_{171}$ (np. Hunter i wsp., 1997; Hunter i wsp., 1997a; Goldmann i wsp., 2006; Niżnikowski, 2011). Allel ARR jest najbardziej pożądanym, ze względu na wysoką naturalną oporność na scrapie. Posiada jednak obniżony stopniej oporności tylko w połączeniu z niektórymi allelami. Haplotypy ARQ>ARH>AHQ wykazują średnią oporność na scrapie, natomiast triplet VRQ, ze względu na najwyższą podatność na chorobę oraz najkrótszy czas inkubacji, jest najmniej pożądanym allelem i dąży się do jego eliminacji poprzez selekcję (Hörnlimann i wsp., 2006, Fast i Groschup, 2013). Pięć alleli tworzy piętnaście genotypów, występując w układach zarówno heterozygotycznych, jak i homozygotycznych. Poniżej przedstawiono podział genotypów na klasy oporności/podatności owiec na klasyczną postać scrapie według DEFRA 2006:

- **G5** - wysoce podatne na scrapie: VRQ/VRQ, VRQ/ARQ, VRQ/AHQ, VRQ/ARH
- **G4** – wysokie ryzyko wystąpienia objawów klinicznych, podatne: VRQ/AR151R
- **G3**- podwyższone ryzyko wystąpienia objawów klinicznych, neutralne: AHQ/AHQ, AHQ/ARH, ARQ/ARH, ARQ/AHQ, ARQ/ARQ, ARH/ARH
- **G2** - neutralne-niewrażliwe, małe ryzyko wystąpienia scrapie: ARR/ARH, ARR/ARQ, ARR /AHQ
- **G1** – najbardziej oporne, niskie ryzyko występowania klasycznej postaci: ARR/ARR

Literatura podaje występowanie haplotypów AHR i VRR. Ze względu na sporadyczność, z jaką allele te są wykrywane nie zostały one uwzględnione w klasyfikacji DEFRA (Kutzer i wsp., 2002). W triplecie 136

wykryto SNP warunkujący kodowanie aminokwasu treoniny (T) przez trójkę nukleotydów GCC, a także mutację punktową w triplecie 171 będącą odpowiedzialną za przyłączanie aminokwasu lizyny (K) AAG, które nie zostały przypisane do żadnej z klas oporności owiec na scrapie (Guan i wsp., 2011).

Odkrycie i opisanie atypowej postaci trzęsawki postawiło przed naukowcami kolejny problem badawczy. Badania naukowe wykazały, że osobniki o genotypach należących do klas opornych na scrapie wg DEFRA są najbardziej podatne na postać Nor98 np.: ARQ, AHQ i ARR (Lühken i wsp., 2007). Powiązano polimorfizm genu białka prionowego w triplecie 141, warunkujący włączanie aminokwasów leucyny (L) lub fenyloalaniny (F) przez nukleotydy: **C**TT**/T**TT, z podatnością/opornością na atypową postać trzęsawki oraz z długością okresu inkubacji (Rejduch, 2008). Fenyloalanina w kodonie 141 powiązana jest z wysokim ryzykiem wystąpienia Nor98 (McIntyre i wsp., 2008). Wykazano również, że owce noszące allel $A_{136}F_{141}R_{154}Q_{171}$ są bardziej podatne na atypową postać scrapie niż te, które noszą allelomorf $A_{136}L_{141}R_{154}Q_{171}$ (Goldmann, 2008). Z wysoką podatnością na atypową postać trzęsawki powiązano również allel $A_{136}L_{141}H_{154}Q_{171}$ (Meydan i wsp., 2013). Wykazano także, że osobniki noszące allel $A_{136}L_{141}R_{154}R_{171}$ są podatniejsze na Nor98, niż te obdarzone haplotypem $V_{136}L_{141}R_{154}Q_{171}$ (Fediaevsky i wsp., 2010). Naukowo stwierdzono, że owce zakażone scrapie będące homozygotami L141L charakteryzują się krótszym czasem inkubacji od osobników noszących genotyp F141F i L141F (Tan i wsp., 2012). W Nowej Zelandii, kraju wolnym od scrapie wykryto przypadek Nor98 u jednego osobnika należącego do badanej populacji 1512 owiec. Wszystkie osobniki były homozygotami $A_{136}L_{141}R_{154}R_{171}/A_{136}L_{141}R_{154}R_{171}$, należącymi do grupy najwyższej oporności na klasyczną postać trzęsawki. Wynik ten może potwierdzać tezę, że osobniki należące do klasy G1 według DEFRA są podatne na atypową postać scrapie (Kittelberger i wsp., 2010).

Wykazuje się również związek mutacji w triplecie 138 i 151 z wrażliwością na trzęsawkę (Rejduch, 2008) oraz kodonie 137 i 168 z ryzykiem wystąpienia trzęsawki u owiec (McIntyre i wsp., 2008). Heterozygoty noszące allelomorf $A_{136}R_{154}L_{168}Q_{171}$ powiązano z podwyższeniem oporności owiec na scrapie (Goldmann i wsp., 2006). Kodowanie aminokwasu cysteiny (C) w kodonie

151 powiązano z opornością na trzęsawkę owiec pochodzących z Islandii (Thorgeirsdottir i wsp., 1999). Natomiast na podstawie badań populacji owiec rasy suffolk i corridale z Japonii zasugerowano wpływ mutacji w kodonie 112 warunkującej przyłączanie aminokwasu treoniny (T) na oporność na trzęsawkę (Ikeda i wsp., 1995).

Regulacje prawne dotyczące zapobiegania, zwalczania i kontroli chorób należących do encefalopatii gąbczastych takie jak: Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) NR 999/2001, Rozporządzenie Komisji (WE) NR 260/2003, Rozporządzenie Komisji (WE) NR 1492/2004 czy Decyzja Komisji 2003/100/WE, wpłynęły na tworzenie programów hodowlanych zmierzających do ograniczenia w populacji owiec alleli zwiększających podatność na scrapie. Działania podjęte w tym kierunku mają na celu określenie frekwencji alleli i genotypów, a także selekcję zwierząt pod kątem uzyskania stad należących do klasy najbardziej opornych na klasyczną postać trzęsawki (Strzelec i Niżnikowski, 2004a; Niżnikowski i wsp., 2006; Niżnikowski, 2009 i 2009a). Takie działania wprowadzono w życie w 1998 na terenie Królestwa Niderlandów, w 2001 we Francji i Anglii (Nodelijk i wsp., 2011). O znaczeniu choroby, jaką jest trzęsawka świadczy ujęcie jej atypowej formy w raporcie „Zagrożenia okresowe występujące w Polsce" Rządowe Centrum Bezpieczeństwa z 2010 roku (RCB, 2010) oraz raporcie „Stan zakaźnych chorób zwierząt" Główny Inspektorat Weterynarii z 2011 roku (GIW, 2011).

5. MATERIAŁ I METODY

5.1. Materiał zwierzęcy

Badaniami objęto 424 owce zróżnicowane rasowo pochodzące z terenów Polski, Słowacji oraz Włoch. Materiał biologiczny do badań stanowiła krew obwodowa owiec, którą pobrano jednorazowo z żyły jarzmowej zwierząt do sterylnych probówek zawierających antykoagulant K_2EDTA. Materiał biologiczny na czas transportu umieszczono w lodówce przenośnej w temperaturze 4°C, a następnie po przewiezieniu do laboratorium zamrożono i przechowywano w temperaturze -20°C do czasu izolacji DNA.

Populację owiec z Polski stanowiły osobniki należące do ras: ile de france (n=100), kamieniecka (n=101) i wrzosówka (n=80) pochodzące z owczarni położonych na terenie województw: Warmińsko-Mazurskiego i Kujawsko-Pomorskiego.

Owce ze Słowacji pochodziły z hodowli w Ústav chovu oviec Trenčianska Teplá w regionie Trenčín. Należały one do rasy lacaune (n=37), cigája (n= 15), oraz mieszańców zošľachtená valaška x lacaune (n=13) i lacaune x cigája (n=17).

Poddane badaniu owce pochodzące z regionu Molise we Włoszech należały do rasy apennine (n=50) oraz do mieszańców apennine x merynos derivertia (n=11). Zwierzęta utrzymywane były w systemie pastwiskowym.

Objęta badaniami populacja owiec reprezentuje zróżnicowany genetycznie i rasowo materiał zwierzęcy. Owce pochodziły z różnych regionów Europy i utrzymywane były w różnych kierunkach użytkowania często w odmiennych systemach chowu. Poniżej przedstawiono charakterystykę ras oraz mieszańców owiec, na których materiale biologicznym wykonane zostały badania własne dotyczące polimorfizmu genu *PRNP* owiec w kodonach: 127, 141, 151, 171 oraz 189:

- **apennine –** rasa użytkowana w kierunku mięsno-wełnistym. Wytworzona w 1970 roku we Włoszech z lokalnych ras owiec krzyżowanych z importowanymi owcami rasy bergamesca i ile de france. Samce osiągają wagę do 80 kg, natomiast samice do 60kg. Od tryków rocznie uzyskuje się 3,5kg wełny, podczas gdy od maciorek

do 2,5kg. Owce tej rasy znane również pod nazwą: appenninica, bariscianese, chietina varzese, perugina del piano (EFABIS, 2013; MSR, 2013r.).

- **cigája –** rasa użytkowana w kierunku mlecznym i mięsnym (produkcja jagniąt rzeźnych) o średniej wełnie. Rasa ta została udoskonalona przez dolew krwi między innymi merynosów. Samce tej rasy osiągają wagę 70kg, a samice 50kg. Owce odporne na niesprzyjające warunki klimatyczne, wypasane na wysokości 500-800m n.p.m. (EFABIS, 2013).
- **ile de france** – owce tej mięsnej rasy ze względu na bardzo dobrze rozwinięte cechy tuczne i rzeźne wykorzystywane są do krzyżowania towarowego z merynosami w celu zwiększenia wydajności rzeźnej oraz poprawienia jakości wełny. Należą do grupy dobrze aklimatyzującej się w trudnych warunkach środowiskowych. Rasa asezonalna, wcześnie dojrzewająca. Samice osiągają wagę 100-125kg, samce do 160-80kg, plenność 130-150%, użytkowość rozpłodowa 120-130% (Niżnikowski, 2011).
- **kamieniecka** – rasa dwustronnego użytkowania mięsno-wełnistego i wełnisto-plennym należąca do populacji owiec długowełnistych. Wytworzona latach 1954-1965 w gospodarstwie Kamieniec Państwowego Ośrodka Hodowli Zarodowej Susz z maciorek świniarki i pomorskiej krytych trykami kolejno texel i leine oraz kent. Następnie potomstwo kojarzono między sobą przy jednoczesnym dolewie krwi ras plennych. Owce odporne na niesprzyjające warunki klimatyczne takie jak zimno czy duża wilgotność. Znana również pod nazwą suska. Samce osiągają wagę 90-110kg, a samice 60-70kg, plenność 140%, użytkowość rozpłodowa 120% (Kawęcka i Sikora, IZ; Niżnikowski, 2011).
- **lacaune** – użytkowana w typie mlecznym i dla produkcji jagniąt rzeźnych. Rasa ta pochodzi z Tarn we Francji. Z mleka tej rasy produkuje się sery Roquefort. Do Słowacji importowana w roku 1990 i 2000. Samce osiągają wagę 95kg, a samice 70kg (Niżnikowski, 2011; EFABIS, 2013).

- **wrzosówka** – użytkowana w jednostronnym typie: kożuchowym: 75-80% włosów puchowych i 20-25% włosów przejściowych i rdzeniowych. Rasa pochodząca z terenów Północno-Wschodniej Polski należąca do grupy północnych owiec krótko ogoniastych. Ze względu na przystosowanie do ubogich warunków środowiskowych oraz wysokiej odporności na choroby wykorzystywana do pielęgnacji krajobrazu i redukcji biomasy. Samce osiągają wagę 40kg, natomiast samice 32kg, plenność 150% (Kawęcka i Sikora, IZ; Niżnikowski, 2011).
- **apennine x merynos derivertia** mieszańce użytkowane w kierunku mięsno-wełnistym (EFABIS, 2013; MSR, 2013).
- **cigája x lacaune -** mieszańce użytkowane w trzech kierunkach: mięsnym, mlecznym i wełnistym. Krzyżowane w celu poprawy wydajności mlecznej i płodności (EFABIS, 2013).
- **zošľachtená valaška x lacaune** – mieszańce użytkowane w trzech kierunkach: mięsnym, mlecznym i wełnistym. Rasa zošľachtená valaška powstała z krzyżowania ras lokalnych z rasami importowanymi między innymi: texel, hampshire down, lincoln, longwool, leicester longwool, lacaune. Samce tej rasy osiągają wagę 75kg, a samice 50kg. Owce odporne na zimno i mokre warunki górskie (EFABIS, 2013).

5.2. Izolacja DNA

Izolację kwasu deoksyrybonukleinowego z krwi obwodowej owiec przeprowadzono za pomocą komercyjnego zestawu odczynników MasterPure™ DNA Purification Kit for Blood Version II firmy Epicentre Technology według protokołu B2 o nazwie DNA Purtification for 200µl of Whole Blood (with RBC Lysis) z własnymi modyfikacjami, co pozwoliło na otrzymanie materiału genetycznego niezbędnego do badań o odpowiedniej koncentracji oraz czystości. W porównaniu z metodyką producenta wprowadzono następujące modyfikacje:

- Do probówek przeniesiono 100µl pełnej krwi owczej.

- Probówki po etapie inkubacji w temperaturze pokojowej z Red Cell Lysis Solution zwirowano w temperaturze 4°C przez 2 minuty przy 12 000 obrotów/minutę.
- Po inkubacji w 37°C z RNazą dodano 175µl Protein Precipitation Reagent oraz worteksowano przez 60 sekund.
- Dodano 45µl Buforu TE oraz pozostawiono do inkubacji w temperaturze pokojowej na noc po osuszeniu z etanolu.

5.3. Analiza jakościowa i ilościowa DNA

Wyizolowane genomowe DNA poddano ocenie jakościowej oraz ilościowej. Stężenie oraz czystość materiału genetycznego mierzono w spektrofotometrze MBA2000 firmy PerkinElmer. Próby sprawdzono pod kątem jakościowym metodą rozdziału elektroforetycznego w 1% żelu agarozowym (GenoPlast Biochemicas Agarose) w obecności markera molekularnego O`GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus, ready-to-use (Fermentas) w 1x stężonym buforze TBE (10xTBE: 0,89M Tris, 0,89M kwas borowy, 0,02M EDTA, pH 8,0) z dodatkiem 0,5µl barwnika Midori Green DNA Stain (NIPPON) na 10ml buforu TBE. W studzienki naniesiono 3µl DNA zawieszonego w 2µl obciążacza 6xLoading Dye Solution (Fermentas). Rozdział elektroforetyczny wykonano pod napięciem 120V przez 30 minut. Wynik przeprowadzonej analizy wizualizowano w świetle UV i zarchiwizowano przy pomocy systemu do wizualizacji i archiwizacji G:BOX Chemi XR5 firmy Syngene.

5.4. PCR

Amplikon stanowił fragment otwartej ramki odczytu, znajdującej się w trzecim eksonie genu białka prionowego owiec. W celu amplifikacji specyficznego fragmentu DNA o długości 545 par zasad przygotowano mastermix w 15µl objętości ogólnej na próbę. W skład mieszaniny wchodziło: 100ng owczego DNA, 10mM dNTP Mix (Fermentas), 1 x stężony bufor Dream Taq™ Buffer (Fermentas), 10 pmol primera forward i reverse, 1,5U polimerazy *Taq* (Fermentas), 8,7µl wody demineralizowanej według metodyki Lühken i wsp. (2008) z modyfikacjami własnymi. Do reakcji PCR użyto starterów zaprojektowanych przez Lühken i wsp. (2008):

- **Forward** 5` AACCAACATGAAGCATGTGGC 3` (nukleotyd 22604-22624 GenBank sekwencja U67922)
- **Reverse** 5` AAGCAAGAAATGAGACACCACC 3`, (nukleotyd 23127-23148 GenBank sekwencja U67922)

Fragment genu białka prionowego amplikowano w termocyklerze Mastercycler pro firmy Eppendorf wg metodyki Lühken i wsp. (2008). Program obejmował etapy: denaturację wstępną w temperaturze 94°C przez 90 sekund, a następnie 40 cykli obejmujących: denaturację w 94°C przez 15 sekund, przyłączenie starterów w 60°C przez 20 sekund i wydłużenie w 72°C przez 45 sekund. Po zakończeniu 40 cykli nastąpił etap syntezy końcowej w 72°C przez 5 minut. Produkt PCR sprawdzono pod kątem jakościowym metodą rozdziału elektroforetycznego w 2% żelu agarozowym (GenoPlast Biochemicas Agarose) w obecności markera molekularnego pUC19 DNA/*Msp*I (*Hpa*II) Marker, 23, ready-to-use (Fermentas) w 1x stężonym buforze TBE (10xTBE: 0,89M Tris, 0,89M kwas borowy, 0,02M EDTA, pH 8,0) z dodatkiem 0,5µl barwnika Midori Green DNA Stain (NIPPON) na 10ml buforu TBE. W studzienki naniesiono 5µl produktu PCR zawieszonego w 2µl obciążacza 6xLoading Dye Solution (Fermentas). Rozdział elektroforetyczny wykonano pod napięciem 120V przez 60 minut. Wynik przeprowadzonej analizy wizualizowano w świetle UV i zarchiwizowano przy pomocy systemu do wizualizacji i archiwizacji G:BOX Chemi XR5 firmy Syngene.

5.5. PCR-RFLP

W celu wykrycia polimorfizmów w kodonach 127, 141, 151, 171 oraz 189 genu białka prionowego owiec zastosowano metodę PCR-RFLP. W tym celu użyto restryktazy rozpoznające odpowiednie sekwencje aminokwasów. Na podstawie danych dotyczących kolejności nukleotydów genu *PRNP* owiec zamieszczonych w bazie GenBank na stronie internetowej National Center for Biotechnology Information pod numerem AJ000736.1 (NCBI, 2006) dokonano właściwego wyboru enzymów restrykcyjnych oraz wyznaczono długości odcinków uzyskanych po trawieniu amplikonu przy wykorzystaniu

programów: Webcutter2.0 oraz NEBcutterV2.0 na stronie internetowej New England BioLabs (Vincze i wsp., 2003; NEB, 2010).

W celu wykrycia polimorfizmu w odpowiednich kodonach użyto enzymów restrykcyjnych firmy Fermentas rozpoznających następujące sekwencje nukleotydów:

- **127**: *Hae*III:

  5`…G G↓C C…3`

  3`…C C↑G G…5`

- **141**: *Mnl*I:

  5`…C C T C $(N)_7$↓..3`

  3`…G G A G $(N)_6$↑…5`

- **151**: *Ava*II:

  5`…G↓G W C C…3`

  3`…C C W G↑G…5`

- **171**: *Mbo*I:

  5`…↓G A T C…3`

  3`…C T A G↑ …5`

- **189**: *Alu*I:

  5`…A G↓C T…3`

  3`…T C↑G A…5`

Przygotowano mieszaniny reakcyjne składające się z: 4U odpowiedniego enzymu restrykcyjnego, 0, 2µl wody dd (Sigma) oraz 1, 2µl rekomendowanego przez producenta buforu na próbę. Do 10µl PCR produktu dodano 2µl mixu zawierającego restryktazę, a następnie inkubowano w cieplarce przez 4 godziny w temperaturze 37°C.

Produkty PCR po trawieniu enzymami restrykcyjnymi rozdzielono elektroforetycznie w 3% żelu agarozowym (GenoPlast Biochemicas Agarose) w obecności odpowiedniego markera długości fragmentów DNA: pUC19 DNA/*Msp*I (*Hpa*II) Marker, 23, ready-to-use (Fermentas) lub O`Gene Ruler™ 50pb DNA Ladder, ready-to-use (Fermentas) oraz pBR322 DNA/*Alu*I Marker, 20, ready-to-use (Fermentas) w 1x stężonym buforze TBE (10xTBE: 0,89M Tris, 0,89M kwas borowy, 0,02M EDTA, pH 8,0) z dodatkiem 0,5µl barwnika Midori Green DNA Stain (NIPPON) na 10ml buforu TBE. W studzienki

naniesiono 10µl produktu PCR po trawieniu zawieszonego w 2µl obciążacza 6xLoading Dye Solution (Fermentas). Rozdział elektroforetyczny wykonano pod napięciem 120V przez 90 minut. Wynik przeprowadzonej analizy wizualizowano w świetle UV i zarchiwizowano przy pomocy systemu do wizualizacji i archiwizacji G:BOX Chemi XR5 firmy Syngene.

Na podstawie uzyskanych wyników metodą PCR-RFLP dokonano odczytu długości fragmentów DNA po trawieniu odpowiednimi restryktazami według markerów długości fragmentów DNA z żeli agarozowych w celu wykonania genotypowana. Wyniki analizowano w odniesieniu do objętych badaniami kodonów: 127, 141, 151, 171 i 189 w poszczególnych rasach i mieszańcach, w grupach pochodzących z Polski, Włoch i Słowacji oraz dla całej badanej populacji owiec. Wyliczono frekwencję alleli oraz genotypów ze względu na:

- rasę (ile de france, kamieniecka, wrzosówka, lacaune, cigája, apennine i mieszańców: zošľachtená valaška x lacaune, lacaune x cigája i apennine x merynos derivertia
- kraj pochodzenia (Polska, Włochy, Słowacja)

oraz dla całej badanej populacji owiec.

6. WYNIKI I DYSKUSJA

Do badań własnych w celu wykrycia polimorfizmów w kodonach: 127, 141, 151, 171 oraz 189 genu białka prionowego owiec wykorzystano materiał biologiczny, jaki stanowiła krew obwodowa owiec. Zwierzęta pochodziły z trzech państw należących do Unii Europejskiej: Polski, Słowacji i Włoch. Owce należały do ras: kamieniecka, wrzosówka, ile de france, cigája, lacaune i apennine oraz mieszańców: zošľachtená valaška x lacaune, lacaune x cigája i apennine x merynos derivertia. Użyty do analiz molekularnych materiał genetyczny, jaki stanowił kwas deoksyrybonukleinowy wyizolowany został za pomocą zestawu MasterPure™ DNA Purification Kit for Blood Version II firmy Epicentre Technology. Zestaw ten pozwolił otrzymać wysokiej jakości DNA. Odpowiednio dobrane parametry profilu termicznego reakcji PCR oraz zaprojektowane primery pozwoliły na otrzymanie amplikonu o długości 545pz, który wpisywał się w otwartą ramkę odczytu trzeciego eksonu genu *PRNP.* Zastosowana do detekcji polimorfizmów genu białka prionowego owiec metoda PCR-RFLP była odpowiednia. Pozwoliła ona na wykrycie pojedynczych mutacji punktowych w poszczególnych kodonach przy zastosowaniu odpowiednich restryktaz:

- **Kodon 127** - enzym restrykcyjny *Hae*III; triplety: GGC/GTC/AGC; kodowane aminokwasy: glicyna (G), walina (V) i seryna (S)
- **Kodon 141** - enzym restrykcyjny *Mnl*I; triplety: CTT/TTT; kodowane aminokwasy: leucyna (L) i fenyloalanina (F)
- **Kodon 151** - enzym restrykcyjny *Ava*II; triplety: TGT/CGT; kodowane aminokwasy: cysteina (C) i arginina (R)
- **Kodon 171** - enzym restrykcyjny *Mbo*I; triplety: AAG/XXX kodowane aminokwasy: lizyna (K) i inny aminokwas zapisany symbolem X, który może stanowić zarówno glutamina (Q), histydyna (H), jak i arginina (R)
- **Kodon 189**; enzym restrykcyjny *Alu*I: triplety: CAA/CTA: kodowane aminokwasy: glutamina (Q) i leucyna (L)

6.1. Polimorfizm w kodonie 127

Produkt PCR o długości 545pz po cięciu enzymem restrykcyjnym *Hae*III w przypadku wystąpienia homozygoty G127G dał prążki o długości 454pz, 54pz i 37pz, heterozygoty G127V lub G127S produkty o długościach 454pz, 91pz, 54pz i 37pz, natomiast genotypu V127V, S127S lub V127S fragmenty o długościach 454pz i 91pz. Rycina 1 przedstawia wynik rozdziału fragmentów DNA po trawieniu enzymatycznym fragmentu genu *PRNP* restryktazą *Hae*III. W celu odróżnienia genotypu V127V od S127S lub G127V od G127S, bądź stwierdzenia wystąpienia heterozygoty V127S przeprowadzono drugie trawienie enzymem restrykcyjnym *Ava*II.

Rycina 1. Rozdział fragmentów DNA w 3% żelu agarozowym po trawieniu amplifikowanego fragmentu genu *PRNP* zawierającego kodon 127 restryktazą *Hae*III. M - marker długości fragmentów DNA pUC19 DNA/*Msp*I (*Hpa*II) Marker, 23, ready-to-use (Fermentas), linie 1-5 - genotyp G127G z widocznymi prążkami o długości 454pz, 54pz i 37pz

Badania własne przeprowadzone na rasach owiec popularnych w Europie oraz rasach i mieszkańcach ściśle powiązanych z danym obszarem geograficznym nie wykazały polimorfizmu w kodonie 127. Cała poddana badaniu populacja owiec pochodzących z Polski, Słowacji oraz Włoch miała genotyp G127G. Nie zidentyfikowano genotypów V127V, S127S, S127V, G127V i G127S. Frekwencja allela G wynosiła 100% dla poszczególnych ras, mieszańców, grup badawczych, jak i dla całej populacji owiec.

Podobnie badania nad polimorfizmem genu *PRNP* w kodonie 127 przeprowadzili również naukowcy na Słowacji (Matúšková i wsp., 2003) i we Włoszech (Vaccari i wsp., 2007). W badaniach własnych jak i w badaniach

zespołu Matúšková i wsp. (2003) wykryto homozygotę G127G. Owca poddana genotypowaniu na Słowacji należała do rasy merynos. Była ona pierwszym potwierdzonym przypadkiem trzęsawki w tym kraju. Owca ta miała genotyp $G_{127}A_{136}R_{154}Q_{171}/G_{127}A_{136}R_{154}Q_{171}$ (Matúšková i wsp., 2003). We Włoszech natomiast w odróżnieniu od wyników własnych wykryto polimorfizm pojedynczego nukleotydu warunkujący kodowanie waliny. Był to jeden osobnik dotknięty trzęsawką zdiagnozowany w latach 2004-2007 o genotypie ARQ/ARQ (Vaccari i wsp., 2007).

W odróżnieniu do wyników badań własnych większe zróżnicowanie w kodonie 127 wykryto w populacji owiec z Mongolii (Gombojav i wsp., 2003; Gombojav i wsp., 2004), Chin (Lan i wsp., 2006; Guan i wsp., 2011) oraz Iranu (Karami i wsp., 2011). W populacjach tych wykryto punktową mutację w pierwszej pozycji tripletu 127 G→A warunkującą kodowanie seryny (S) i w drugiej pozycji G→T odpowiedzialną za włączanie waliny (V) w miejsce glicyny.

Mongolska populacja owiec poddana badaniu liczyła 740 osobników zróżnicowanych rasowo (Gombojav i wsp., 2004). Badane stada były małe i należały do rodzimych ras owiec takich jak: sartuul, govi-altai, bayad, darhad, sumber karakul, yeroo, orkhon czy khangai. Jedynie owce rasy khalkh stanowiły bardzo duże stado liczące 474 osobniki. We wszystkich rasach wykryto homozygoty G127G. Ponadto, wykryty w badaniach własnych genotyp G127G wystąpił z najwyższą częstością w każdej z badanych mongolskich ras owiec. Genotyp G127V wykryto u 19 osobników rasy khalkh (frekwencja 4% badanej rasy), 1 osobnika rasy bayad (frekwencja 3% badanej rasy) i 2 osobników karakul (frekwencja 6,3% badanej rasy). Natomiast heterozygotę G127S wykryto we wszystkich rasach z wyjątkiem khangai z regionu Selenge. Najwyższą częstość występowania genotypu G127S odnotowano w rasie khalkh 15,4% (n=73) tej rasy, a najniższą w rasie orkhon stanowiącą 2,86% (n=1) tej rasy. Genotyp S127S stwierdzono u 5 osobników z rasy khalkh i 1 rasy karakul. Wystąpił on z częstością odpowiednio dla danej rasy 1,15% i 3,1%. W żadnej z badanych ras nie stwierdzono homozygoty V127V oraz heterozygoty S127V (Gombojav i wsp., 2004).

W odróżnieniu do wyników własnych badania przeprowadzone na terenie Chin na trzech stadach owiec zróżnicowanych rasowo wykazały różnice w częstości występowania allela G, S i V w kodonie 127 (Lan i wsp., 2006). Wśród zwierząt należących do lokalnych ras: hazake, markit, bayanbulak, hotan, xinjiang fine wool, qira, kuqa, altay FAT rumpel wypasanych na terenie autonomicznego regionu Xinjiang wykryto allel G z częstością 93,24%, jak również S 4,96%, oraz V 1,80% dla całej badanej populacji owiec (Lan i wsp., 2006). Drugą populację pochodzącą z Chin stanowiły owce należące do lokalnych ras: small tailed han, hu, ujumqin, charolal, suffolk, dorsed, tibetan, mongol, boer. W przypadku tych owiec wykryto zarówno allel G jak i S, natomiast nie wykryto mutacji odpowiedzialnej za kodowanie waliny (Zhang i wsp., 2004). Podobnie w rasie hu wypasanej na terenach prowincji Jiangsu i mieście Shanghai w Chinach wykryto allel G i S. Wystąpiły one w układzie homozygotycznym G127G z częstością 86,67% oraz heterozygotycznym G127S z częstością i 13,33%. Nie wykryto natomiast homozygot S127S (Guan i wsp., 2011).

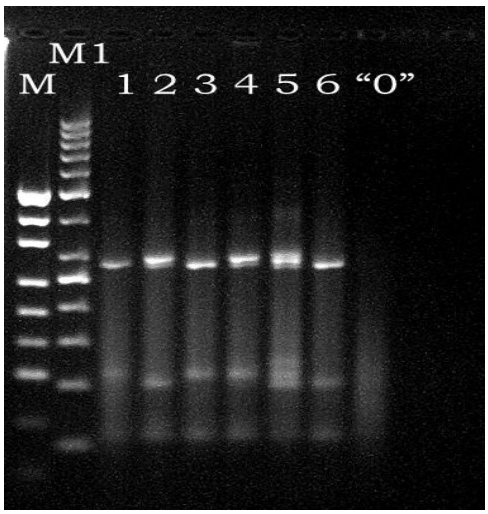
Zarówno w badaniach własnych, jak i przeprowadzonych na 250 osobnikach należących do arabskich ras pochodzących z regionu Kihuzestan w Iranie nie stwierdzono występowania allela S. Wybrane losowo do badań owce były jednak nosicielami mutacji punktowej warunkującą kodowanie waliny w kodonie 127 genu *PRNP* (Karami i wsp., 2011), której nie stwierdzono w badaniach własnych. SNP wykryto u 3 osobników w układzie heterozygotycznym G127V. Owce te zostały również poddane genotypowaniu pod względem kodonu 136, 154 i 171. Osobniki te były homozygotami ARQ/ARQ (Karami i wsp., 2011).

Owca nosząca SNP warunkujący wystąpienie allela V we Włoszech (Vaccari i wsp., 2007) jest jedynym dotychczas opisanym w literaturze przypadkiem wystąpienia haplotypu kodującego aminokwas inny, niż glicyna w pozycji 127 w populacji owiec pochodzących z Europy, Ameryki czy Afryki. Należy zwrócić uwagę, że polimorfizm w kodonie 127 nie został powiązany z podatnością/opornością owiec na klasyczną lub atypową postać scrapie i w związku z powyższym nie prowadzi się w tym kierunku rutynowego genotypowania. Natomiast można przypuszczać, że SNP w kodonie 127

warunkujący kodowanie seryny bądź waliny wykryty w kilkunastu rodzimych rasach owiec pochodzących z Azji (Gombojav i wsp., 2003; Gombojav i wsp., 2004; Lan i wsp., 2006; Guan i wsp., 2011; Karami i wsp., 2011) może być unikalny tylko i wyłącznie dla azjatyckich ras owiec i ich mieszańców.

6.2. Polimorfizm w kodonie 141

Mutacja punktowa warunkująca w kodonie 141 włączanie do łańcucha polipeptydowego leucyny (L) bądź fenyloalaniny (F) możliwa była do wykrycia przy użyciu metody PCR-RFLP. Do identyfikacji tego SNP wykorzystano enzym restrykcyjny *Mnl*I. Na rycinie 2 przedstawiono wynik rozdziału elektroforetycznego fragmentów DNA po trawieniu produktu PCR enzymem *Mnl*I. W przypadku wystąpienia homozygoty L141L otrzymano produkty o długości 263pz, 95pz, 74pz, 47pz, 27pz, 15pz, 13pz i 11pz, homozygoty F141F otrzymano produkty o długości 263pz, 122pz, 74pz, 47pz, 15pz, 13pz i 11pz, a heterozygoty L141F otrzymano produkty o długości 263pz, 122pz, 95pz, 74pz, 47, 27pz, 15pz, 13pz i 11pz.



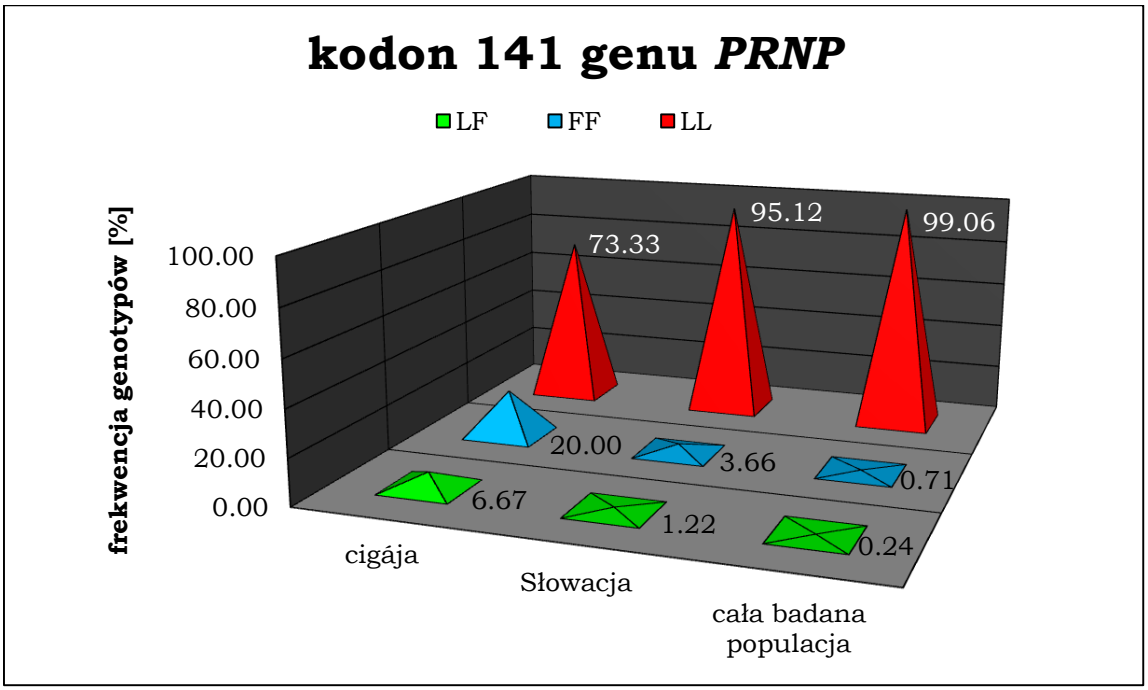
Rycina 2. Rozdział fragmentów DNA w 3% żelu agarozowym po trawieniu amplifikowanego fragmentu genu *PRNP* zawierającego kodon 141 restryktazą *Mnl*I. M - marker długości fragmentów DNA pUC19 DNA/*Msp*I (*Hpa*II) Marker, 23, ready-to-use (Fermentas), M1 O`Gene Ruler™ 50pb DNA Ladder, ready-to-use (Fermentas) linia 1, 3-4 - genotyp F141F z widocznymi prążkami 263pz, 122pz i 74pz, linie 2 i 6 - genotyp L141L z widocznymi prążkami o długości 263pz, 95pz i 74pz, linia 5 - genotyp L141F z widocznymi prążkami o długości 263pz, 122pz, 95pz i 74pz, „0" – próba zerowa.

W badaniach własnych genotyp L141L wykryto w populacji owiec utrzymywanych na terenie Polski, Włoch oraz na Słowacji. Występowanie allela L i F stwierdzono wyłącznie w rasie cigája należącej do słowackiej grupy owiec. Frekwencja allelomorfa L w rasie cigája wynosiła 76,67% i była wyższa od allelomorfa F - 23,3%. Częstość, z jaką wykryto allel L w populacji owiec utrzymywanych na Słowacji wynosiła 95,73%, natomiast allela F 4,27%. Frekwencja allelomorfa L była wyższa od allelomorfa F w całej badanej populacji owiec. Wynosiła odpowiednio 99,17% dla L i 0,83% dla F w całej poddanej badaniu populacji owiec. W tabeli 1 zestawiono frekwencje alleli.

Tabela 1. Frekwencje alleli genu *PRNP* ze względu na polimorfizm w kodonie 141

Genotypy	**L**		**F**	
	n	**%**	**n**	**%**
cigája	23	76,67	7	23,33
populacja słowacka	157	95,73	7	4,27
cała badana populacja	841	99,17	7	0,83

W rasie cigája zidentyfikowano homozygoty L141L i F141F oraz heterozygotę L141F . Częstość genotypów wynosiła odpowiednio: 73,33%, 20,00% i 6,67% dla tej rasy. Frekwencje genotypów w stadzie pochodzącym ze Słowacji wynosiły dla homozygot L141L 95,12% i F141F 3,66% oraz dla heterozygoty L141F 1,22%. Frekwencja genotypu L141L była najwyższa dla całej badanej populacji owiec i wynosiła 99,06%. Natomiast frekwencja homozygoty F141F oraz heterozygoty L141F w całej badanej populacji owiec wyniosła odpowiednio 0,71% i 0,24%. Procentowy udział genotypów dla rasy cigája, grupy owiec ze Słowacji oraz całej badanej populacji został przedstawiony graficznie na wykresie 1.



Wykres 1. Frekwencje genotypów genu *PRNP* w kodonie 141

Podobne analizy nad polimorfizmem genu białka prionowego w kodonie 141 jak w badaniach własnych, przeprowadził w Polsce również Polak i wsp. (2009). Zespół ten podjął się tych analiz ze względu na wykrycie w roku 2009 w Polsce pierwszych potwierdzonych przypadków wystąpienia scrapie (Polak i wsp., 2009). Polska do tego roku uznawana była za kraj wolny od trzęsawki. Od momentu zdiagnozowania scrapie w postaci atypowej podjęto badania w celu ustalenia genotypów osobników dotkniętych tą jednostką chorobową. Wykonano standardowo testy dla kodonów: 136, 154 i 171 oraz dla tripletu 141, którego polimorfizm powiązany jest z wrażliwością na Nor98 (Polak i wsp., 2009). Podobnie jak w badaniach własnych Polak i wsp. (2010) wykryli owce o genotypie L141L. Dwa osobniki padłe na scrapie (109 i 84 miesiące) niewykazujące klinicznych objawów choroby były homozygotami L141L o układach genotypów ALRQ/ALHQ i ALRQ/ALRR (Polak i wsp., 2010). Owce te pochodziły z terenów województwa wielkopolskiego. Pierwsza należała do stada liczącego 302 osobniki i była mieszańcem merynosa polskiego i owcy romanowskiej. Druga była czystej rasy owcą romanowską pochodzącą ze stada liczącego 1195 osobników (Polak i wsp., 2010). Kolejne poddane badaniu dwa osobniki

ze zdiagnozowaną trzęsawką pochodziły z województwa lubelskiego i małopolskiego. Owca, która padła w 96 miesiącu była heterozygotą L141F o genotypie AFRQ/ALRR, a owca poddana badaniu w 132 miesiącu heterozygotą AFRQ/ALRQ (Polak i wsp., 2009).

W badaniach własnych na owcach pochodzące ze Słowacji należących do rasy lacaune i do mieszańców zošľachtená valaška x lacaune oraz lacaune x cigája wykryto homozygoty L141L. Taki sam wynik uzyskał zespół Matúšková i wsp. (2003), który sprawdził pod kontem polimorfizmu w kodonie 141 pięcio letnią owcę rasy merynos dotkniętą scrapie i jej zdrową siostrę pochodzącą ze Słowacji (Matúšková i wsp., 2003). Monomorficzna pod względem kodonu 141 okazała się również mała, ale zróżnicowana genetycznie populacja owiec należących do lokalnych ras pakistańskich: buchi, kachi, kajli, lohi, sipli i thalli oraz krzyżówek hissardale i pak-karakul, a także rasy awassi importowanej w latach 70-tych z Lebanon (Kipanyula i wsp., 2008). Również owce użytkowane w kierunku mięsnym należące do ras: red maasai i black head persian zamieszkujące tereny Tanzanii były homozygotami L141L (Kipanyula i wsp., 2008).

Polimorfizm w kodonie 141 wykryto tylko w rasie cigája. Częstość, z jaką wystąpił haplotyp F wyniosła 23,33% dla tej rasy, natomiast dla całej populacji zwierząt objętych badaniami własnymi 0,83%. Ponadto w kodonie 141 mutację warunkującą kodowanie fenyloalaniny wykazał zespół DeSilvy (DeSilva i wsp., 2003) u 23 osobników ze stanu Oklahoma. Naukowcy ci badaniu poddali 1144 osobniki pod kontem polimorfizmu białka prionowego w kodonach: 136, 137, 138, 141, 143, 154, 167, 171, 180, 195 oraz 196. Pozostałe zwierzęta posiadały wyłącznie genotyp determinujący leucynę (DeSilva i wsp., 2003).

W badaniach własnych częstość allela L wyniosła 99,17% dla całej populacji owiec. Podobną frekwencję haplotypu warunkującego kodowanie leucyny w kodonie 141 uzyskali naukowcy z autonomicznego regionu Xinjiang (Lan i wsp., 2006). Przebadali oni 222 osobniki należące do 8 lokalnych ras owiec. Frekwencja allela determinującego leucynę wynosiła 99,55%, natomiast fenyloalaninę 0,45%.

We Włoszech od 2004 do 2007 roku na 187 przypadków scrapie tylko u 10 osobników wyryto polimorfizm w kodonie L141F (Vaccari i wsp, 2007), natomiast w latach 2005 - 2009 zdiagnozowano 59 przypadków Nor98 u owiec (Mazza i wsp., 2010). Badania własne przeprowadzone na włoskiej rasie apennine oraz mieszańcach apennine x merynos derivertia nie wykazały występowania allela F w kodonie 141, którego obecność stwierdzono w rasie: sarada, bergamasca, appeninica i massese (Pongolini i wsp., 2009), oraz bergamesca (Mazza i wsp., 2010). Na terenie regionu Emilia-Romagna oraz Lombardy pod kątem mutacji warunkującej kodowanie fenyloalaniny w kodonie 141 przebadano 6240 owiec należących do ras: sarada, bergamasca, appeninica, massese i comisana (Pongolini i wsp., 2009). Tylko w przypadku ostatniej rasy nie stwierdzono mutacji C→T w pierwszej pozycji kodonu 141, a w rasie appeninica wykryto tylko 2 osobniki będące heterozygotami ALRQ/AFRQ i ALRR/AFRQ. Frekwencja allela $A_{136}F_{141}R_{154}Q_{171}$ w tej rasie wynosiła 0,34%, natomiast w rasie sarada 2,53%, bergamesca 5,01% i najwyższa massese 10,70%. Allel AFRQ wystąpił w układach heterozygotycznych: ALRQ/AFRQ, ALRR/AFRQ, ALHQ/AFRQ, ALRH/AFRQ, VLRQ/AFRQ, a także w układzie homozygotycznym AFRQ/AFRQ (Pongolini i wsp., 2009). Kolejnymi badaniami we Włoszech objęto zwierzęta należące do stada 264 owiec wolnych od trzęsawki noszących genotypy należące do klas podatnych na scrapie wg. DEFRA (2006) oraz pięciu ze zdiagnozowaną trzęsawką i jednego mieszańca. Tylko u dwóch osobników rasy bergamesca dotkniętych scrapie wykryto genotyp L141F. Zwierzęta te były homozygotami ARQ/ARQ. Obydwie owce były w wieku 4 lat i 6 miesięcy. Jedna z prób wykazała nietypowy związek między PrP^{Sc}, a jego dystrybucją i obecnością w mózgu, która wskazywała jednocześnie na obecność białek prionowych klasycznej postaci trzęsawki oraz Nor98. Przypadek ten może sugerować możliwość koegzystencji dwóch form scrapie w jednym organizmie (Mazza i wsp., 2010).

W badaniach własnych tylko w przypadku rasy cigája częstość, z jaką wystąpił allel L wynosiła 76,67%. Pozostałe rasy owiec oraz mieszańców poddanych genotypowaniu pod względem kodonu 141 miały 100% frekwencje genotypu L141L. Badania prowadzone przez Acina i wsp. (2004)

na owcach ras hiszpańskich wykazały polimorfizm genu białka prionowego w triplecie 141 odpowiedzialnym za kodowanie leucyny L (CTT) oraz fenyloalaniny F (TTT). Owce należące do ras: cartera, roya bilbilitana, ansotana, churra tensina i owce chore na scrapie były homozygotami L141L. Natomiast w rasach, w których wykryto polimorfizm w kodonie 141 rozkład frekwencji allela L wynosił odpowiednio dla każdej rasy: 98,4% - aragonesa, 93,6% - ojinegra, 85% - maellana, 98,3% - aragonesa (RAS - rasa dotknięta scrapie) oraz 87,5% - navarra (RNS - rasa dotknięta scrapie). Owce ras aragonesa i navarra pochodziły z czterech stad, w których zwierzęta były zainfekowane trzęsawką. Frekwencje allela F wynosiły odpowiednio dla każdej rasy: 1,6% - aragonesa, 6,4% - ojinegra, 15% - maellana, 1,2% - aragonesa (RAS) oraz 12,5% - navarra (RNS). Mutacja warunkująca kodowanie aminokwasu fenyloalaniny w kodonie 141 wystąpiła w układzie $A_{136}F_{141}R_{154}Q_{171}$ (Acin i wsp., 2004). Zespół pod kierownictwem Acina przeprowadził kolejne badania na 485 owcach i kozach zamieszkujących tereny Hiszpanii chorych na scrapie pochodzących z 61 ognisk występowania choroby. Polimorfizm L141F wyryto zarówno u osobników z klasyczną formą trzęsawki, jak i formą Nor98 (Acin i wsp., 2013).

W związku z tradycją spożywania baraniny w Turcji problem scrapie w klasycznej postaci, jak i formie atypowej jest ważnym aspektem badawczym. Naukowo stwierdzono powiązanie polimorfizmu w kodonach 136, 151 i 171 z podatnością/opornością na obie formy trzęsawki (Meydan i wsp., 2013). W Turcji badaniu pod tym kątem poddano 1110 owiec należących do 18 rodzimych ras owiec: awassi, akkaraman, kangal akkaraman, morkaraman, güneykaraman, kıvırcık, norduz, karakas¸, chios, herik, hems¸in, da˘glıc, karayaka, tushin, c¸ine c¸aparı, gökc¸eada, karakul i zom. Mutację warunkującą zamianę leucyny na fenyloalaninę w triplecie 141 wykryto jedynie w rasie awassi. Allel $A_{136}F_{141}R_{154}Q_{171}$ wystąpił z częstością 0,005% w układzie heterozygotycznym AFRQ/ALRQ z frekwencją 0,010% dla tej rasy. W wyniku badań wykryto 9 alleli, w których w kodonie 141 wystąpiła leucyna w układach: ALRR, ALRQ, ALRH, ALHQ, VLRQ, TLRR, TLRQ, TLRH oraz ALRK. Wyżej wymienione allele wykryto w układzie 23 genotypów. Homozygota ALRQ/ALRQ wystąpiła we wszystkich badanych

rodzimych rasach owiec z Turcji. W przypadku czterech ras: gökc¸eada, karakul i zom genotyp ALRR/ALRQ występował najczęściej. Homozygoty ALHQ/ALHQ najbardziej podatne na atypową postać trzęsawki wystąpiły jedynie w rasie kıvırcık z częstością 0,014% (Meydan i wsp., 2013).

W odróżnieniu od badań własnych, w których analizy przeprowadzono na owcach pochodzących ze stad wolnych od trzęsawki, w Wielkiej Brytanii przeprowadzono badania w celu określenia genotypów owiec pochodzących z 30 stad, w których stwierdzono przypadki naturalnego wystąpienia scrapie. Badaniu poddano 8600 zróżnicowanych rasowo zwierząt i ponad 400 przypadków wystąpienia scrapie (McIntyre i wsp., 2008). Genotypowanie również wykonał zespół Goldmann i wsp. (2005) dla 6287 owiec należących do populacji wolnych od scrapie składających się z 21 stad oraz tych, w których wykryto osobniki dotknięte trzęsawką (20 stad), a także naukowcy pod kierownictwem McIntyre na owcach chorych na scrapie z 5 stad należących do ras: brecknock hill chevoit, poll dorset, shetland, swaledale i welsh mountains (McIntyre i wsp., 2008). Najwięcej przypadków trzęsawki odnotowano w rasie welsh mountain (n=131) (McIntyre i wsp., 2008). Mutacje warunkującą podstawianie aminokwasu fenyloalaniny (F) w kodonie 141 wykryto w układzie $A_{136}F_{141}R_{154}Q_{171}$ u owiec rasy shetland z 8 stad, dorsed i cheviot z 7 stad, welsh moutain z 4 stad, friesland z 3 stad oraz z 2 stad z ras: charlolais, roussin i mieszańców texel/lleyn (Goldmann i wsp., 2005). Wykryto tylko jedną homozygotę F141F w należącą do rasy szetland w badaniach wykonanych przez zespół McIntyre i wsp. (2008). W czterech rasach: brecknock hill chevoit, poll dorset, szetland i welch mountain wykryto heterozygoty L141F. Stado należące do rasy shetland w którym wykryto wszystkie genotypy, było również najbardziej zróżnicowane pod kątem standardowo poddawanych genotypowaniu kodonów (McIntyre i wsp., 2008). Zespół pod kierownictwem Goldmanna przeprowadził badania na dotkniętych trzęsawką owcach rasy cheviot. Badane zwierzęta były zarówno homozygotami F141F, jak i L141L oraz heterozygotami L141F. Zostały one dożylnie zakażone czynnikiem patogennym. Do badania włączono również osobniki rasy cheviot, suffolk i pooll dorsed zaszczepione domózgowo. Na podstawie czasu inkubacji oraz drogi przedostania się PrP^{Sc}

nie wykazano powiązania polimorfizmu w kodonie L141F z opornością/podatnością owiec na Nor98 (Goldmann i wsp., 2006).

Do Wielkiej Brytanii zaimportowano w latach 1998-2001 z Nowej Zelandii (kraju wolnego od scrapie) i umieszczono w specjalnie przygotowanym „Sheep Unit" 2003 owce należące do ras: poll dorset, cheviot i suffolk. Importowane osobniki nie miały allela ARH, co przy hodowli skutkowało możliwością uzyskania owiec o 10 genotypach z 15 możliwych pod względem kodonów: 136, 154 i 171 (Simmons i wsp., 2009). Wśród owiec wykryto 3 przypadki atypowej postaci trzęsawki wśród osobników rasy chevoit. Zwierzęta przebywały na fermie w populacji wolnej od klasycznej postaci scrapie ponad 6 lat. Dwa osobniki były homozygotami AFRQ/AFRQ, natomiast jeden heterozygotą o genotypie AFRQ/ALRQ. Tylko jedna owca miała objawy charakterystyczne dla formy Nor98. Zwierzęta padły w wieku odpowiednio: 6 lat i 4 miesięcy, 7 lat i 9 miesięcy oraz 9 lat i 7 miesięcy. Pozytywny wynik immunohistochemiczny otrzymano w trzech przypadkach odpowiednio: w korze mózgowej, móżdżku i mózgu. Nie wykluczono możliwości nabycia patogennej formy białka prionowego ze środowiska zewnętrznego, od zarażonych zwierząt, w wyniku eksperymentu bądź samoistnie (Simmons i wsp., 2009).

W odróżnieniu od badań własnych, w których genotypowaniu poddano populację owiec wolną od scrapie pochodzącą z trzech państw europejskich: Polski, Słowacji i Włoch, we Francji przeprowadzono doświadczenia na zwierzętach ze stada dotkniętego trzęsawką oraz wolnego od tej jednostki chorobowej stanowiącego grupę kontrolną (Moreno i wsp., 2007), a także stada owiec dotkniętego klasyczną (n=245) i atypową (n=248) postacią scrapie (Fediaevsky i wsp., 2010). Badania polegały na porównaniu grup pod kątem polimorfizmu w kodonach: 136, 141, 154 i 171 genu *PRNP*. Zespół naukowców pod kierownictwem Moreno poddał genotypowaniu owce należące do 18 ras najbardziej popularnych na terenie Francji. Wykryto następujące allele: ALRQ, VLRQ, ALRH, ALRR, AFRQ i ALHQ. Allel AFRQ warunkował najwyższą podatność owiec na atypową postać scrapie, na drugim miejscu pojawił się haplotyp ALHQ (Moreno i wsp., 2007). Podobne wyniki uzyskał zespół Fediaevskyego, który powiązał trzy genotypy

z wysokim ryzykiem wystąpienia Nor98: ALHQ/ALHQ, AFRQ/ALHQ i AFRQ/AFRQ (Fediaevsky i wsp., 2010). Allelomorf ALRQ natomiast miał od 8 do 14 razy większy wpływ na oporność na Nor98 (Moreno i wsp., 2007). W przypadku alleli ALRR i VLRQ nie wykazano znaczącej różnicy między osobnikami dotkniętymi atypową postacią scrapie, a grupą od niej wolną (Moreno i wsp., 2007). Owce należące do populacji dotkniętych atypową trzęsawką posiadały genotypy: ALRR/ALRR, ALRR/ALHQ, ALRR/AFRQ, ALRR/ALRQ, ALRR/ALRH, ALHQ/ALRQ, ALHQ/ALRH, ALHQ/VLRQ, AFRQ/ALRQ, ALRQ/ALRQ, AFRQ/ALRH, ALRH/ALRH, AFRQ/VLRQ, ALRQ/VLRQ ALHQ/ALHQ, AFRQ/ALHQ i AFRQ/AFRQ. Natomiast populacja dotknięta klasyczną formą scrapie charakteryzowała się odmiennym profilem genetycznym: ALHQ/ALHQ AFRQ/AFRQ, ALRH/ALRH, ALRR/ALRQ, ALRR/VLRQ, ALHQ/ALRQ, ALHQ/VLRQ, AFRQ/ALRQ, ALRQ/ALRH, AFRQ/ALRH, AFRQ/VLRQ, ALRQ/VLRQ, ALRH/VLRQ. Wykazano, że homozygota VLRQ/VLRQ jest powiązana z wyższym ryzykiem wystąpienia trzęsawki niż owca o genotypie ALRQ/ALRQ (Fediaevsky i wsp., 2010).

Ze względu na wykorzystanie w badaniach własnych owiec (n=424) ze stad wolnych od trzęsawki możliwe było jedynie porównanie frekwencji alleli i genotypów, w przeciwieństwie do badań przeprowadzonych w Norwegii, gdzie wykazano związek allelomorfa $A_{136}F_{141}R_{151}Q_{171}$ z podatnością na atypową postać scrapie (Moum i wsp., 2005) oraz w Kanadzie, gdzie powiązano allele $A_{136}H_{154}Q_{171}$ i $A_{136}R_{154}R_{171}$ z podatnością na tą formę scrapie (Mitchell i wsp., 2010). Zespół Moum i wsp. (2005) zasugerował, że Nor98 może być sporadycznie występującą chorobą, nieprzenoszącą się poprzez kontakt z osobnikami zainfekowanymi w stadzie. Badania przeprowadzono na owcach dotkniętych atypową formą scrapie (n=38) oraz osobnikach należących do stad, w których zdiagnozowano Nor98 (n=2396) i grupę kontrolną (n=200) wybranych losowo do badania zwierząt. Mutację warunkującą kodowanie fenyloalaniny (F) wykryto we wszystkich trzech stadach w układzie $A_{136}F_{141}R_{151}Q_{171}$. Frekwencja tego allelomorfa była najwyższa w populacji zwierząt chorych na trzęsawkę i wynosiła 32,9%. Mutacja w kodonie 141 warunkująca kodowanie F wystąpiła w układach: AFRQ/AFRQ oraz AFRQ/ALHQ. Nie stwierdzono tych genotypów w grupie

kontrolnej. Heterozygoty AFRQ/ALRQ i AFRQ/ALRR wykryto w trzech stadach. Genotyp AFRQ/VLRQ stwierdzono u owiec należących do stad, w których zdiagnozowano Nor98 oraz w stadzie owiec wybranych do kontrolnego badania. Heterozygotę AFRQ/ALRH stwierdzono tylko w przypadku osobników należących do stada, w którym zdiagnozowano atypową formę trzęsawki (Moum i wsp., 2005). Zespół Mitchelliego i wsp. (2010) badaniu poddał 3 chore owce pochodzące z trzech dużych stad. Pierwszy przypadek odnotowano u osobnika w 6 roku życia. Był mieszańcem rasy dorset x suffolk o genotypie ALRQ/ALRR. Drugi przypadek stwierdzono u owcy w wieku 5 lat i 8 miesięcy rasy rambouillet pochodzącej ze stada zamkniętego, do którego w ostatnich kilku latach wprowadzono wyłącznie tryki. Była to heterozygota AFRQ/ALRR bez klinicznych objawów scrapie. Dane dotyczące ostatniego przypadku Nor98 są niepełne. Osobnik o genotypie AFRQ/ALRQ nie przejawiał klinicznych objawów choroby. Owce zostały poddane testom ELISA, Western Blot i immunohistochemicznemu. Wyniki były pozytywne (Mitchell i wsp., 2010).

Polimorfizm w kodonie 141 powiązano z wrażliwością owiec na Nor98. Zarówno allel L, jak i F wykryty został w badaniach własnych w populacji owiec wolnych od trzęsawki oraz w stadach, w których zdiagnozowano osobniki chore (Acin i wsp., 2004; Goldmann i wsp., 2006; Moreno i wsp., 2007; Simmons i wsp., 2009; Fediaevsky i wsp., 2010; Mazza i wsp., 2010; Mitchell i wsp., 2010).

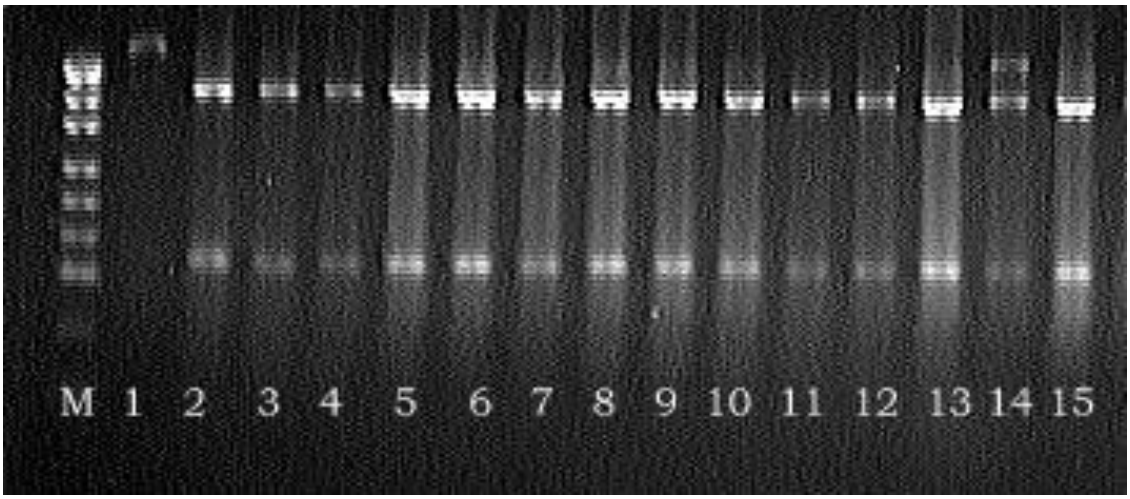
6.3. Polimorfizm w kodonie 151

Poddanie trawieniu restryktazą *Ava*II amplikonu o długości 545pz pozwoliło na odróżnienie SNP w kodonie 127 i 151. Na rycinie 3 przedstawiono schemat odczytu wyników trawienia dla kodonu 127 enzymem restrykcyjnym *Hae*III, oraz dla tripletów 127 i 151 restryktazą *Ava*II. Natomiast rozdział elektroforetyczny fragmentów DNA po trawieniu amplikonu restryktazą *Ava*II przedstawiono na rycinie 4.

Rycina 3. Schemat długości fragmentów DNA po trawieniu amplikonu zawierającego kodon 127 restrykazą *Hae*III oraz kodon 127 i 151 restryktazą *Ava*II.

W przypadku wystąpienia genotypów:

- $S_{127}C_{151}/S_{127}C_{151}$, $S_{127}C_{151}/G_{127}C_{151}$ lub $G_{127}C_{151}/G_{127}C_{151}$ otrzymano produkt o długości 545pz
- $V_{127}C_{151}/V_{127}C_{151}$ otrzymano produkty o długości 493pz i 52pz
- $S_{127}C_{151}/V_{127}C_{151}$ i $G_{127}C_{151}/V_{127}C_{151}$ otrzymano produkty o długości 545pz, 493pz i 52pz
- $S_{127}R_{151}/S_{127}R_{151}$, $S_{127}R_{151}/G_{127}R_{151}$ lub $G_{127}R_{151}/G_{127}R_{151}$ otrzymano produkty o długości 424pz i 121pz
- $V_{127}R_{151}/V_{127}R_{151}$ otrzymano produkty o długości 424pz, 69pz i 52pz
- $S_{127}R_{151}/V_{127}R_{151}$ i $G_{127}R_{151}/V_{127}R_{151}$ otrzymano produkty o długości 424pz, 121pz, 69pz i 52pz



Rycina 4. Rozdział fragmentów DNA w 3% żelu agarozowym po trawieniu amplifikowanego fragmentu genu *PRNP* zawierającego kodon 151 restryktazą *Ava*II. M - marker długości fragmentów DNA pUC19 DNA/*Msp*I (*Hpa*II) Marker, 23, ready-to-use (Fermentas), linia 1 - genotyp C151C z widocznym prążkiem 545pz, linie 2-13 i 15 - genotyp R151R z widocznymi prążkami o długości 424pz i 121pz, linia 14 - genotyp C151R z widocznymi prążkami o długości 545pz, 424pz i 121pz.

W badaniach własnych wykryto mutację warunkującą zamianę aminokwasu argininy (R) na cysteinę (C) C→T w pierwszej pozycji w kodonie 151. W całej badanej populacji owiec wykryto allelomorf C stanowiący 8,73%, oraz R stanowiący 91,27%.

W objętych badaniami owcach z Polski wykryto zarówno allelomorf C, jak i R. Frekwencja allela R była wyższa od C i wynosiła odpowiednio 88,61% i 11,39%. Rozkład frekwencji alleli w rasie ile de france wynosił dla: R 76%, a dla C 24%. Zdecydowanie mniejszy udział allela C wykazano w rasie wrzosówka, w której stanowił zaledwie 10%, w stosunku do 90% udziału allela R. Jedynie w rasie kamieniecka nie wykryto allelomorfa C. Rasa ta pod kątem polimorfizmu w kodonie 151 była jedyną monomorficzną rasą poddaną genotypowaniu w polskim stadzie owiec.

W populacji owiec ze Słowacji zarówno frekwencja allelomorfa R przewyższała frekwencję allela C. Allelomorf R stanowił 95,73% poddanych badaniu osobników, a allel C 4,27%. Ze względu na wysoki procentowy udział genotypu R151R w populacji Słowackiej owiec frekwencja allelomorfa R wyniosła dla rasy cigája 96,67%, lacaune 95,95%, mieszańców cigája x

lacaune 97,06% oraz 92,31% dla mieszańców lacaune x zošľachtená valaška. Najwyższą częstość, z jaką wystąpił allel C stwierdzono u mieszańców lacaune x zošľachtená valaška na poziomie 7,69%. W rasie cigája frekwencja allela C wyniosła 3,33%, lacaune 4,05%, a dla mieszańców cigája x lacaune 2,94%.

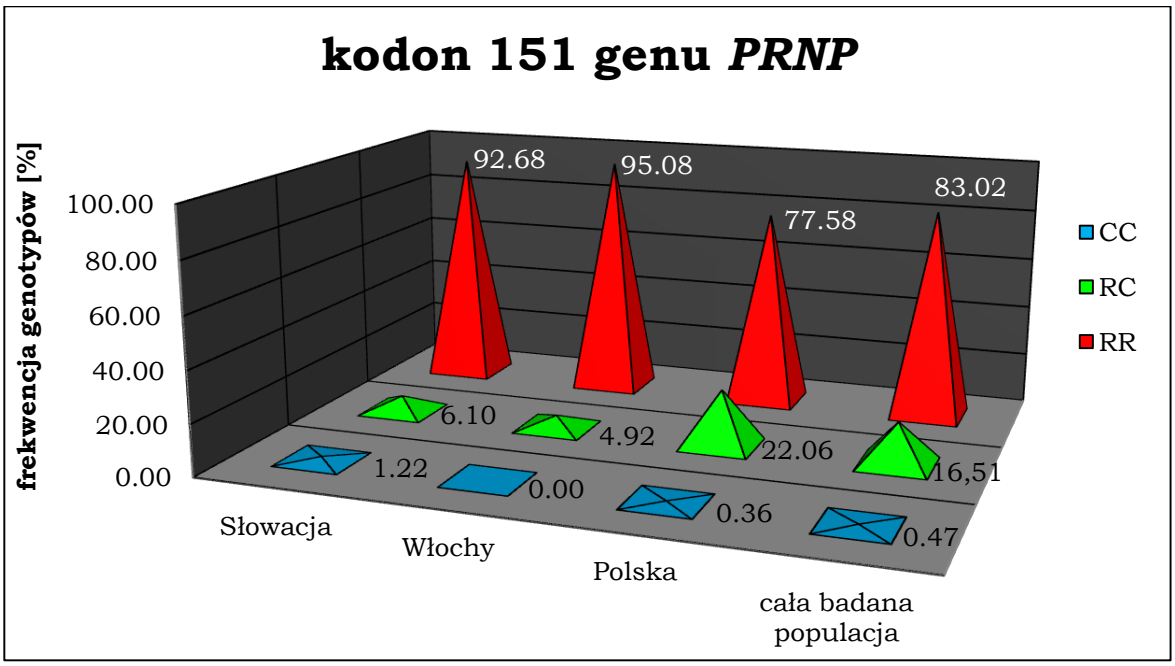
Zarówno w całej populacji owiec z Włoch, jak i badanej rasie apennine i grupie mieszańców apennine x merynos derivertia frekwencja allela R była wyższa niż frekwencja allela C. Częstość, z jaką wystąpił allel warunkujący kodowanie argininy w pozycji 151 kształtował się na poziomie: 97,54% dla całego włoskiego stada owiec, 95,45% dla rasy apennine oraz 98% dla mieszańców apennine x merynos derivertia. Frekwencja allelomorfa C wynosiła odpowiednio: 2,46% wszystkich owiec pochodzących z Włoch, 4,55% dla rasy apennine oraz 2% dla mieszańców apennine x merynos derivertia.

Zestawienie frekwencji alleli dla poszczególnych ras i mieszkańców oraz grup badawczych zwierząt, jak i dla całej populacji owiec poddanych badaniu zestawiono w tabeli 2.

Tabela 2. Frekwencje alleli genu *PRNP* ze względu na polimorfizm w kodonie 151.

Genotypy	**R**		**C**	
	n	**%**	**n**	**%**
kamieniecka	202	100,00	0	0,00
ile de france	152	76,00	48	24,00
wrzosówka	144	90,00	16	10,00
cigája	29	96,67	1	3,33
lacaune	71	95,95	3	4,05
cigája x lacaune	33	97,06	1	2,94
zošľachtená valaška x lacaune	24	92,31	2	7,69
appenenine	21	95,45	1	4,55
apennine x merynos derivertia	98	98,00	2	2,00
populacja polska	498	88,61	64	11,39
populacja słowacka	157	95,73	7	4,27
populacja włoska	119	97,54	3	2,46
cała badana populacja	774	91,27	74	8,73

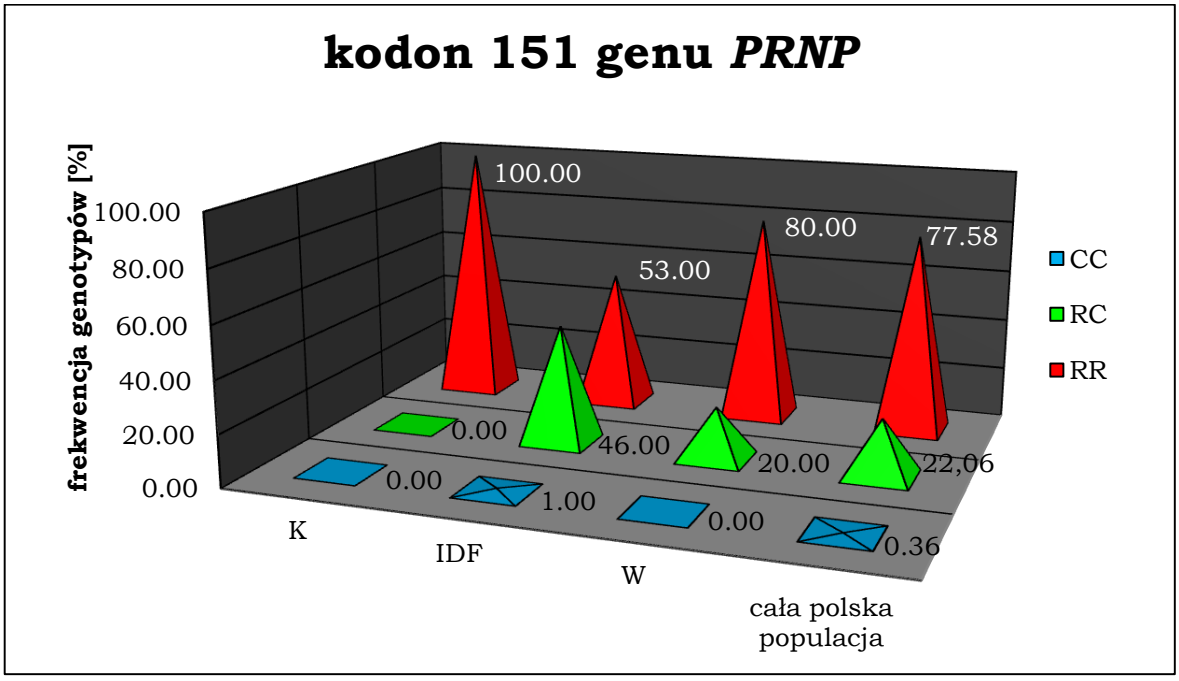
W całej badanej populacji owiec, jak i w poszczególnych grupach badawczych z Polski, Słowacji i Włoch Wykazano osobniki zarówno o genotypie R151R, R151C jak i C151C. Przeważały homozygoty R151R (n=352), których frekwencja wynosiła 83,02% w całej objętej badaniami grupie owiec. 70 osobników było heterozygotami R151C, co stanowiło 16,51%. Wykryto tylko 2 owce o genotypie C151C, którego frekwencja w poddanej badaniu populacji zwierząt wynosiła 0,47%. Procentowy udział genotypów przedstawiono graficznie na wykresie 2.



Wykres 2. Frekwencje genotypów genu *PRNP* w kodonie 151 dla stad ze Słowacji, Włoch i Polski oraz całej badanej populacji owiec.

W badanej grupie owiec z Polski wykazano występowanie homozygot R151R i C151C oraz heterozygot R151C. Owce o genotypie R151R stanowiły większość osobników w tym stadzie. Frekwencja wynosiła 77,58% (n=218). Tylko 1 osobnik był homozygotyczny C151C, co stanowiło 0,36% grupy badawczej. 62 osobniki były heterozygotami R151C, co stanowiło 22,06% stada owiec z Polski. Najbardziej zróżnicowana okazała się rasa ile de france, w której wykryto trzy możliwe genotypy. 53 osobniki o genotypie R151R stanowiące 53% owiec tej rasy, 46 homozygot, których udział wynosił 46% oraz jedną owcę C151C. W rasie wrzosówka genotyp R151R stanowił 80%

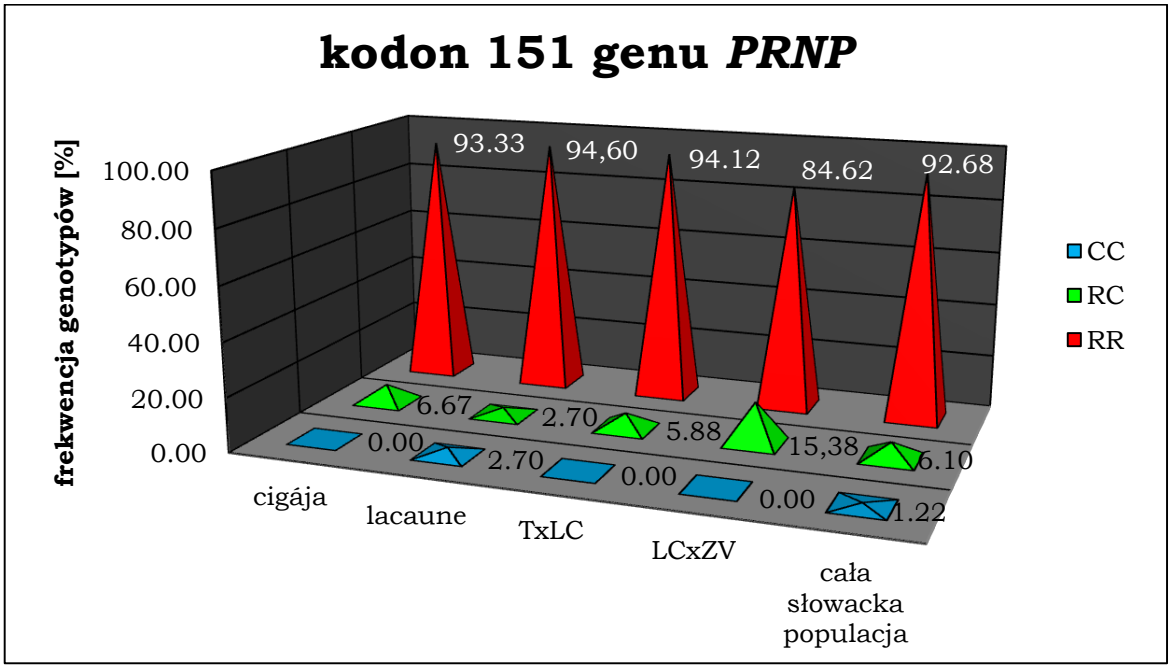
(n=64) osobników, a genotyp R151C 20% (n=16). W rasie wrzosówka, jak i kamieniecka nie wykryto homozygot C151C. Ponadto rasa kamieniecka okazała się najbardziej monomorficzną pod względem polimorfizmu w kodonie 151 – wszystkie osobniki tej rasy posiadały genotyp R151R. Wykres 3 przedstawia częstość występowania genotypów dla wyżej wymienionych ras utrzymywanych w Polce oraz całej populacji owiec z Polski.



Wykres 3. Frekwencje genotypów genu *PRNP* w kodonie 151 w polskich stadach owiec. Objaśnienia: K - kmieniecka, IDF - ile de france, W - wrzosówka

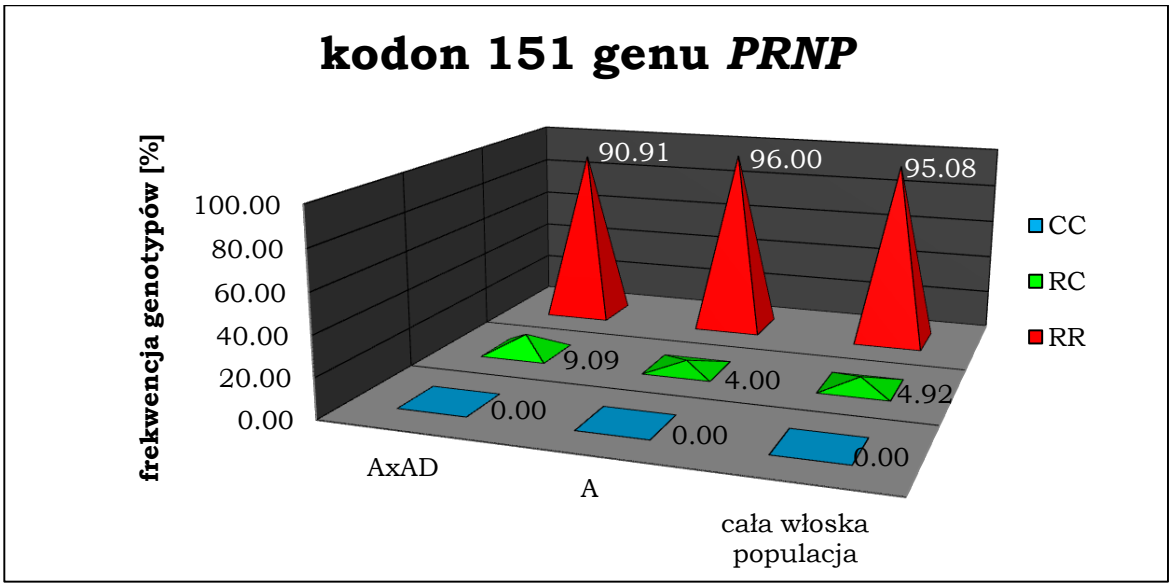
Procentowy udział homozygot dla całej badanej populacji owiec ze Słowacji kształtował się na poziomie 92,68% dla R151R i 1,22% dla C151C, natomiast heterozygot R151C 6,10%. Wszystkie trzy genotypy wykryto tylko u rasy lacaune. Nie mniej jednak dla rasy lacaune udział homozygot R151R kształtował się na bardzo wysokim poziomie 94,60%. Pozostałe dwa genotypy wykryto w przypadku dwóch owiec rasy lacaune, co stanowiło po 2,7% dla każdego z nich. Homozygot C151C nie wykryto w rasie cigája oraz u mieszańców cigája x lacaune i lacaune x zošľachtená valaška. Częstość genotypu R151R dla rasy cigája wynosiła 93,33%, dla mieszańców cigája x lacaune 94,12% i 84,62% dla mieszańców lacaune x

zośłachtená valaška. Wykazano obecność 2 heterozygot w grupie mieszańców lacaune x zośłachtená valaška oraz po jednym cigája x lacaune i cigája. Wykres 4 przedstawia graficznie udział poszczególnych genotypów w grupie owiec utrzymywanych na Słowacji.



Wykres 4. Frekwencja genotypów genu *PRNP* w kodonie 151 w słowackich stadach owiec. Objaśnienia CxLC – mieszance cigája x lacaune, LCxZV – mieszańce zośłachtená valaška x lacaune

Najwyższą frekwencją genotypu R151R charakteryzowały się owce z regionu Molise we Włoszech. Wynosiła ona 95,08%. Wykryto 58 osobników noszących ten genotyp: 48 owiec rasy apennine oraz 10 mieszańców apennine x merynos derivertia, co stanowiło 96% w badanej rasie apennine i 90,91% mieszańców apennine x merynos derivertia. Stosunkowo niski w porównaniu do populacji owiec z Polski i Słowacji okazał się udział heterozygot R151C w stadzie owiec z Włoch, którego frekwencja wyniosła 4,92%. Wykryto 2 osobniki R151C w rasie apennine oraz 1 w mieszańca apennine x merynos derivertia, dając kolejno frekwencję 4% dla rasy i 9,09% dla mieszańców. Nie wykryto homozygot o genotypie C151C. Wykres 5 przedstawia częstość genotypów w kodonie 151 we włoskich stadach owiec.



Wykres 5. Frekwencje genotypów genu *PRNP* w kodonie 151 we włoskiej populacji owiec. Objaśnienia: AxAD - mieszańce apennine x merynos derivertia, A - apennine

W badaniach własnych wykryto mutację powodująca zmianę pierwszego nukleotydu w kodonie 151 C→T warunkującą zamianę aminokwasu argininy na cysteinę we wszystkich trzech stadach pochodzących z Polski, Słowacji i Włoch. Allel C wystąpił zarówno w układzie heterozygotycznym R151C jak i homozygotycznym C151C. Zwierzęta pochodziły ze stad wolnych od trzęsawki. Polimorfizm w kodonie 151 wykazano również w stadach owiec pochodzących z Norwegii (Tranulis i wsp., 1999), Islandii (Thorgeirsdottir i wsp.1999) oraz Wielkiej Brytanii (Goldmann i wsp., 2005). Na Słowacji natomiast zespół Matúšková i wsp. (2003) badaniu poddał dwie owce należące do rasy merynos. Były one homozygotami R151R w kodonie 151. Ze względu na zdiagnozowanie trzęsawki u jednej z owiec badanych, naukowcy wykonali również genotypowanie pod kątem polimorfizmu w genie *PRNP* w kodonach: 112, 127, 136, 137, 138, 141, 151, 154, 171, 176 (Matúšková i wsp., 2003). Na podstawie badań przeprowadzonych na owcach pochodzących z Islandii zasugerowano, że mutacja warunkująca podstawianie cysteiny w kodonie 151 genu *PRNP* może mieć powiązanie z wrażliwością owiec na scrapie (Thorgeirsdottir i wsp.1999). Allel $A_{136}C_{151}R_{154}Q_{171}$ wykryto jedynie u owiec zdrowych należących do stad, w których wykryto przypadki trzęsawki. Żadna z owiec chorych nie miała

mutacji warunkującej kodowanie cysteiny w triplecie 151 (Thorgeirsdottir i wsp.1999). Natomiast w populacji owiec rasy dorset utrzymywanej w Wielkiej Brytanii poddanej badaniu pod kątem polimorfizmu *PRNP* allel C został wykryty zarówno w stadzie owiec wolnych od trzęsawki, jaki i w grupie, w której były owce chore na scrapie. Allelomorf ten wystąpił w układzie $A_{136}C_{151}R_{154}Q_{171}$ (Goldmann i wsp., 2005). Podobne wyniki uzyskał zespół pod kierownictwem Tranulisa, który badania przeprowadził na owcach z Norwegi obejmujących dwie grupy: stado owiec chorych na scrapie (n=32) oraz stado owiec zdrowych (n=240) (Tranulis i wsp., 1999). Do pierwszej grupy należały owce: rygja, steigar oraz po jednym osobniku należącym do krzyżówek: dala, spel i pels. Druga grupa obejmowała krzyżówki: dala, steigar i rygja oraz spel. Celem badań było wykrycie polimorfizmów w kodonach: 136, 138, 141, 151, 154 oraz 171. Mutację powodująca zmianę pierwszego nukleotydu w kodonie 151 C→T wykryto u 6 osobników rasy dala, 1 owcy rasy steigar oraz 3 owiec rasy rygja. Wymienione osobniki były heterozygotami R151C (Tranulis i wsp., 1999).

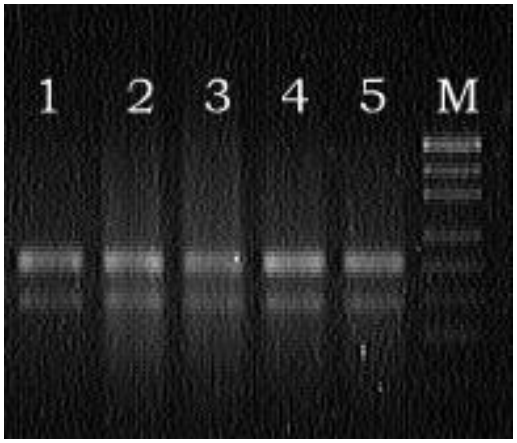
W badaniach własnych wykryto mutację warunkującą kodowanie cysteiny we wszystkich trzech grupach owiec pochodzących z Polski, Włoch i Słowacji. Zwierzęta pochodziły ze stad wolnych od trzęsawki. Allel C wystąpił zarówno w układzie heterozygotycznym R151C, jak i heterozygotycznym C151C. W dróżnieniu od badań własnych, w których przy zastosowaniu metody PCR-RFLP z użyciem enzymu *Ava*II możliwa była detekcja mutacji warunkującej włączenie w miejscu argininy R (CGT), aminokwasu cysteiny C (TGT) w kodonie 151, w Hiszpanii zespół Acina (Acin i wsp., 2004) wykonał badania, w których możliwa była również detekcja glicyny G (GGT) oraz histydyny H (CAT) na hiszpańskich. 100% frekwencja homozygot R151R dotyczyła ras: aragonesa, cartera, maellana, roya bilbilitana, ansotana, churra tensina. Frekwencja allela R wynosiła 98% w rasie ojinegra (n=100) oraz 98,4% w rasie navarra. Allel G wykazano w rasie navarra i stanowił on 1,6% badanej rasy, natomiast allel H stanowił 2% dla rasy ojinegra. Mutacja w kodonie 151 warunkująca kodowanie aminokwasu glicyny wystąpiła w układzie $A_{136}G_{151}R_{154}Q_{171}$, a SNP

powodujące kodowanie histydyny w układzie $A_{136}H_{151}R_{154}Q_{171}$ (Acin i wsp., 2004).

W związku z wykryciem allela R i C w badaniach własnych, jak i w stadach owiec z Norwegii (Tranulis i wsp., 1999), Islandii (Thorgeirsdottir i wsp.1999) i Wielkiej Brytanii (Goldmann i wsp., 2005), a także allela G i H w hiszpańskich rasach owiec (Acin i wsp., 2004) oraz wysunięcie przez zespół Thorgeirsdottir sugestii, iż polimorfizm w kodonie 151 może być powiązany z wrażliwością owiec na scrapie (Thorgeirsdottir i wsp.1999) ważne wydaję się kontynuowanie badań pod tym kontem.

6.4. Polimorfizm w kodonie 171

Rycina 5 przedstawia rozdział elektroforetyczny fragmentów DNA po trawieniu amplikonu enzymem *Mbo*I. Produkt PCR o długości 545pz w przypadku wystąpienia mutacji warunkującej kodowanie lizyny w kodonie 171 owczego genu *PRNP* został strawiony do fragmentów o długości 379pz i 166pz. Natomiast w przypadku wystąpienia innych alleli otrzymano dwa fragmenty o długości 182pz, 197pz oraz fragment o długości 166pz.



Rycina 5. Rozdział fragmentów DNA w 3% żelu agarozowym po trawieniu amplifikowanego fragmentu genu *PRNP* zawierającego kodon 171 restryktazą *Mbo*I. M - marker długości fragmentów DNA pUC19 DNA/*Msp*I (*Hpa*II) Marker, 23, ready-to-use (Fermentas), linie 1-5 - genotyp X/X z widocznymi prążkami o długości 196pz, 182pz i 166pz. Objaśnienie: X – allel niekodujący w pozycji 171 genu *PRNP* lizyny

Badania własne przeprowadzone na 424 owcach należących do ras: kamieniecka, wrzosówka, ile de france, cigája, lacaune i apennine oraz mieszańce: zošľachtená valaška x lacaune, lacaune x cigája i apennine x merynos derivertia nie wykazały występowania allela K, warunkującego kodowanie lizyny przez kodon 171 w triplecie AAG genu białka prionowego owiec. Osobniki poddane badaniu były nosicielami allela Q, H lub R, których identyfikacja przy użyciu restryktazy *Mbo*I jest niemożliwa. Symbol X wskazuje na wystąpienie allela niewłączającego w łańcuch polipeptydowy aminokwasu lizyny przez triplet 171.

W przeciwieństwie do badań własnych, w których nie stwierdzono obecności allela K, zespół Markowskiej (Markowska i wsp., 2010), Lühken (Lühken i wsp., 2008) oraz Gombojava (Gombojav i wsp., 2003 wykrył po jednym osobniku heterozygotycznym X/K. Pod kątem polimorfizmu w genie *PRNP* warunkującego kodowanie lizyny sprawdzono owce z terenów Polski (Markowska i wsp., 2010), krajów europejskich i środkowego wschodu (Lühken i wsp., 2008) i Mongolii (Gombojav i wsp., 2003). Wysunąć można stwierdzenie, iż mutacja C→A w pierwszej pozycji kodonu 171 występuje rzadko. Zespół naukowców z Mongolii nie przedstawił dowodów na wpływ mutacji C→A w kodonie 171 na podatność/oporność owiec na scrapie (Gombojav i wsp., 2003). Zarówno owce w badaniach własnych, jak i zespołu Markowskiej (2010), Lühken (2008) i Gombojava (2003) należały do zróżnicowanych rasowo. Populacja 241 owiec z Polski należała do ras: merynos polski, czarnogłówka, polska owca górska, ile de france, berrichon du cher i suffolk. Występowanie allela K wykryto u jednego osobnika rasy czarnogłówka. Jego frekwencja w tej rasie wyniosła 0,69%, natomiast w całej badanej populacji 0,2%. Heterozygota X171K wystąpiła z częstością 0,4% dla rasy i 1,33% dla całej populacji owiec poddanych badaniu (Markowska i wsp., 2010). Próby krwi pobrane od 1672 owiec należały do 56 ras z piętnastu krajów europejskich i środkowego wschodu (Lühken i wsp., 2008). Poddano je genotypowaniu pod kątem kodonów 136, 154 i 171. Wykryto mutację powodującą kodowanie lizyny w triplecie 171 tylko u jednego osobnika rasy bergamasca. Frekwencja haplotypu ARK wynosiła 1,61% dla badanej populacji owiec, natomiast genotypu ARQ/ARK 3.23%

(Lühken i wsp., 2008). Lizynę w pozycji 171 genu *PRNP* wykryto również u jednego osobnika rasy khalki (Gombojav i wsp., 2003). Rasa ta w 2003 roku stanowiła ponad 90% populacji owiec w Mongolii. Badaniom zostały poddane również mieszańce: yeroo, orkhou i khangai, które nie posiadały mutacji warunkującej kodowanie lizyny. Osobnik rasy khalki posiadał genotyp $M_{112}A_{136}R_{154}K_{171}/M_{112}A_{136}R_{154}K_{171}$ (Gombojav i wsp., 2003).

W badaniach własnych, w których pod kątem mutacji warunkującej kodowanie lizyny w kodonie 171 sprawdzono również owce z Włoch należące do rasy appeninica i mieszańców apennine x merynos derivertia nie wykryto allela K. Inne badania przeprowadzone na włoskich rasach owiec w celu wykrycia mutacji odpowiedzialnej za występowanie lizyny przez zespół Pongoliniego (Pongolini i wsp., 2009) i zespół Acutisa (Acutis i wsp., 2004; 2006) wykazały występowanie allela K. Poddane badaniu 6240 owiec z regionu Emilia-Romagna oraz Lombardy należały do 5 różnych ras: sarada, bergamasca, appeninica, comisana i massese (Pongolini i wsp., 2009). Obecność haplotypu K wykrył zespół Pongoliniego w układzie ARK w rasie appeninica i rasie bergamesca (Pongolini i wsp., 2009). Frekwencja allela ARK dla rasy appeninica wyniosła 0,34%. Allel ten wystąpił w układach heterozygotycznych ARQ/ARK i ARR/ARK. Natomiast dla rasy bergamesca częstość, z jaką wystąpił allel ARK wyniosła 3,67%. W rasie tej występowały zarówno heterozygoty jak i homozygoty. Frekwencja genotypów dla rasy bergamesca rozkładała się następująco: ARQ/ARK - 5,66%, ARR/ARK - 0,59%, AHQ/ARK - 0,11%, ARH/ARK - 0,04%, VRQ/ARK - 0,19%, ARK/ARQ - 0,29% oraz ARK/ARK - 0,22% (Pongolini i wsp., 2009). Najwyższą jak dotąd frekwencję allela ARK zanotowano we Włoszech w populacji liczącej 1207, do której należały owce rasy biellese i jej mieszańce. W populacji tej były 34 osobniki dotknięte trzęsawką, które również zostały poddane genotypowaniu (Acutis i wsp., 2004). Allel ARK wystąpił w układzie homozygotycznym u 2 owiec, z częstością 0,2% oraz heterozygotycznym: AHQ/ARK z częstością 0,3%, ARH/ARK z częstością 0,3%, ARQ/ARK z częstością 3,8%, ARR/ARK z częstością 0,1% oraz ARK/VRQ z częstością 0,2% dla całej badanej populacji owiec. Mutacji warunkującej kodowanie lizyny w triplecie 171 nie wykryto u osobników chorych na scrapie (Acutis i wsp., 2004). Zespół pod

kierownictwem Acutisa w 2006 roku opublikował przypadek heterozygotycznej ARK/ARH owcy dotkniętej trzęsawką. (Acutis i wsp., 2006). W odniesieniu do badań własnych włoskie populacje owiec poddane badaniu przez zespół Acutisa i wsp. (2004) i Pongoliniego i wsp. (2009) były bardzo liczne. Niewykrycie mutacji warunkującej kodowanie lizyny dla rasy appeninica i mieszańców apennine x merynos derivertia związane może być nie tylko z rzadkością występowania allela K, ale również z stosunkowo małą liczebnością własnej grupy badawczej.

W przeciwieństwie do badań własnych przeprowadzonych na zróżnicowanej genetycznie populacji owiec wolnej od scrapie, pochodzącej z trzech państw europejskich, w których nie wykazano mutacji warunkującej kodowanie lizyny, w analizach na owcach z Grecji (Billinis, i wsp., 2004; Ekateriniadou i wsp., 2007), Hiszpanii (Acin i wsp., 2004), Turcji (Meydan i wsp., 2013) ze Stanów Zjednoczonych (DeSilva i wsp., 2003; Guo i wsp., 2003) czy z Chin (Zhang i wsp., 2004; Lan i wsp., 2006; Guan i wsp., 2011), wykryto więcej niż jednego osobnika noszącego mutację C→A w pierwszej pozycji w kodonie 171.

W Grecji badania nad polimorfizmem genu białka prionowego w kodonie 171 przeprowadzono na 216 owcach należących do mieszańców pochodzących z 16 stad, w których stwierdzono przypadki trzęsawki oraz 210 owcach ras mlecznych: chios i karaaouniko wolnych od scrapie (Billinis, i wsp., 2004) oraz populacji owiec liczącej 685 osobników (Ekateriniadou i wsp., 2007). Zespół Billinisa (Billinis, i wsp., 2004) badaniu poddał grupę 96 owiec z klinicznymi objawami choroby, oraz stado 25 owiec z subklinicznymi objawami oraz 95 osobników zdrowych. Tylko w populacji owiec, u których nie wystąpiła trzęsawką wykryto polimorfizm warunkujący kodowanie lizyny w kodonie 171. Heterozygotami o genotypie ARQ/ARK było 7 owiec wolnych od scrapie (Billinis, i wsp., 2004). Naukowcy pod kierownictwem Ekateriniadou pobrali próbki mózgu od 337 osobników chorych na scrapie, natomiast od 348 zdrowych osobników z udziałem genów rasy chios pobrali materiał biologiczny, jakim jest krew obwodowa. Stado owiec zakażonych trzęsawką stanowiły dwie grupy: 158 mieszańców chios oraz 179 owiec o niepotwierdzonym pochodzeniu. W całej populacji

badanych zwierząt allel zmutowany w kierunku kodowania lizyny w triplecie 171 wystąpił w układzie ARK. Allel K wykryto w przypadku 3 osobników. Wystąpił on z częstością 0,30% dla owiec należących do grupy zdrowych zwierząt oraz 0,28% grupy niepotwierdzonego pochodzenia dotkniętego scrapie. Nie stwierdzono jego występowania u mieszańców chios chorych na trzęsawkę. Frekwencja genotypu Q171K rozkładała się następująco: 0,57% dla grupy zwierząt zdrowych rasy chios oraz 0,56% dla owiec o nieudokumentowanym pochodzeniu (Ekateriniadou i wsp., 2007). Podobne wyniki otrzymał zespół Acina (Acin i wsp., 2004). Frekwencja haplotypu ARK w badanej populacji owiec hiszpańskich wyniosła 0,3%. Badaniu poddano trzy grupy owiec: grupa pierwsza składająca się z 502 osobników należących do czterech stad zainfekowanych scrapie: RNS rasa navarra oraz trzy stada rasa aragonesa opisane jako: RAS1, RSA2 i RSA3. Polimorfizm w kodonie 171 genu *PRNP* warunkujący kodowanie lizyny wykryto u 1 osobnika ze stada RSA3 w układzie heterozygotycznym ARQ/ARK. Grupa druga składała się 38 osobników chorych na trzęsawkę, w której nie wykryto mutacji odpowiedzialnej za kodowanie lizyny w pozycji 171. Grupa trzecia obejmowała 905 owiec należących do 16 stad wolnych od scrapie z ras: rasa aragonesa (n=296), ojinegra (n=182), cartera (n=136), maellana (n=115), roya bilbilitana (n=96), churra tensina (n=32) oraz ansotana (n=48). Tylko w rasie ojinegra stwierdzono 4 heterozygoty ARQ/ARK stanowiące 0,4% badanej grupy zwierząt (Acin i wsp., 2004).

Po raz pierwszy mutację w kodonie 171 genu białka prionowego warunkującą kodowanie aminokwasu lizyny w miejsce glutaminy (**C**AG/**A**AG) opisał zespół naukowców DeSilvy w Stanach Zjednoczonych (DeSilva i wsp., 2003). W porównaniu do badań przeprowadzonych na owcach pochodzących z krajów europejskich, w których bądź nie stwierdzono mutacji warunkującej kodowanie lizyny w kodonie 171 w badaniach własnych, bądź mutacja ta występowała w układzie Q171K (Acin i wsp., 2004; Billinis, i wsp., 2004; Ekateriniadou i wsp., 2007; Meydan i wsp., 2013), amerykańscy badacze pod kierownictwem DeSilva wykazali allel K w układzie heterozygotycznym R171K (DeSilva i wsp., 2003). Badaniu poddano 1144 owce pochodzące z 21 ras oraz ich mieszańców.

Do ras mięsnych i ich mieszańców zaliczono: oxford, suffolk, dorset, montadale i hampshire. Rasy użytkowane w kierunku wełnistym i ich mieszańce stanowiły: romney, merynosy, rambonillet. Analizom poddano również rasy: st. croix, dorper, katahdin i barbados. Frekwencja allela K w całej badanej populacji owiec stanowiła 0,35%. Wykryto ją u 3 osobników należących do grupy użytkowanej w kierunku mięsnym z częstością 0,88% dla tej grupy i u 5 w kierunku kożuchowym z częstością 3,25% dla tej grupy. Allel K wystąpił w układzie heterozygotycznym Q171K u 7 osobników, co stanowiło 0,61% całej badanej populacji, oraz w układzie R171K w przypadku jednego osobnika, co stanowiło 0,09% całej badanej populacji. Owce z mutacją C→A w kodonie 171 były heterozygotami o genotypie ARK/ARQ oraz ARK/ARR (DeSilva i wsp., 2003).

Zespół Guo poddał badaniu liczącą około 1000 osobników populację owiec. Obecność mutacji warunkującej kodowanie lizyny w kodonie 171 wykryto u 8 osobników: 1 rasy dorper, 2 barbados blackbelly, 2 barbados, st. croix i 3 mieszańców rasy suffolk. Wszystkie zwierzęta były heterozygotami (Guo i wsp., 2003). Mimo, iż mutacja warunkująca przyłączenie lizyny w łancuchu polipeptydowym występuje niezwykle rzadko i w przeciwieństwie do badań własnych, w których jej nie wykryto, obecność jej stwierdzono w rasach lokalnych owiec pochodzących z terenów Chin. Wykazano występowanie allela K w rasach: small tailed han, hu, ujumqin (Zhang i wsp., 2004), hazake, markit, bayanbulak, hotan, xinjiang, qira black, kuqa i altay (Lan i wsp., 2006) oraz hu (Guan i wsp., 2011). Owce pochodzące z autonomicznego regionu Xinjiang należały do 8 lokalnych ras Obecność mutacji odpowiedzialnej za kodowanie lizyny wykryto tylko u 2 osobników rasy bayanbulak w układzie ARK. Frekwencja allela wynosiła 0,90% całej badanej populacji (Lan i wsp., 2006). Owce rasy hu pochodziły z prowincji Jiangsu i miasta Shanghai w Chinach. Frekwencja allela K wyniosła 6,11% dla całego badanego stada i wystąpiła w układzie ARK z częstością 5,83% i TRK - 0,28%. Wykryto zarówno heterozygoty, jak i homozygoty. Frekwencja genotypów była następująca: ARQ/ARK - 7,78%, ARK/ARK - 1,11%, ARH/ARK - 0,58%, ARQ/TRK - 0,56%, ARR/ARK - 0,56% dla całej rasy hu (Guan i wsp., 2011). W badaniach

przeprowadzonych na owcach pochodzących z Turcji allel K wykryto również w układzie ARK (Meydan i wsp., 2013). Mutacja warunkująca kodowanie lizyny w kodonie 171 została wykryta w 9 z 18 poddanych badaniom pod kątem polimorfizmu genu *PRNP* rodzimych ras owiec w Turcji. Lizyna wystąpiła w układzie $A_{136}L_{141}R_{154}K_{171}$. Frekwencja allelomorfa stanowiła: 0,011% dla rasy awassi, 0,010% dla morkaraman, 0,011% dla herik, 0,009% dla hems¸in, 0,026%, dla da˘glıc, 0,067% dla tushin, 0,012% dla c¸ine c¸aparı, 0,010% dla karakul i 0,040% dla zom. Wszystkie owce noszące haplotyp $A_{136}L_{141}R_{154}K_{171}$ były heterozygotami (Meydan i wsp., 2013):

- $A_{136}L_{141}R_{154}R_{171}/A_{136}L_{141}R_{154}K_{171}$,
- $A_{136}L_{141}R_{154}H_{171}/A_{136}L_{141}R_{154}K_{171}$,
- $A_{136}L_{141}R_{154}Q_{171}/ A_{136}L_{141}R_{154}K_{171}$.

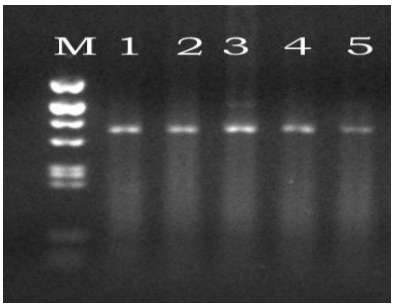
Badania pod kątem polimorfizmy genu *PRNP* na rasie kamieniecka pochodzącej z województwa warmińsko-mazurskiego przeprowadził zespół Szkudlarek-Kowalczyk (Szkudlarek-Kowalczyk i wsp., 2010). Metoda PCR-RFLP przy użyciu enzymów restrykcyjnych: *Bsp*HI, *Bsp*DI i *Bse*LI nie pozwoliła na detekcję mutacji warunkującej kodowanie lizyny w kodonie 171 (Szkudlarek-Kowalczyk i wsp., 2010). W badaniach własnych użyty został enzym *MnlI*, który pozwala na wykrycie mutacji C→A w pierwszej pozycji kodonu 171. Nie mniej jednak, w rasie kamieniecka nie został wykryty polimorfizm warunkujący kodowanie lizyny. Rutynowe badania nad polimorfizmem genu *PRNP* w kodonie 171 przeprowadzili również naukowcy w Stanach Zjednoczonych na 11748 owcach ras: border leicester, cheviot, clun forest, columbia, corriedale, dorset, finnsheep, hairsheep, hampshire, jacob, karakul, lincoln, merino, montadale, navajo churro, oxford, polypay, rambouillet, romney, romanov, scottish blackface, shropshire, southdown, suffolk, targhee, texel oraz mieszańców (APHIS, 2003). Ze względu na fakt, iż allel noszący mutację warunkującą kodowanie aminokwasu lizyny jest bardzo rzadki i nie został powiązany z podatnością/opornością na scrapie badane osobniki nie zostały przebadane pod tym kątem przez Animal and Plant Health Inspection Service (2003).

Populacja owiec wolna od trzęsawki użyta w badaniach własnych nie wykazała występowania mutacji odpowiedzialnej ze kodowanie lizyny

w kodonie 171. SNP w tej pozycji występuje niezwykle rzadko, w związku z czym nie został on powiązany z wrażliwością owiec na scrapie. Doniesienia odnośnie wykrycia allela K u owiec pochodzą z krajów na całym świecie. Polimorfizm w kodonie 171 został wykryty zarówno wśród osobników zdrowych jak i chorych na scrapie.

6.5. Polimorfizm w kodonie 189

Rycina 6 przedstawia rozdział elektroforetyczny fragmentów DNA po trawieniu amplifikonu enzymem *Alu*I. Produkt PCR o długości 545pz w przypadku wystąpienia homozygoty Q189Q został pocięty na fragmenty o długości 510pz, 26pz i 9pz, homozygoty L189L na fragmenty o długości 307pz, 203pz, 26pz i 9pz, natomiast heterozygoty Q189L na fragmenty o długości 510pz, 307pz, 203pz, 26pz i 9pz.



Rycina 6. Rozdział fragmentów DNA w 3% żelu agarozowym po trawieniu amplifikowanego fragmentu genu *PRNP* zawierającego kodon 189 restryktazą *Alu*I. M - marker długości fragmentów DNA pBR322 DNA/*Alu*I Marker, 20, ready-to-use (Fermentas), linie 1-5 - genotyp Q189Q z widocznym prążkiem o długości 510pz.

W kodonie 189 podstawowym aminokwasem kodowanym poprzez trójkę nukleotydową CAA jest glutamina (Q). Mutacja w tym kodonie w pozycji drugiej A→T warunkuje przyłączenie leucyny (L) CTA. Badana własne na populacji owiec pochodzących z Polski, Słowacji i Włoch wykazały brak polimorfizmu pod względem kodonu 189. Wszystkie osobniki były homozygotami o genotypie Q189Q. Żadna z badanych owiec nie nosiła mutacji odpowiedzialnej za kodowanie leucyny (L) w kodonie 189, co jest jednoznaczne z otrzymaniem 0% frekwencji genotypu Q189L i L189L. Frekwencja allelomorfa (Q) wyniosła 100%.

W przeciwieństwie do wyników badań własnych, w których nie wykryto mutacji warunkującej podstawianie leucyny w kodonie 189, jej obecność wykrył zespół Lana i wsp. (2006). Badania nad polimorfizmem genu białka prionowego w kodonie 189 przeprowadzone zostały na 222 owcach należących do lokalnych ras z autonomicznego regionu Xinjiang w Chinach. Frekwencja allelomorfa Q wynosiła 86,94%, natomiast allela L 13,06% (Lan i wsp., 2006). Występowanie allela L wykryto również w populacji owiec z Pakistanu (Babar i wsp, 2009) oraz z Mongolii (Gombojav i wsp., 2003; Gombojav i wsp., 2004). Pakistańska grupa owiec poddana badaniu składała się z 49 osobników należących do ras: buchi, kachi, kajli, lohi, sipli, thalli, hissardale, pak-karakul oraz awassi. Dodatkowo owce te były badane pod kątem polimorfizmu w kodonach: 101, 112, 146 i 231 (Babar i wsp, 2009). Natomiast w mongolskiej populacji owiec wykryto tylko jednego osobnika homozygotycznego L189L w rasie khalkh, co stanowiło 0,2% tej rasy. Heterozygotę Q189L wykryto w rasie: khalkh, sartull, govi-altai, bayad, darhad, karakul, orkhon, sartuul, govi-altai i bayad. Rasa khalkh oraz govi-altai okazała się najbardziej zróżnicowana genetycznie w obrębie kodonu 189. W tych dwóch rasach wykryto również mutację odpowiedzialną za kodowanie argininy (R) odpowiednio u dwóch i jednej owcy wyżej wymienionych ras (Gombojav i wsp., 2003; Gombojav i wsp., 2004).

Polimorfizm w kodonie 189 nie jest naukowo powiązany z podatnością/opornością owiec na scrapie w postaci klasycznej czy atypowej. Dlatego też w rutynowo przeprowadzanych genotypowaniach pod kątem genu białka prionowego owiec nie bierze się tego tripletów pod uwagę.

W badaniach własnych wykazano wyłącznie allelomorf Q. Dotychczas przeprowadzone badania wykazują występowanie SNP A→T w drugiej pozycji warunkujący przyłączanie leucyny (L) lub A→G odpowiedzialny za włączanie argininy (R) w triplecie 189 wyłącznie u azjatyckich ras owiec (Gombojav i wsp., 2003; Gombojav i wsp., 2004; Lan i wsp., 2006; Babar i wsp, 2009). Wykrycie mutacji warunkującej kodowanie argininy w kodonie 189 w rasie khalkh oraz govi-altai może świadczyć o specyficznym rasowo jej występowaniu (Gombojav i wsp., 2003; Gombojav i wsp., 2004).

6.6. Frekwencja genotypów

Badania własne nad polimorfizmem genu białka prionowego owiec w tripletach; 127, 141, 151, 141 i wykazały, że w całej badanej populacji owiec wykryto 3 allele $G_{127}L_{141}R_{151}X_{171}Q_{189}$, $G_{127}L_{141}C_{151}X_{171}Q_{189}$ oraz $G_{127}F_{141}R_{151}X_{171}Q_{189}$, które wystąpiły z częstością 90,45%, 8,61% i 0,94%. Haplotypy te utworzyły pięć genotypów: trzy układy homozygotyczne GLRXQ/GLRXQ (n=348), GFRXQ/GFRXQ (n=3) i GLCXQ/GLCXQ (n=2) oraz dwa heterozygotyczne GLRXQ/GLCXQ (n=69), GLRXQ/GFRXQ (n=2). Frekwencja wyżej wymienionych genotypów dla całej badanej populacji owiec wynosiła odpowiednio: 82,08%, 0,71%, 0,47%, 16,27% i 0,47%. W trzech grupach badawczych oraz poszczególnych rasach i mieszańcach zarówno homozygota GLRXQ/GLRXQ, jak i haplotyp GLRXQ występowały z najwyższą częstością. W tabeli 3 zestawiono frekwencje poszczególnych genotypów, a w tabeli 4 frekwencję alleli w populacji owiec ze Słowacji, Włoch, Polski oraz całej populacji badanych zwierząt.

Tabela 3. Frekwencje genotypów genu białka prionowego ze względu na polimorfizm w kodonie 127, 141, 151, 171 i 189 w grupie owiec ze Słowacji, Włoch i Polski oraz całej badanej populacji owiec.

Genotypy	Słowacja		Włochy		Polska		cała badana populacja	
	n	%	n	%	n	%	n	%
GLRXQ/GLRXQ	72	87,80	58	95,08	218	77,58	348	82,08
GFRXQ/GFRXQ	3	3,66	0	0,00	0	0,00	3	0,71
GLCXQ/GLCXQ	1	1,22	0	0,00	1	0,36	2	0,47
GLRXQ/GFRXQ	2	2,44	0	0,00	0	0,00	2	0,47
GLRXQ/GLCXQ	4	4,88	3	4,92	62	22,06	69	16,27

Tabela 4. Frekwencje alleli genu białka prionowego ze względu na polimorfizm w kodonie 127, 141, 151, 171 i 189 w grupie owiec ze Słowacji, Włoch i Polski oraz całej badanej populacji owiec.

Allele	Słowacja		Włochy		Polska		cała badana populacja	
	n	%	n	%	n	%	n	%
GLRXQ	150	91,46	119	97,54	498	88,61	767	90,45
GFRXQ	8	4,88	0	0,00	0	0,00	8	0,94
GLCXQ	6	3,66	3	2,46	64	11,39	73	8,61

W grupie owiec utrzymywanych w Polsce wykryto dwa allele GLRXQ i GLCXQ, które wystąpiły z częstością dla całej populacji 88,61% i 11,39%, natomiast dla rasy ile de france odpowiednio 76% i 24% oraz dla wrzosówki 90% i 10%. Nie wykryto allelomorfa GFRXQ. Owce kamienieckie okazały się jedyną monomorficzna rasą w całej badanej populacji owiec z trzech krajów. Frekwencja haplotypu GLRXQ oraz genotypu GLRXQ/GLRXQ była dla tej rasy 100%. W całej badanej grupie owiec z Polski nie wykryto homozygoty GFRXQ/GFRXQ oraz heterozygoty GLRXQ/GFRXQ. Jeden osobnik rasy ile de france był homozygotą GLCXQ/GLCXQ. Frekwencja tego genotypu wyniosła 1% dla tej rasy, natomiast w całej populacji z Polski wynosiła 0,36%. Heterozygoty GLRXQ/GLCXQ wykryto zarówno w rasie ile de france, jak i wrzosówka. Częstość, z jaką wystąpił ten genotyp wynosiła odpowiednio 46% i 20% dla wymienionych ras, a dla całej grupy owiec z Polski 22,06%. Frekwencja genotypu GLRXQ/GLRXQ wynosiła, odpowiednio: 53% dla rasy ile de france, 80% dla rasy wrzosówka i 77,58% dla całego stada. W tabeli 5 zestawiono procentowy udział poszczególnych genotypów dla rasy kamieniecka, ile de france i wrzosówka oraz całej populacji owiec z Polski. Tabela 6 przedstawia frekwencję alleli.

Tabela 5. Frekwencje genotypów genu *PRNP* ze względu na polimorfizm w kodonie 127, 141, 151, 171 i 189 w polskich stadach owiec. Objaśnienie: IDF – ile de france.

Genotypy	**kamieniecka**		**IDF**		**wrzosówka**		**cała badana populacja**	
	n	**%**	**n**	**%**	**n**	**%**	**n**	**%**
GLRXQ/GLRXQ	101	100,00	53	53,00	64	80,00	218	77,58
GFRXQ/GFRXQ	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
GLCXQ/GLCXQ	0	0,00	1	1,00	0	0,00	1	0,36
GLRXQ/GFRXQ	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
GLRXQ/GLCXQ	0	0,00	46	46,00	16	20,00	62	22,06

Tabela 6. Frekwencje alleli genu białka prionowego ze względu na polimorfizm w kodonie 127, 141, 151, 171 i 189 w polskich stadach owiec. Objaśnienie: ILD – ile de france

Genotypy	**kamieniecka**		**IDF**		**wrzosówka**		**cała badana populacja**	
	n	**%**	**n**	**%**	**n**	**%**	**n**	**%**
GLRXQ	202	100,00	152	76,00	144	90,00	498	88,61
GFRXQ	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
GLCXQ	0	0,00	48	24,00	16	10,00	64	11,39

Częstość, z jaką wystąpiły haplotypy w grupie owiec ze Słowacji wynosiła dla: GLRXQ 91,46%, GFRXQ 4,88% i GLCXQ 3,66%. Allelomorfa GFRXQ nie wykryto w rasie lacaune oraz u mieszańców zošľachtená valaška x lacaune, natomiast haplotypu GLCXQ u mieszańców cigája x lacaune. Częstość, z jaką wystąpił allelomorf GLRXQ wynosiła odpowiednio: 73,34% dla cigája, 95,95% dla rasy lacaune, 97,06% mieszańców cigája x lacaune i 92,31% dla mieszańców zošľachtená valaška x lacaune. Haplotyp GLCXQ w rasie lacaune stanowił 3,33% dla rasy cigája 4,05%, a u mieszańców zošľachtená valaška x lacaune 7,69%. Frekwencja allela GFRXQ wyniosła 23,33% dla rasy cigája 2,94% u mieszańców cigája x lacaune

W grupie owiec ze słowackiej owczarni wyryto pięć genotypów: GLRXQ/GLRXQ; GFRXQ/GFRXQ; GLCXQ/GLCXQ; GLRXQ/GFRXQ i GLRXQ/GLCXQ. Homozygoty GLRXQ/GLRXQ wykryto w przypadku 72 owiec, co stanowiło udział na poziomie 87,80% w całej badanej grupie ze Słowacji. Wykryto 4 heterozygoty GLRXQ/GLCXQ. Wystąpiły one z częstością 4,88%. 3 owce okazały się homozygotami GFRXQ/GFRXQ, co stanowiło 3,66%, 2 homozygotami GLRXQ/GFRXQ 2,44%. Tylko jedna owca nosiła genotyp GLCXQ/GLCXQ, stanowiąc 1,22% badanej populacji owiec ze Słowacji. Homozygota GLRXQ/GLRXQ wystąpiła z najwyższą częstością w rasie cigája, lacaune, a także u mieszańców cigája x lacaune i zošľachtená valaška x lacaune stanowiąc odpowiednio: 66,66%, 94,60%, 94,12% i 84,62%. Homozygotę GFRXQ/GFRXQ wykryto tylko w rasie cigája, co stanowiło 20% udział w tej rasie. Natomiast genotyp LCXQ/GLCXQ stwierdzono wyłącznie w rasie lacaune, a jego frekwencja stanowiła 2,7% tej rasy. Heterozygoty GLRXQ/GFRXQ wykryto w rasie cigája i mieszańcach cigája x lacaune, których frekwencje wynosiły odpowiednio 6,67% i 5,88%. Układ heterozygotyczny GLRXQ/GLCXQ wykryto zarówno w rasie cigája, lacaune, jak i u mieszańców zošľachtená valaška x lacaune występujących z częstością kolejno: 6,67%, 2,70% oraz 15,38%. Żaden z mieszańców cigája x lacaune nie miał tego genotypu. W tabeli 7 zestawiono procentowy udział poszczególnych genotypów, a w tabeli 8 alleli dla ras cigája i lacaune, mieszańców cigája x lacaune, lacaune x zošľachtená valaška oraz całej populacji owiec ze Słowacji

Tabela 7. Frekwencje genotypów genu białka prionowego ze względu na polimorfizm w kodonie 127, 141, 151, 171 i 189 w słowackich stadach owiec. Objaśnienia: CxLC – mieszańce cigája x lacaune, LCxZV - mieszańce lacaune x zošľachtená valaška

Genotypy	cigája		lacaune		CxLC		LCxZV		cała badana populacja	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
GLRXQ/GLRXQ	10	66,66	35	94,60	16	94,12	11	84,62	72	87,80
GFRXQ/GFRXQ	3	20,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	3	3,66
GLCXQ/GLCXQ	0	0,00	1	2,70	0	0,00	0	0,00	1	1,22
GLRXQ/GFRXQ	1	6,67	0	0,00	1	5,88	0	0,00	2	2,44
GLRXQ/GLCXQ	1	6,67	1	2,70	0	0,00	2	15,38	4	4,88

Tabela 8. Frekwencje alleli genu białka prionowego ze względu na polimorfizm w kodonie 127, 141, 151, 171 i 189 w słowackich stadach owiec. Objaśnienia: CxLC – mieszańce cigája x lacaune, LCxZV - mieszańce lacaune x zošľachtená valaška

Genotypy	cigája		lacaune		CxLC		LCxZV		cała badana populacja	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
GLRXQ	22	73,34	71	95,95	33	97,06	24	92,31	150	91,46
GFRXQ	7	23,33	0	0,00	1	2,94	0	0,00	8	4,88
GLCXQ	1	3,33	3	4,05	0	0,00	2	7,69	6	3,66

W grupie owiec z włoskich owczarni wykazano homozygoty GLRXQ/GLRXQ oraz heterozygoty GLRXQ/GLCXQ. Ich częstość wynosiła odpowiednio 95,08% i 4,92% dla całej grupy owiec z Włoch. W rasy apennine częstość występowania homozygot GLRXQ/GLRXQ wyniosła 96%, natomiast heterozygot GLRXQ/GLCXQ 4%, a dla mieszańców apennine x merynos derivertia odpowiednio dla heterozygoty 90,91% i homozygoty 9,09%. Nie wykryto genotypów GLRXQ/GLRXQ, GFRXQ/GFRXQ oraz GLRXQ/GFRXQ. Nie wykazano również występowania allelomorfa GFRXQ. Haplotyp GLRXQ wystąpił z najwyższą częstością, która dla całej grupy badawczej kształtowała się na poziomie 97,54% oraz odpowiednio dla rasy apennine 98,% i dla mieszańców apennine x merynos derivertia 95,45%. Frekwencja allela GLCXQ była na poziomie odpowiednio 2,46% dla całej grupy badawczej, 2% dla rasy apennine i 4,55% dla mieszańców apennine x merynos derivertia. W tabeli 7 zestawiono częstość, z jaką wystąpiły poszczególne genotypy u mieszańców apennine x merynos derivertia i w rasie apennine oraz całej

badanej grupie owiec z Włoch. W tabeli 9 przedstawiono częstość, z jaką wystąpiły genotypy, w tabeli 10 allele w grupie mieszańców apennine x merynos derivertia i rasy apennine oraz całej badanej populacji owiec z Włoch.

Tabela 9. Frekwencje genotypów genu białka prionowego ze względu na polimorfizm w kodonie 127, 141, 151, 171 i 189 we włoskich stadach owiec. Objaśnienie: AxAM - mieszańce apennine x merynos derivertia

Genotypy	AxAM		appeninine		cała badana populacja	
	n	%	n	%	n	%
GLRXQ/GLRXQ	10	90,91	48	96,00	58	95,08
GFRXQ/GFRXQ	0	0,00	0	0,00	0	0,00
GLCXQ/GLCXQ	0	0,00	0	0,00	0	0,00
GLRXQ/GFRXQ	0	0,00	0	0,00	0	0,00
GLRXQ/GLCXQ	1	9,09	2	4,00	3	4,92

Tabela 10. Frekwencje alleli genu białka prionowego ze względu na polimorfizm w kodonie 127, 141, 151, 171 i 189 we włoskich stadach owiec. Objaśnienie: AxAM - mieszańce apennine x merynos derivertia

Genotypy	AxAM		appeninine		cała badana populacja	
	n	%	n	%	n	%
GLRXQ	21	95,45	98	98,00	119	97,54
GFRXQ	0	0,00	0	0,00	0	0,00
GLCXQ	1	4,55	2	2,00	3	2,46

Na przestrzeni ostatnich lat badania prowadzone pod kątem polimorfizmu genu *PRNP* dotyczyły przede wszystkim kodonów: 136 A/V, 154 R/H i 171 Q/R/H warunkujących oporność/podatność na klasyczną postać trzęsawki oraz 141 L/F powiązanego z atypową formą scrapie. Badania własne dotyczyły polimorfizmu w kodonach: 127, 141, 151, 171 i 189 w stadach owiec z Polski, Słowacji i Włoch. W krajch tych przeprowadzone zostały również badaia nad genem białka prionowego owiec przez innych naukowców między innymi:

- w Polsce: Jasik i Reichert (2003); Niżnikowskiego i wsp. (2006); Kaczor i wsp. (2009); Kawęckiej i Rejduch (2009); Piestrzyńskiej-Kajtoch i wsp. (2009); Rejduch i wsp. (2009); Markowskiej i wsp. (2010); Polaka i wsp.

(2010); Szkudlarek-Kowalczyk i wsp. (2009, 2010); Wiśniewskiej i wsp. (2009, 2010); Smołucha i wsp. (2012),

- na Słowacji: Margetina i wsp. (2006); Vašíčková i Vašíček (2010); Vašíček i wsp. (2010), Miluchová i wsp. (2012),
- we Włoszech: Vaccariego i wsp. (2001, 2007); Acutisa i wsp. (2004, 2006); Vascellariego i wsp. (2005); Ligiosa i wsp. (2006); Paludiego i wsp. (2007); Pongoliniego i wsp. (2009); Mazzy i wsp. (2010).

7. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

I. Przyjęta metoda badawcza przy użyciu techniki PCR-RFLP z wykorzystaniem pięciu restryktaz pozwoliła na wykrycie mutacji punktowych w genie białka prionowego owiec w kodonach:

- **127**: *Hae*III: GGC/GTC/AGC: glicyna/walina/seryna: G127V/S
- **141**: *Mnl*I: CTT/TTT: leucyna/fenyloalanina: L141F
- **151**: *Ava*II: TGT/CGT: cysteina/arginina: C151R
- **171**: *Mbo*I: AAG/XXX lizyna/inny K171X
- **189**: *Alu*I: CAA/CTA: glutamina/ leucyna: Q189L

oraz określenie frekwencji alleli, a także genotypów dla poszczególnych ras owiec, mieszańców, stad z Polski, Włoch i Slowacji, a także dla całej badanej populacji owiec.

II. W przeprowadzonych badaniach własnych nie wykryto mutacji warunkujących kodowanie aminokwasów: waliny (V) bądź seryny (S) w triplecie 127; lizyny (K) w 171; leucyny (L) w 189.

III. Cała badana grupa owiec była monomorficzna pod względem kodonu 127 i 189, w których kodowanymi aminokwasami były odpowiednio: glicyna i glutamina.

IV. W badanej populacji owiec mutację odpowiedzialną za kodowanie fenyloalanin (F) w pozycji 141 wykryto u 3 osobników rasy cigája pochodzących ze Słowacji. Leucyna (L) warunkująca odporność na atypową postać scrapie została wykryta u 421 osobników.

V. Najwyższe zróżnicowanie pod względem genetycznym wykazano w triplecie 151. W całej badanej populacji owiec stwierdzono polimorfizm pojedynczego nukleotydu warunkujący zarówno kodowanie cysteiny, jak i argininy. Homozygoty R151R wystąpiły z najwyższą częstością, na drugim miejscu pod względem frekwencji były heterozygoty R151C, natomiast homozygoty C151C wykryto tylko u owiec utrzymywanych na Słowacji i w Polsce.

VI. Biorąc pod uwagę kodony: 127, 141, 151, 171 i 189 wykazano występowanie trzech alleli w całej badanej populacji owiec: GLRXQ, GFRXQ i GLCXQ z częstością odpowiednio: 90,45%, 0,94% i 8,61%.

Allelomorfa GFRXQ nie wykryto wśród zwierząt utrzymywanych w Polsce i we Włoszech oraz w rasie lacaune i mieszańcach zośľachtená valaška x lacaune ze Słowacji.

VII. Wyżej wymienione haplotypy wystąpiły w trzech układach homozygotycznych i dwóch heterozygotycznych dając pięć genotypów: GLRXQ/GLRXQ, GFRXQ/GFRXQ, GLCXQ/GLCXQ, GLRXQ/GFRXQ, GLRXQ/GLCXQ. W całej badanej populacji owiec, jak i w poszczególnych stadach, rasach i mieszańcach wykryto homozygotę GLRXQ/GLRXQ, która wystąpiła w najwyższej częstości oraz heterozygotę GLRXQ/GLCXQ.

VIII. Najbardziej zróżnicowana genetycznie okazała się populacja zwierząt ze Słowacji, w której stwierdzono występowanie wszystkich pięciu genotypów. Ponadto wykryto jednego osobnika homozygotycznego GLCXQ/GLCXQ w rasie ile de france. Nie wykryto genotypów GFRXQ/GFRXQ, GLCXQ/GLCXQ, GLRXQ/GFRXQ u owiec rasy: kamieniecka, wrzosówka, apennine i mieszańców apennine x merynos derivertia.

IX. W standardowo wykonywanych testach metodą PCR-RFLP przy zastosowaniu enzymów restrykcyjnych: *Bsp*HI, *Bsp*DI i *Bse*LI mutacja C→A w pierwszej pozycji tripletu 171 nie jest wykrywana. Istnieje duże prawdopodobieństwo, iż allel warunkujący kodowanie aminokwasu lizyny może zostać błędnie odczytany, jako allelomorf włączający aminokwas glutaminę. Prowadzić to może również do błędnego wyniku genotypowania, gdzie heterozygota K171X odczytana zostanie, jako homozygota X171X.

X. Wnioski:

W związku z niewykryciem polimorfizmu w kodonach 127 i 189 genu *PRNP* owiec, bardzo niską częstością, z jaką występują mutacje warunkujące kodowanie aminokwasów innych niż glicyna w triplecie 127 i glutamina w 189 oraz z brakiem powiązania tych kodonów z podatnością/opornością na klasyczną scrapie czy jej formę Nor98 nie ma potrzeby prowadzenia genotypowania w tym kierunku ze względu na aspekty zdrowotne czy

gospodarczo-ekonomiczne. Nie mniej jednak w celach naukowo-poznawczych zaleca się zwrócić uwagę na triplety 127 i 189.

Pomimo niewykrycia w badaniach własnych mutacji warunkującej kodowanie lizyny w kodonie 171, należy prowadzić dalsze badania mające na celu jej powiązanie z opornością/podatnością na trzęsawkę. Ze względu na fakt, iż w rutynowo prowadzonych genotypowaniach metodą PCR-RFLP pod kątem kodonów 136, 154 i 171 nie jest możliwe wykrycie mutacji C→A w pozycji pierwszej w triplecie 171, dotychczasowe wyniki badań mogą zawierać błędy dotyczące zarówno frekwencji genotypów, jak i alleli oraz wpływu mutacji warunkującej włączanie lizyny do łańcucha polipeptydowego na podatność owiec na scrapie.

W związku z opisaniem Nor98 oraz powiązaniem wpływu polimorfizmu w kodonie 141 na atypową postać trzęsawki należy włączyć genotypowanie w tym triplecie do rutynowo przeprowadzanych badań.

Badania własne wykazały największe zróżnicowanie pod względem genetycznym badanej populacji owiec w kodonie 151. Ze względu na duże zróżnicowanie rasowe owiec pochodzących z trzech europejskich państw, w których znalazły się również rodzime dla danego kraju rasy i mieszańce należałoby kontynuować oraz rozszerzyć badania w tym kierunku. Genotypowanie kodonu 151 nie należy do rutynowo przeprowadzanych badań w celu określenia genotypów mających wpływ na oporność/podatność owiec na scrapie, dlatego też nie prowadzi się badań pod tym kątem. Zaleca się kontynuowanie badań mających na celu określenie frekwencji alleli i genotypów w innych populacjach owiec oraz sprawdzenie wpływu SNP w triplecie 151 na wrażliwość owiec na klasyczną oraz atypową postać scrapie.

8. PIŚMIENNICTWO

Acin C., Martin-Burriel I., Goldmann W., Lyahyai J., Monzon M., Bolea R., Smith A., Rodellar C., Badiola J.J., Zaragoza P. (2004): *Prion protein gene polymorphisms in healthy and scrapie-affected Spanish sheep.* J. Gen. Virol. 85: 2103-2110.

Acin C., Pitarch J. L., Monleon E., Monzón M., Bolea R., Marín B., Garza M., Sarasa R., Badiola J.J. [online]: *Prnp gene polymorphisms of Spanish sheep and goat affected with natural scrapie: retrospective study of nearly 500 scrapie affected animals.* http://chimerism.medunigraz.at/cms/website.php - (21.03.2013r.).

Acutis P.L., Sbaiz L., Verburg F., Riina M.V., Ru G., Moda G., Caramelli M., Bossers A. (2004): *Low frequency of the scrapie resistance-associated allele and presence of lysine-171 allele of the prion protein gene in Italian Biellese ovine breed.* J. Gen. Virol. 85, 3165-3172.

Acutis P.L., Martucci F., Mazza M., Peletto S., Iulini B., Corona C., Bozzetta E., Casalone C., Caramelli M. (2006): *A case of scrapie in a sheep carrying the lysine-171 allele of the prion protein gene.* Arch. Virol. 151, 1875-1880.

Alexander B.M., Stobart R.H., Russell W.C., O'Rourke K.I., Lewis G. S., Logan J. R., Duncan J.V., Moss G.E. (2005): *The incidence of genotypes at codon 171 of the prion protein gene (PRNP) in fivebreeds of sheep and production traits of ewes associated with those genotypes.* J. Anim. Sci. 83, 455-459.

Alvarez L., Arranz J.J., San Primitivo F. (2006): *Identification of a new leucine haplotype (ALQ) at codon 154 in the ovine prion protein gene in Spanish sheep.* J. Anim. Sci. 84:259-265.

Alper T., Haig D.A., Clarke M.C. (1966): *The exceptionally small size of the scrapie agent.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 22: 278–284.

Alper T., C151Ramp W.A., Haig D.A., Clarke M.C. (1967): *Does the agent of scrapie replicate without nucleic acids?* Nature 214: 764–766.

Alper T., Haig D.A., Clarke M.C. (1978): *The scrapie agent: evidence against its dependence for replication on intrinsic nucleic acid.* J. Gen. Virol. 41: 503–516.

Andreoletti O., Berthon P., Marc D., Sarradin P., Groscloude J., Keulen L., Schelcher P., Elsen J.M., Lantier F. (2000): *Early accumulation of PrP^{Sc} in gutassociated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural scrapie.* J. Gen. Virol. 81: 3115-3126.

APHIS - Animal and Plant Health Inspection Service, United States Department of Agriculture, Veterinary Services, Centers for Epidemiology and Animal Health, *Distribution of Genotypes at Codon 171 in U.S. Sheep.* December 2003.: www.aphis.usda.gov (16.10.2012r.).

Babar M.E., Farid A., Benkel B.F., Ahmad J., Sajid I.A., Imran M., Hussain T., Nadeem A. (2008): *Genetic variability at seven codons of the prion protein gene in nine Pakistani sheep breeds.* J. Genet. 87 (2): 187-190.

Babar M.E., Farid A., Benkel B.F., Ahmad J., Nadeem A., Imran M. (2009): *Frequencies of PrP genotypes and their implication for breeding against scrapie susceptibility in nine Pakistani sheep breeds.* Mol. Biol. Rep. 36: 261-265.

Barszcz K., Kupczyńska M., Kobryń H. (2010): *Wpływ wybranych biologicznych czynników chorobotwórczych na niektóre struktury ośrodkowego układu nerwowego i zachowanie się zwierząt.* KOSMOS Problemy Nauk Biologicznych 59 (1-2): 71-81.

Baylis M., Houston F., Goldmann W., Hunter N., McLean A.R. (2000): *The signature of scrapie: differences in the PrP genotype profile of scrapie-affected and scrapie-free UK sheep flocks.* Proc. R. Soc. Lond. B 267: 2029-2035.

Belt P.B.G.M., Muileman I.H., Schreuder B.E.C., Bos-de Ruijter J., Gielkens A.L.J., Smits M.A. (1995): *Identification of five allelic variants of the sheep PrP gene and their association with natural scrapie.* J. Gen. Virol. 76: 509-517.

Benestad S.L., Sarradin P., Thu B., Schönheit J., Tranulis M.A., Bratberq B. (2003): *Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98.* Vet. Rec. 153 (7) 2002-2008.

Benestad S.L., Arsac J-No 1., Goldmann W., Nöremark M. (2008): *Atypical/Nor98 scrapie: properties of the agent, genetics, and epidemiology.* Vet. Res. 39: 18.

Benkel B.F., Valleb E., Bissonnettec N., Farida A.F. (2007): *Simultaneous detection of eight single nucleotide polymorphisms in the ovine prion protein gene.* Mol. Cell. Probes. 21, 363-367.

Billinis C., Psychas, V., Leontides, L., Spyrou, V., Argyroudis, S., Vlemmas, I., Leontides, S., Sklaviadis, T. & Papadopoulos, O. (2004): *Prion protein gene polymorphism in healthy and scrapie affected sheep in Greece*. J. Gen. Virol. 85, 547–554.

Blättler T. (2002): *Transmission of prion disease.* APMIS 110: 71-78.

Bossers A., De Vires R., Smits M.A. (2000): *Susceptibility of sheep for scrapie as assessed in vitro conversion of nine naturally oC151CuR151Ring variants of PrP.* J. Virol. 74:1407-1414.

Bovo G., Nishizawa T., malatese C., Borghesan F., Mutinelli F., Montesi F., De Mas S. (1999): *Viral encephalopathy and retinopathy of farmed marine fish species in Italy.* Virus. Res. 63 (1-2): 143-6.

Brown P., Bradley R. (1998): *1755 and all that: a historical primer of transmissible spongiform encephalopathy*. BMJ, 317: 1688–1692.

Brown T.A. (2009): *Genomy.* Wydawnictwo Naukowe PWN S.A. Warszawa 2001, 2009: 256.

Buschmann A., Lühken G., Schultz J., Erhardt G., Groschup M.H. (2004): *Neuronal accumulation of abnormal prion protein in sheep carring a scrapie-resistant genotype (PrPARR/ARR).* J. Gen. Virol. 85 (9): 2727-2733.

Buschmann A., Hoffmann Ch., Keller M., Eiden M., Kaatz M., Groschup M.H. (2009): *Zróżnicowanie odmian TSE u owiec i bydła.* Materiały konferencyjne Międzynarodowej Konferencji Naukowej „Pasażowalne gąbczaste encefalopatie u zwierząt gospodarskich diagnostyka i zapobieganie. Balice 2009: 15-16.

Carp R.I., Merz P.A., Kascsak R.J., Merz G., Wisniewski H.M. (1985): *Nature of the Scrapie Agent: Current Status of Facts and Hypotheses.* J. Gen. Virol. 66: 1357-1368.

Castiglioni B, Comincini S., Drisaldi B., Motta T., Ferretti L. (1998): *Comparative mapping of the prion gene (PRNP) locus in cattle, sheep and human with PCR-generated probes.* Mamm. Genome. 9: 853-855.

Charon K.W., Świtoński M. (2012): *Genetyka zwierząt.* Wydawnictwo Naukowe PWN S.A. Warszawa: 94-100, 164-170, 248-249.

Chesebro B. (1998): *BSE and prions: Uncertainties about the agent.* Science 279(5347): 42-43.

Dawson M., Hoinville L.J., Hoise B.D., Hunter N. (1998): *guidance on the use of PrP genotyping as an aid to the control of clinical scrapie.* Vet. Rec. 6: 623-625.

DebBurman SH., Raymond G.J., Caughey B., Lindquist S. (1997): *Chaperone-supervised conversion of prion protein to its proteinase-resistant form.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94: 13938-13943.

Decyzja Komisji 2003/100/WE z dnia 13 lutego 2003 r. ustanawiająca minimalne wymogi w zakresie tworzenia programów hodowli owiec odpornych na pasażowalne encefalopatie gąbczaste.

DEFRA (2006): The Department for Environment, Food and Rural Affairs In National Scrapie Plan for Great Britain.

Deptuła W., Pawlikowska M. (1999): *Priony i ich znaczenie u zwierząt i ludzi.* Mag. Wet. 55 (11): 711-717.

Deptuła W., Pawlikowska M. (2000): *Charakterystyka chorób prionowych – wybrane dane.* Mag. Wet. 56 (1): 11-14.

DeSilva U., Guoa X., Kupferb D.M., Fernandoa S.C., Pillaia A.T.V., Najarb F.Z., Sob S., Fitach G.Q., Roeb B.A. (2003): *Allelic variants of ovine prion protein gene (PRNP) in Oklahoma sheep.* Cytogenet Genome Res. 102, 89-94.

Dickinson A.G., Outram G. (1979): *The scrapie replication-site hypothesis and its implications for pathogenesis.* In Slow Transmissible Diseases of the Nervous System 2: 13-31.

Diener T.O. (1972): *Is the scrapie agent a viroid?* Nature New Biology 235: 218-219.

DNA Purtification for 200 µl of Whole Blood (with RBC Lysis) - MasterPure™ DNA Purification Kit for Blond Version II firmy Epicentre Technology według protokołu B2.

Drögemüller C., De Vries F., Hamann H., Leeb T., Distl O. (2004): *Breeding German sheep for resistence to scrapie.* Vet. Rec. 154: 257-260.

EFABIS - European Farm Animal Biodiversity Information System: http://efabis-sk.scpv.sk (11.02.2013r.).

Heggeba R., Press C.M., Gunnes G., Lie K.J., Tranulis M.A., Ulvund M., Groschup M.H., Landsverk T. (2000): *Distribution of prion protein in the ileal Peyer`s patch of scrapie-free lambs and lambs naturally and experimentally exposed to scrapie agent.* J. Gen. Virol. 81: 2327-2337.

Ekateriniadou L.V., Kanata E., Panagiotidis C., Nikolaou A., Koutsoukou E., Lymberopoulus A.G., Sklaviadis T. (2007): *PrP genotypes in scrapie-affected sheep in Greece-The contribution of the AHQ 1 polymorphism.* Small Rum. Res. 73: 142-149.

Erhardt G., Buschmann A., Groschup M.H., Lühken G. (2009): *Genetyczne aspekty klasycznej i nietypowej trzęsawki oraz ich związek ze strategią selekcji genotypu PrP.* Materiały konferencyjne Międzynarodowej Konferencji Naukowej „Pasażowalne gąbczaste encefalopatie u zwierząt gospodarskich diagnostyka i zapobieganie. Balice 2009: 9-10.

Fast Ch., Groschup M.H. (2013): Prions and Diseases: Vol. 2 Animals, Humans and Environment:. Springer Science + Business Media New York 2013: 15-44.

Fediaevsky A., Calavas D., Gasqui P., Moazami-Goudarzi K., Laurent P., Arsac J-N., Ducrot C., Moreno C. (2010): *Quantitative estimation of genetic risk for atypical scrapie in French sheep and potential consequences of the current breeding programme for resistance to scrapie on the risk of atypical scrapie.* GSE 42: 14.

Gajdusek D.C. (1977): *Unconventional viruses and the orgin and disappearance of Kuru.* Science 197: 943-960.

GIW - Główny Inspektorat Weterynarii (2011): *Stan zakaźnych chorób zwierzat styczeń 2011.* Warszawa: www.wetgiw.gov.pl (10.04.2012).

Griffith J.S. (1967): *Self-replication and scrapie.* Nature 215: 1043-1044.

Goldmann W., Hunter N., Smith G., Foster J., Hope J. (1994): *PrP genotype and agent effects in scrapie: change in allelic interaction with different isolates of agent in sheep, a natural host of scrapie.* J. Gen. Virol. 75; 989-995.

Goldmann W., Baylis M., Chichota C., Stevenson E., Hunter N. (2005): *Frequencies of PrP gene haplotypes In British sheep and the implications for breeding programem.* J. Appl. Microbiol. 98: 1294-1302.

Goldmann W., Houston F., Stewart P., Perucchini M., Foster J.,Hunter N. (2006): *Ovine prion protein variant $A^{136}R^{154}L^{168}Q^{171}$ increases resistance to experimental challenge with bovine spongiform encephalopathy agent.* J. Gen. Virol. 87: 3741-3745.

Goldmann W. (2008): *PrP genetics in ruminant transmissible spongiform encephalopathies.* Vet. Res. 39:30.

Gombojav A., Ishiguro N., Horiuchi M., Serjmyadag D., Byambaa B., Shinagawa M. (2003): *Amino acid polymorphisms of PrP gene in Mongolian sheep.* J. Vet. Med. Sci. 65(1): 75-81.

Gombojav A., Ishiguro N., Horiuchi M., Shinagawa M. (2004): *Unique amino acid polymorphisms of PrP genes in Mongolian sheep breeds.* J. Vet. Med. Sci. 66 (10): 1293-1295.

Groschup M.H., Lacroux C., Buschmann A., Lühken G., Mathey J.,Eiden M., Lugan S., Hoffmann C., Espinosa J.C., Baron T.,Torres J.M., Erhardt G., Andreoletti O. (2007): *Classic Scrapie in Sheep with the ARR/ARR Prion Genotype in Germany and France.* Emerg. Infect. Dis. 13 (8): 1201-1207.

Guan F., Pan L., Li J., Tang H., Zhu C., Shi G. (2011): *Polymorphisms of the prion protein gene and their effects on litter size and risk evaluation for scrapie in Chainise Hu sheep.* Virus Genes 43: 147-152.

Guo X., Kupfer D. M., Fitch G. Q, Roe B. A. DeSilva_U. (2003): *Identification of a novel lysine-171 allele in the ovine prion protein (PRNP) gene.* Anim. Genet. 34: 302–318.

Hannah E.L., Belay E.D., Gambetti P., Krause G., Parchi P., Capellari S., Hoffman R.E., Schonberger L.B. (2001): *Creutzfeld-Jakob disease after recipt of a previously unimplicated brand of dura mater graft.* Neurology 56: 1080-1083.

Healy D., Evans J. (1993): *Creutzfeld-Jakob disease after pituitary gonadotrophins.* Br. Med. J. 307: 517-518.

Heaton M.P., Leymaster K.A., Kalbfleisch T.S., Frenking B.A., Smith T.PL., Clawson M.L., Laegreid W.W. (2010): *Ovine reference materials and assays for prion genetic testing.* BMC Vet. Res. 6:23.

Heggebø T., González L., Press C.M., Gunnes G., Espanes A., Jeffrey A. (2003): *Diesase-associated PrP in the enteric nervous system of scrapie-affected Suffolk sheep.* J. Gen. Virol. 8 (5): 1327-1338.

Hörnlimann B, Riesner D., Kretzschmar H. (2006): *Prions in humans and animals.* Walter de Gruyter, Berlin, Germany: 3- 26; 46-47; 59-61; 108-110; 222-232; 398-399.

Hunter G.D. (1993): *Scrapie and Mad Cow Disease. The Smallest and Most Lethal Living Thing.* Vantage Press New York: 11-28.

Hunter N., Moore L., Hosie B.D., Dingwall W.S., Greig A. (1997): *Association between natural scrapie and PrP genotype in a flock of Suffolk sheep in Scotland.* Vet. Rec. 140: 59-63.

Hunter N., Goldmann W., Foster J.D., Cairns D., Smith G. (1997a): *Natural scrapie and PrP genotype; case-control studies in British sheep.* Vet. Rec. 141: 137-140.

Ikeda T., Horiuchi M., Ishiguro N., Muramatsu Y., Kai-Uwe G.D., Shinagawa M. (1995): *Amino acid polymorphisms of Prp with reference to onset of scrapie in Suffolk and Corriedale sheep in Japan.* J. Gen. Virol. 76: 2577-2581.

Jasik A., Reichert M. (2003): *Application of temperature gradient gel electrophoresis method for studying the sheep prion protein (PrP) gene polymorphism.* Bull. Vet. Inst. Pulawy 47: 341-348.

Junghans F., Teufel B., Buschmann A., Steng G., Groschup M.H. (1998): *Genotyping of German sheep with respect to scrapie susceptibility.* Vet. Rec. 143: 340-341.

Kaczor U., Damoń D. (2009): *Trzęsawka – pasażowalna encefalopatia gąbczasta owiec.* Wiad. Zootech. R XLVII, 3: 37-45.

Kaczor U., Domoń D., Martyniuk E., Murawski M. (2009): *Polimorfizm w locus genu PrP w populacji plennych owiec okulskich.* Materiały konferencyjne „Pasażowalne gąbczaste encefalopatie u zwierząt gospodarskich diagnostyka i zapobieganie" Balice 2009: 61-62.

Karami M., Amirinia C., Hashan N.E.J., Amirmozafari N., Chamani N.A.M., Banabazi M.H. (2011): *Polymorphisms of the prion protein gene Arabi sheep breed in Iran.* Afr J. Biotechnol. 10 (70): 15819-15822.

Kawęcka A, Sikora J. *Rasy rodzime – owce.* Instytut Zootechniki, Państwowy Instytut Badawczy.

Kawęcka M., Rejduch B. (2009): *Ocena częstości występowania genotypów związanych z opornością/wrażliwością na klasyczną trzęsawkę w stadach stanowiących rezerwę genetyczną owiec w Polsce.* Materiały konferencyjne „Pasażowalne gąbczaste encefalopatie u zwierząt gospodarskich diagnostyka i zapobieganie" Balice 2009: 59-60.

Kimberlin R.H., (1982): *Scrapie agents: prions or virinos?* Nature 297: 107-108.

Kipanyula M.J., Chuma I.S., Brundtland E., Bårdsen K., Ulvund M.J. (2008): *Genotyping of the prion protein (PrP) gene in Red Maasai and Black Head Persian sheep in Tanzania.* Small Rum. Res. 79: 146-151.

Kirkwood J.K., Cunningham A.A. (1994): *Epidemiological observations on spongiform encefalophathies in captive wild animals in the British Isles.* Vet. Rec. 135 (13): 296-303.

Kitteberger R., Chaplim M.J., simmons M.M., Ramirez-Villaescusa A., McIntyre L., MacDiarmid S.C., Hannah M.J., Jenner J., Bueno R., Bayliss D., Black H., Pigott C.J., O`Keefe J.S. (2010): *Atypical scrapie/Nor98 in a sheep from New Zeland.* J. Vet. Diagn. Invest. 22: 863-875.

Kutzer T., Pfeiffer I., Breng B. (2002): *Identification of new allelic variants in the ovine prion protein (PrP) gene.* J. Anim. Breed. Genet. 119: 201-208.

Lan Z., Wang Z. L., Liu Y., Zhang X. (2006): *Prion protein gene (PRNP) polymorphisms in Xinjiang local sheep breeds in Chin.* Arch. Virol. 151, 2095-2101.

Larska M., Polak M.P. (2003): *Rola krwi w transmisji chorób pionowych.* Med. Wet. 59 (8): 670-672.

Larski Z. (2011): *Niektóre nowe dane dotyczące wirusologii, prionów i immunologi.* Med. Wet. 67 (12): 787-791.

Lee I.Y., Westaway D., Smit A.F., Wang K., Seto J., Chen L., Acharya C., Ankener M., Baskin D., Cooper C., Yao H., Prusiner S.B., Hood L.E. (1998): *Complete genomic sequence and analysis of the prion protein gene region from three mammalian species*. Genome Res. 8: 1022-37.

Ligios C., Cancedda M.G., Madau L., Santucciu C., Maestrale C., Agrimi U., Ru G., Di Guardo G. (2006): *PrP^{Sc} deposition in nervous tissues without lymphoid tissue involvement is frequently found in ARQ/ARQ Sarda breed sheep preclinically affected with natural scrapie.* Arch. Virol. 151: 2007-2020.

Liberski P.P., Yanagihara R., Gibbis C.J., Gajdusek D.C. (1990): *Spread of Creutzfeldt-Jakob disease virus along visual pathways after intra ocular inoculation.* Arch. Virol. 111: 141-147.

Liberski P.P., Bartosiewicz J. (2001): *Choroby wywołane przez priony i choroba szalonych krów.* Med. Prakt. 1: 119-120.

Lühken G., Buschmann A., Groschup M.H., Erhardt G. (2004): *Prion protein allele A136H154Q171 is associated with high susceptibility to scrapie in purebred and crossbred German Merinoland sheep.* Arch. Vrol. 149: 1571-1580.

Lühken G., Buschmann A., Brandt H., Eiden M., Groschup M.H., Erhardt G. (2007): *Epidemiological and genetical differences between classical and atypical scrapie cases.* Vet. Res. 38: 65-80.

Lühken G., Lipsky S., Peter Ch., Erhardt G. (2008): *Prion protein polymorphisms in autochthonous European sheep breeds in respect to scrapie eradication in affected flocks.* Small Rum. Res. 75: 43-47.

Margetin M., Dúbravská J., Smriga R., Srpoň P., Matta M. (2006): *frekvencia alel PRP génu pri čistokrvnỳch oviec chovanỳch na Slovensku.* Acta Fytotechnica et Zootechnica - Memoriadne čislo 2006: 45-47.

Markowska A., Wiśniewska E., Szkudlarek-Kowalczyk M., Mroczkowski S. (2010): *Analysis of CAG/AAG polymorphism incidence at codon 171 of the ovine prion protein gene.* Zeszyty Naukowe 255 – Zootechnika 38: 19-26.

Matúšková M., Csóková N., Filipčik P., Hanušovská E., Bireš J., Cabadaj R., Kontsek P., Novák M. (2003): *First confirmed sheep scrapie with $A^{136}R^{154}Q^{171}$ genotype in Slovakia.* Acta Virol. 47: 195-198.

Mazza M., Iulini B., Vaccari G., Acutis P.L., Martucci F., Esposito E., Peletto S., Barocci S., Chiappini B., Corona C., Barbieri I., Caramelli M., Agrimi U., Casalone C., Nonno R. (2010): *Co-existence of classical and Nor98 in a sheep from Italian outbreak.* Res. Vet. Sci. 88: 478-485.

MacDiarmid S. (2010): *A case of atypical scrapie/Nor 98 reported in New Zealand*. Ministry of Agriculture & Forestry 2010: 55-56. www.oie.int (10.04.2012).

McIntyre K.M., Gubbins S., Goldmann W., Hunter N., Baylis M. (2008): *Epidemiological characteristics of classical scrapie outbreaks in 30 sheep flocks in the United Kingdom.* Plos ONE 3 (12): 1-10.

Meydan H., Özkan M.M., Yildiz M.A. (2013): *Genetic risk assessment for atypical scrapie in Turkish native sheep breeds.* Small Rum. Res. 111: 16-22.

Meydan H., Özkan M.M., Yildiz M.A., Goldmann W. (2013): *Novel polymorphisms in ovine prion protein gene.* Anim. Genet. doi: 10.1111/age.12019. [Epub ahead of print].

Miluchová M., Gábor M., Trakovická A. (2012): *The identification of DNA polymorphism at the 154 codon of the ovine PRNP gene by allelic discriminate on using a dusl fluorescent probe assay.* Acta Fytotechnica et Zootechnica 3: 57-60.

Mitchell G.B., O`Rourke K.I., Harrington N.P., Soutyrine A., Simmons M.M., Dudas S., Zhuang D., Laude H., Balachandran A. (2010): *Identyfication of atypical scrapie in Canadian sheep.* J. Vet. Diagn. Invest. 22: 408-411.

Moreno C.R., Moazami-Goudarzi K., Laurent P., Cazeau G., Andreoletti O., Chadi S., Elsen J-M., Calavas D. (2007): *Which PrPhaplotypes in a French sheep population are the most susceptible to atypical scrapie?* Arch. Virol. 152: 1229-1232.

Moum T., Olsaker I., Hopp P., Moldal T., Valheim M., Moum T., Benestad S.L. (2005): *Polymorphisms at codons 141 and 154 in the ovine prion protein gene are associated with scrapie Nor98 cases*. J. Gen. Virol. 86: 231-235.

MSR - Maryland Small Ruminant: www.sheepandgoat.com (12.02.2013r.).

NCBI - National Center for Biotechnology Information: www.ncbi.nlm.nih.gov (15.03.2010r.).

NEB - New England BioLabs: http://tools.neb.com/NEBcutter2 (19.03.2010r.).

Niżnikowski R., Lühken. G., Strzelec E., Lipsky S., Popielarczyk D., Erhard G. and Consorcium ECONOGENE (2006): *PRNP gene polymorphism in 136, 154 and 171 codons in Polish sheep breeds.* Med. Wet. 62: 938-941.

Niżnikowski R. (2009): *Genetyczna odporność na encefalopatie gabczasta u owiec (cz. 1)* Przegl. Hod. 9/2009: 18-21.

Niżnikowski R. (2009a): *Genetyczna odporność na encefalopatie gabczasta u owiec (cz. 2)* Przegl. Hod. 10/2009: 6-10.

Niżnikowski R. (2011): *Hodowla, chów i użytkowanie owiec*. Wydawnictwo Wieś Jutra Sp. z o.o. Warszawa 2011: 21-32, 47.

Nodelijk G., JW. Van Roermund H., JM van Keulen L., Engel B., Vellema P., Hagenaars T.J. (2011): *Breeding with resistant rams leads to rapid control of classical scrapie in affected sheep flock.* Vet. Res. 42 (5): 1-11.

Orge L, Galo A., Machado C., Lima C., Ochoa C., Silva J., Ramos M., Simas J.P. (2004): *Identification of putative atypical scrapie in sheep in Portuga.l* J Gen Virol 85,3487–3491.

Otelea M.R., Zaulet M., Dudu A., Otelea F., Baraitareanu S., Danes D. (2011): *The scrapie genetic susceptibility of some sheep breeds in southeast Romania area and genotype profiles of sheep scrapie infected.* Rom. Biotech. Lett. 16 (4): 6419-6429.

Paludi D., Thellung S., Chiovitti K., Corsaro A., Villa V., Russo C., Ianieri A., Bertsch U., Kretzschmar H.A., Aceto A., Florio T. (2007): *Different structural stability and toxicity of* PrP^{ARR} *and* PrP^{ARQ} *sheep prion protein variants.* J. Neurochem. 103: 2291-2300.

Piestrzyńska-Kajtoch A., Rejduch B. (2006): *Genetyczne aspekty scrapie u owiec.* Med. Wet. 62 (12): 1344-1347.

Piestrzyńska-Kajtoch A., Oczkowicz M., Natonek-Wiśniewska M., Piórkowska K., Kawecka M., Kozubska-Sobocinska A., Knapik J., Krupiński J., Rejduch B. (2009): *Polimorfizm genu PrP owiec w Polsce.* Materiały konferencyjne „Pasażowalne gąbczaste encefalopatie u zwierząt gospodarskich diagnostyka i zapobieganie" Balice 2009: 57-58.

Polak M. P., Żmudziński J. (2000): *Diagnostyka zakaźnych gąbczastych encefalopatii.* Med. Wet. 56 (3): 143-148.

Polak M.P., Rola J. (2005): *Zakażenia subkliniczne w chorobach pionowych.* Med. Wet. 61 (5): 498-499.

Polak M.P., Rola J., Larska M. (2007): *Atypowa postać trzęsawki – nowe wyzwania w diagnozowaniu i zwalczaniu tej choroby.* Mag. Wet. 16 (126): 40-45.

Polak M.P., Żmudziński J.F. (2008): *Diagnostyka trzęsawki małych przeżuwaczy.* Materiały konferencyjne „Encefalopatia gąbczasta mózgu u owiec: genetyczne aspekty scrapie, diagnostyka i program hodowlany". Kraków 2008: 30-35.

Polak M.P., Larska M., Żmudziński J.F. (2009): *Pierwsze przypadki trzęsawki w Polsce.* Materiały konferencyjne Międzynarodowej Konferencji Naukowej „Pasażowalne gąbczaste encefalopatie u zwierząt gospodarskich diagnostyka i zapobieganie. Balice 2009: 47-50.

Polak M.P., Larska M., Langeveld J.P.M., Buschmann A., Groschup M.H., Żmudzinski J.F. (2010): *Diagnosis of the first cases of scrapie in Poland.* Vet. J. 186: 47-52.

Pongolini S., Bergamini F., Iori A., Miliore S., Corradi A., Bassi S. (2009): *Prion protein genotypes of Italian sheep breeds with łysinę-171 and phenyloalanine-141 detection.* Vet. Microbiol. 137: 18-23.

Prusiner S.B. (1982): *Navel proteinaceous infectious particles causa scrapie.* Science 216: 136-144.

Prusiner S.B. (1998): *Prions.* PNAS of the United States of America 95: 13363-13383.

Pruisner S.B. (2004): *Prion Biology and Diseases.* Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York : 1-87, 193-196, 219-222, 484-544; 545-594, 595-600, 715-726.

Rabenau H.F., Cinatl J., Doerr H.W. (2001): *Prions A challenge for Science, Medicine and Public Health System.* S. Karger AG Basel: 7-20, 68-92.

Rejduch B. (2008): *Choroby prionowe.* Materiały konferencyjne „Encefalopatia gąbczasta mózgu u owiec: genetyczne aspekty scrapie, diagnostyka i program hodowlany". Kraków 2008: 17-23.

Rejduch B. Knapik J., Piestrzyńska-Kajtoch A., Kozubska-Sobocińska A., Krupiński J. (2009): *Frequency of genotypes in the PrP prion protein gene locus in the Polish sheep population.* Acta. Vet. Hung. 57 (1): 39-49.

Ridley R.M., Baker H.F. (1995): *Who gets Creutzfeldt-Jakob disease?* BMJ 311: 1419.

Riesner D. (2002): *Molecular basis of prion diseases.* J. Neurovirol. 8: 8-20.

Roden J.A., Nieuwhof G.J., Bishop S.C., Jones D.A., Haresign W., Gubbins S. (2006): *Breeding programmes for TSE resistance in British sheep I. Assessing the impact on prion protein (PrP) genotype frequencies.* Pre. Vet. Med. 73: 1-16.

Rozporządzenie Komisji (WE) NR 260/2003 z dnia 12 lutego 2003 r. zmieniające rozporządzenie (WE) nr 999/2001 Parlamentu Europejskiego w odniesieniu do zwalczania pasażowalnych encefalopatii gąbczastych u owiec i kóz oraz zasad handlu żywymi owcami, kozami i zarodkami bydlęcymi.

Rozporządzenie Komisji (WE) NR 1492/2004 z dnia 23 sierpnia 2004 r.dotyczące zmiany rozporządzenia (WE) nr 999/2001 Parlamentu Europejskiego i Rady Europy, co do środków wyeliminowania pasażowalnej encefalopatii gąbczastej u bydła oraz grupy zwierząt obejmującej owce i kozy, handlu i importu nasienia i embrionów owiec i kóz oraz określonego materiału ryzyka.

Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) NR 999/2001 z dnia 22 maja 2001 r. ustanawiające zasady dotyczące zapobiegania, kontroli i zwalczania niektórych przenośnych gąbczastych encefalopatii.

RCB - Rządowe Centrum Bezpieczeństwa RCB, Wydział Analiz i Prognoz Biura Monitorowania i Analizy Zagrożeń (2010): *Zagrożenia okresowe występujące w Polsce.* 2010: 36-38.

Salwa A., Iwanicki A. (2004): *Postęp w badaniach nad barierą gatunkowa w chorobach prionowych u ludzi i zwierzat.* Med. Wet. 60 (1): 17-20.

Schneider K., Fangerau H., Michaelsen B., Raab W.H.-M. (2008): *The early history of the transmissible spongiform encelophalopathies exemplified by scrapie.* Brain Res. Bull. 77: 343-355.

Seabury C.M. i Derr J.N. (2003): *Identification of a novel ovine PrP polymorphism and scrapie-resistant genotypes for St. Croix White and a related composite breed.* Cytogenet. Genome. Res. 102: 85-88.

Simmons H.A., Simmons M.M., Spencer Y.I., Chaplin M.J., Povey G., Davis A., Ortiz-Pelaez A., Hunter N., Matthews D., Wrathall A.E. (2009): *Atypical scrapie in sheep from UK research flock whitch is free from classical scrapie.* Vet. Res. 5: 8.

Simmons M.M., Konold T., Thurston L., Bellworthy S.J., Chaplin M.J., Moore S.J. (2010): *The natural atypical scrapie phenotype is preserved on experimental transmission and sub-passage in PRNP homologous sheep.* Vet. Res. 6: 14.

Sipe J.D., Cohen A.S. (2000): *Review; History of the amyloid fibril.* J. Struct. Biol. 130: 88-98.

Sisó S., Jeffrey M., Steele P., McGovern G., Martin S., Finlayson J., Chianini F., González L. (2008): *Occurrence and cellular localization of PrP^{d} in kidneys of scrapie-affected sheep in the absence of inflammation.* J. Pathol. 215: 126-134.

Słomski R. (2004): *Przykładay analizy DNA.* Wydawnictwo Akademii Rolniczej im. Augusta Cieszkowskiego w Poznaniu.

Smołucha G., Gurgul A., Piestrzyńska-Kajtoch A., Rejduch B. (2012): *Adaptation of primer extension method for monitoring of scrapie-associated genotypes in sheep PRNP gene.* Anim. Sci. Pap. Rep. 30 (2): 1251-158.

Sołtysiak Z., Barcikowska M. (2002): *Podobieństwa i różnice chorób pionowych, choroby Alzheimera i starczej beta-amyloidozy mózgu zwierząt.* Med. Wet. 58 (10): 744-749.

Strzelec E., Niżnikowski R. (2004): *„Pasażowalna encefalopatia gąbczasta (scrapie) u małych przeżuwaczy.* Przegl. Hod. 5: 15-18.

Strzelec E., Niżnikowski R. (2004a): *Model pracy hodowlanej Prowadzonej w kierunku zwiększenia genetycznej odporności na scrapie w Holandii.* Przegl. Hod. 7: 14-19.

Szkudlarek-Kowalczyk M., Rawska A., Wiśniewska E., Milewski S., Mroczkowski S. (2009): *Polimorfizm genu białka prionowego w populacji owiec rasy kamienieckiej.* Materiały konferencyjne „Pasażowalne gąbczaste encefalopatie u zwierząt gospodarskich diagnostyka i zapobieganie" Balice 2009: 65-66.

Szkudlarek-Kowalczyk M., Wiśniewska E., Milewski S., Mroczkowski S. (2010): *Prion protein gene (PRNP) polymorphism in a flock of sheep of Kamieniecka breed.* Bull. Vet. Inst. Pulawy 54: 645-649.

Tan B.C., Blanco A.R., Houston E.F., Stewart P., Goldmann W., Gill A.C., de Wolf C., Manson J.C., MC151Cutcheon S. (2012): *Significant differences in incubation times in sheep infected with bovine spongiform encephalopathy result from variation at codon 141 in the* PRNP *gene.* J Gen Virol 93: 2749-2756.

Thorogeirsdottirr S., Sigurdarson S., Thorisson H.M., Georgsson G., Palsdottir A. (1999): *PrP gene polymorphism and natural scrapie in Icelandic sheep.* J. Gen. Virol., 80: 2527–2534.

Tranulis M.A., Osland A., Bratberg B., Ulvund M.J. (1999): *Prion protein gene polymorphisms in sheep with natural scrapie and healthy controls in Norway.* J. Gen. Virol. 80: 1073-1077.

Tranulis M.A. (2002): *Influence of the prion protein gene, Prnp on scrapie susceptibility in sheep.* APMIS 110; 33-43.

Turu M., Slevin M., Ethirajan P. Luque A., Elasbali A., Font A., Gaffney J., Cairols M., Kumar P., Kumar S., Krupiński J. (2008): *The normal cellular prion protein and its possible role in angiogenesis.* Front Biosci. 13: 6491-6500.

Ün C., Oztabak K., Ozdemir N., Akis I., Mengi A. (2008): *Genotyping of PrP gene in native Turkish sheep breeds.* Small Rum. Res. 74: 260-264.

Vaccari G., Petraroli R., Agrimi U., Eleni C., Perfetti M.G., Di Bari M.A., Morelli L., Ligios C., Busani L., Nonno R., Di Guardo G. (2001): *PrP genotype in Sarda breed sheep and its relevance to scrapie.* Arch. Virol. 146: 2029-2037.

Vaccari G., D`Agostino C., Nonno R., Rosone F., Conte M., Di Bari M.A., Chiappini B., Esposio E., De Grossi L., Giordani F., Marcon S., Morelli L., BoR151Roni R., Agrimi U. (2007): *Prion protein alleles showing a protective effect on the sysceptibility of sheep to scrapie and bovine spongiform encephalopathy.* J. Virol. 81 (13): 7306-1309.

Vascellari M., Aufiero G.M., Nonno R., Agrimi U., Vaccari G., Basilicata L., Falcaro C., Mancin M., Marcon S., Mutinelli F. (2005): *Diagnosis and PrP genotype target of scrapie in clinically healthy sheep of Massese breed in the framework of a scrapie eradication programme.* Arch. Virol. 150: 1959-1976.

Vašíček D., Bauer M., Oravacowá M., Vašíčková K. (2010): *Evaluation of haplotype frequencies of ovine PRNP gene in subpopulation of Valachian breed in Slovakia.* Acta Fytotechnica et Zootechnica (online) Mimoriadne – Special 13: 77-79.

Vašíčková K. i Vašíček D. (2010): *Detection of ovine prion protein polymorphism in codons 136, 154 and 171 by PCR-Primer Introduced Restriction Analysis.* Slovak J. Anim. Sci. 43: 40-44.

Vincze T., Posfai j., Roberts R.J. (2003): *NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes.* Nucleid Acids Res. 31: 3688-3691.

Wickner R.B. (1997): *Prion disease of mammals and yeart. Molecular mechanisms and genetic features.* Springer-Verlag, Heidelberg, Germany.

Wierzbicka A., Deptuła W. (2008): *Rola układu odpornościowego w patogenezie chorób prionowych..* Postępy Hig. Med. Dosw. (online) 62: 166-173.

Wiśniewska E., Lühken G., Mroczkowski S., Erhard G. (2006): *Prion protein (PrP) gene polymorphisms and breeding for resistance to scrapie in Polosh Merino sheep.* Arch Tierz 49: 365-371.

Wiśniewska E., Mroczkowski S. (2009): *Scrapie, choroba prionowa owiec.* Materiały konferencyjne Współczesne wyzwania hodowli i Chowu zwierząt, Bydgoszcz: 55-75.

Wiśniewska E., Portolano B., Mroczkowski S. (2009): *Związek polimorfizmu genu białka prionowego z wybranymi cechami produkcyjnymi owiec.* Materiały konferencyjne „Pasażowalne gąbczaste encefalopatie u zwierząt gospodarskich diagnostyka i zapobieganie" Balice 2009: 63-64.

Wiśniewska E., Piwczyński D., Mroczkowski S. (2010): *Microsatellite polymorphisms in the ovine prion protein gene in relation to PRP genotypes.* Bull. Vet. Inst. Pulawy 54: 705-711.

Wooldridge M.J.A., Wood J. (1991): *Some aspects of scrapie epidemiology in the goat.* Vet. Soc. J. 12: 4-7.

Wopfner F., Weidenhöfer G., Schneider R., Brunn A., Gilch S., Schwarz T.F., Werner T., Schätzl H.M. (1998): *Analysis of 27 mammalian and 9 avian PrPs reveals high conservation of flexible regions of the prion protein.* J. Mol. Biol. 289:1163-1178.

Woźna A. (2009): *Wpływ obecności atomu siarki tioeterowej w łańcuchu bocznym na właściwości kompleksujące wybranych fofonowych pochodnych dipeptydów w stosunku do jonów miedzi(II), niklu(II) I palidu(II).* Rozprawa doktorska, Akademia Podlaska: 7.

Zhang L., Li N., Fan B., Fang M., Xu W. (2004): *PRNP polymorphisms in Chinese ovine, caprine and bovine breeds.* Anim. Genet. 35: 457-461.

Zhou H., Hickford J.G.H., Fang Q. (2005): Technical Note: *Determination of alleles of the ovine PRNP gene using PCR–single-strand conformational polymorphism analysis*. J. Anim. Sci. 83, 745-749.

Strony internetowe:

http://rna.lundberg.gu.se/cutter2 (19.03.2010r.).

Praca powstała z wykorzystaniem aparatury zakupionej w ramach projektu „Realizacja II etapu Regionalnego Centrum Innowacyjności" współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Regionalnego Programu Operacyjnego Województwa Kujawsko-Pomorskiego na lata 2007-2013.

Badania zostały sfinansowane ze stypendium otrzymanego w ramach projektu „Stypendia dla doktorantów 2008/2009-ZPORR" – działania 2.6 ZPORR, nr projektu Z/2.04/II/2.6/20/09 finansowanego w 75% ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego Unii Europejskiej oraz w 25% ze środków Budżetu Państwa.

Prof. dr hab. Roman Niżnikowski

Opinia

o rozprawie doktorskiej Agnieszki Magdaleny Markowskiej pt.: "Polimorfizm genu białka prionowego owiec w kodonach 127, 141, 151, 171 i 189"

Problematyka encefalopatii gąbczastej u różnych gatunków zwierząt oraz u człowieka jest tematem wielu rozważań, ze względu na uwarunkowania genetyczne tych jednostek chorobowych oraz poszukiwaniem możliwości obronnych przed ich skutkami. W przypadku owiec znane są dwie formy takiej encefalopatii pasażowalnej określane jako trzęsawka klasyczna i atypowa. W odniesieniu do formy trzęsawki klasycznej dopracowano się już wykorzystywanych w prawodawstwie Unii Europejskiej rozwiązań, wymuszających pracę hodowlaną zmierzająca do wyboru i pozostawiania do dalszej hodowli czy chowu zwierząt opornych genetycznie na stany kliniczne. W razie wystąpienia choroby w stadzie, grozić mu może nawet likwidacja, stąd genotypowanie zmierzające do wykorzystania go przy opracowaniu programów hodowlanych, jest bardzo potrzebne. Za reprezentatywne uważa się kodony 136, 154 i 171 w przypadku uwarunkowań genetycznych trzesawki klasycznej. Co innego, jeżeli wystąpi forma atypowa trzęsawki w stadzie. W takim przypadku w prawodawstwie Unii Europejskiej oparto się o kodon 141 i testowanie stosownych zmian w tym miejscu. W odniesieniu do stwierdzenia formy klinicznej trzęsawki atypowej, stado jest poddawane dwuletniemu okresowi obserwacji zwierząt i możliwością ich obrotu w tym czasie tylko na rynku krajowym.

Autorka rozprawy poświęca temu problemowi wiele uwagi, dyskutując w swojej pracy wyniki 174 publikacji krajowych i zagranicznych oraz 1 linku internetowego, bardzo dobrze naświetlając tematykę trzęsawki wynikającej z cytowanych wyników opracowań. Od strony biologicznej jest to materiał ciekawy, tym bardziej że zderzamy się nie tylko z materiałem dotyczącym uwarunkowań genetycznych ale również aspektów etiologicznych, klinicznych czy praktycznych charakteryzujących problematykę trzesawki bardzo szeroko i dokładnie. Na tej podstawie przyjęto w pracy cel dokładnego zbadania polimorfizmów trzęsawki na podstawie zmian ocenianych w pięciu kodonach. Spośród wymienionych wyżej – forma trzęsawki klasycznej została zaznaczona przyjęciem do badan porównawczych testowania zmian w kodonie 171, natomiast biorąc pod uwagę znane z literatury powiązania formy atypowej – zmiany w kodonie 141. Pozostałe miejsca określone w kodonach 127, 151 i 189 zostały wybrane przez Autorkę, celem rozszerzenia wiedzy na temat polimorfizmów trzęsawki określanych właśnie w tych miejscach, mimo że znanych jest jeszcze wiele innych miejsc które uważane są za determinujące różne postaci uwarunkowania genetycznego białka prionowego u owiec. Analizując bogato przedstawiony materiał literaturowy, brakuje mi wyjaśnienia, dlaczego wybrano właśnie te miejsca określania polimorfizmów (127, 151 i 189), a nie inne, których w cytowanej literaturze opisanych jest bardzo dużo. Poszukując np. dokładniejszej definicji uwarunkowań np. trzęsawki atypowej owiec, warto ocenić wiele miejsc.

Daje to możliwość poszukiwań związków z stanami klinicznymi od strony genetycznej, co znacząco powinno poprawić możliwości prowadzenia racjonalnej pracy hodowlanej. W dalszej części opinii biorąc pod uwagę fakt, że nie jestem genetykiem, postaram się w swoich rozważaniach odnieść głównie do aspektów hodowlanych.

Zarówno materiał jak i przejęta metodologia nie budzi zastrzeżeń. Przywiązano znaczącą uwagę do ras owiec występujących w trzech regionach Europy, co należy uznać za słuszne. Oczywistym jest, że w poszczególnych państwach prowadzone są programy hodowlane uwzględniające elementy środowiska, tradycji czy przyjętego kierunku produkcyjnego. Mnogość takich elementów wpływać może w oczywisty sposób na frekwencję uwarunkowań oraz ich liczbę. W pracach badawczych dotyczących monitoringu trzęsawki u prawie pięćdziesięciu ras owiec hodowanych w różnych krajach na terenie całej Europy w ramach pro projektu ECONOGENE wykazano na przykład, że polscy hodowcy mieli dobrą rękę w pracy hodowlanej, ze względu na sporadyczne występowanie negatywnych uwarunkowań trzęsawki klasycznej, np. w porównaniu do ras owiec ocenianych w Niemczech, Hiszpanii czy Wielkiej Brytanii, mimo braku określania genotypów trzęsawki przed 2002 rokiem. Dlatego ujęcie grup ras owiec w trzech regionach Europy uważam za bardzo ciekawe. Metodologia pobierania i obróbki materiału biologicznego też została wykonana według przyjętych w opracowaniach tego typu metod. Również liczba zwierząt wykorzystanych w badaniach spełnia kryteria pracy eksperymentalnej tego typu. Szkoda, że nie przeprowadzono opracowań statystycznych, choćby przy wykorzystaniu nieparametrycznych testów oceny frekwencji występowania badanych uwarunkowań w odniesieniu do ocenianych ras czy regionów Europy. Bez opracowań tego typu praca ma charakter bardziej biologiczno-przyrodniczy, co wpływa na opis wyników, które w opiniowanej rozprawie ze względu na ich dużą ilość zmuszają do wnioskowania tylko na podstawie zestawień. Autorka zresztą podołała również temu zadaniu.

Wyniki badań w odniesieniu do frekwencji występowania poszczególnych alleli przedstawiono w formie opisu uwarunkowań białka prionowego w poszczególnych kodonach. Dało to możliwość śledzenia zmian w zależności od rasy czy regionu. W każdej grupie polimorfizmów uzyskane wyniki były bardzo szczegółowo przedyskutowane z danymi literaturowymi. W odniesieniu do polimorfizmu białka prionowego określanego w kodonie 127, bardzo interesująco wygląda zestawienie uzyskanych wyników w porównaniu do uzyskanych przez innych autorów badających w tym zakresie owce azjatyckie, wskazując na ich znaczącą odrębność w odniesieniu do owiec utrzymywanych w Europie. Charakterystyka ta jest tym ciekawsza, że w tym miejscu u badanych zwierząt nie stwierdzono stosownych polimorfizmów. Za bardzo ciekawy uważam opis i dyskusje wyników dotyczących polimorfizmów białka prionowego w kodonie 141, a więc w miejscu uważanym w znaczącej mierze jako informatywne w zakresie atypowej formy trzęsawki. Na podstawie wyników badań przeprowadzonych przez innych autorów dowiadujemy się, że allel L jest wiązany z mniejszą częstotliwości występowania stanów klinicznych aniżeli allel F. Również uzyskujemy informację, że w niektórych układach alleli atypowa forma trzesawki występować może bez względu na obecność w genotypie allelu L czy F. Ta mnogość kombinacyjna umożliwia przedyskutowanie wyników własnych na tle literatury w bardzo szerokim zakresie i prowadzi do określonych wniosków. W kodonie 151 wykazano największy polimorfizm białka prionowego wyrażający się przewagą częstotliwości występowania allelu R w zestawieniu z C u wszystkich ras owiec. Na większe różnice wskazano pomiędzy badanymi rasami w tym zakresie, szczególnie w Polsce, w zestawieniu z rasami badanymi na Słowacji i we Włoszech. Natomiast w kodonie 171, wykorzystywanym w diagnostyce genetycznej trzęsawki klasycznej dyskutowano nad znacznie większym zróżnicowaniem badanych polimorfizmów u owiec azjatyckich aniżeli europejskich, co należy uznać za ciekawy efekt prowadzonych badań. Stosunkowo najkrótsza dyskusja dotyczyła polimorfizmu genu białka prionowego w kodonie 189.

Na podstawie uwarunkowań stwierdzonych we wszystkich kodonach wykazano trzy allele występujące z różną częstotliwością oraz pięć genotypów. Dzięki temu uznano, że największe zróżnicowanie genetyczne występuje u owiec utrzymywanych na Słowacji, w porównaniu do Polski i Włoch. Z przeprowadzonych badań wyciągnięto szereg podsumowań odnoszących się do poszczególnych etapów badań, wskazując na brak polimorfizmów białka prionowego w kodonach 127 i 189 oraz największe zróżnicowanie w kodonie 151. Za ciekawy uznać należy wniosek dotyczący mutacji wykrytych w kodonie 171 co łączyć się może z mylnym odczytywaniem wyników oznaczeń. Uwarunkowania stwierdzone w kodonie 141, oceniane jako najbardziej reprezentatywne dla postaci atypowej trzęsawki, powinno być włączone do rutynowego genotypowania.

Biorąc pod uwagę fakt, że w naszym kraju coraz częściej podawane są informacje o znalezieniu klinicznej formy trzęsawki atypowej, warto pokusić się o zalecenie dla praktyki dotyczące wprowadzenia np. obowiązku genotypowania takich stad, w których postać ta została stwierdzona. Również genotypowanie trzęsawki u sztuk z potwierdzonym stanem klinicznym warto zalecić jako obligatoryjne, ze względu na potrzebę określenia genotypu zainfekowanych zwierząt. Osiągnąć w ten sposób będzie można własną bazę danych z tego zakresu, której jak mi wiadomo dotychczas nie utworzono. Podniesiony w tym miejscu problem uważam za dobry materiał do zainicjowania dyskusji na w tym zakresie.

Z uwag o charakterze redakcyjnym proponuje ujednolicić nazewnictwo jednostki chorobowej, której dotyczy rozprawa. Autorka bardzo często posługuje się nazwą angielska - scrapie oraz polską – trzęsawka. Warto tą sprawę ujednolicić w zależności od tego do wydawnictwa jakiego charakteru zostanie wysłana celem opublikowania.

Powyższe uwagi nie obniżają wartości rozprawy doktorskiej Autorki, którą oceniam bardzo wysoko. Biorąc powyższe pod uwagę stwierdzam, że rozprawa spełnia warunki określone w Ustawie o tytule i stopniach naukowych i na tej podstawie występuję z wnioskiem do Wysokiej Rady Wydziału Hodowli i Biologii Zwierząt Uniwersytetu Technologiczno-Przyrodniczego w Bydgoszczy o dopuszczenie Pani Agnieszki Magdaleny Markowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Warszawa, 18 października 2013 roku.

Dr hab. Urszula Kaczor

Katedra Hodowli Trzody Chlewnej i Małych Przeżuwaczy

Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt

Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr inż. Agnieszki Magdaleny Markowskiej

pt. „**POLIMORFIZM GENU BIAŁKA PRIONOWEGO OWIEC W KODONACH 127, 141, 151, 171 i 189**"

wykonanej w Zakładzie Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt

Uniwersytetu Przyrodniczo-Technologicznego w Bydgoszczy

pod kierunkiem prof. dr hab. Sławomira Mroczkowskiego

Pasażowalne gąbczaste encefalopatie to grupa zwyrodnieniowych chorób ośrodkowego układu nerwowego ludzi oraz zwierząt. Choroby te objawiają się zaburzeniami koordynacji, otępieniem i nieuchronnie prowadzą do śmierci. Polimorfizm genu białka prionowego *PRNP*, a w efekcie zmiana aminokwasów w kodowanym przez ten gen białku, został powiązany w wielu badaniach prowadzonych na całym świecie, z wrażliwością owiec na typową postać encefalopatii - scrapie (trzęsawkę). Za rozwój choroby odpowiedzialny jest czynnik zakaźny – prion a jedyną bronią w walce ze scrapie jest selekcja zwierząt i uzyskanie osobników opornych na zachorowanie. W genie białka prionowego (*PRNP*) wykryto polimorfizmy oraz ciche mutacje punktowe w ponad trzydziestu kodonach. Analizując polimorfizm w kodonach A136V, R154H i Q171R/H wyodrębnia się dwanaście alleli, z których u ras europejskich pojawia się siedem, warunkujących 15 podstawowych genotypów. Za najbardziej korzystny genotyp przyjmuje się genotyp $A_{136}R_{154}R_{171}$/ $A_{136}R_{154}R_{171}$. W większości krajów europejskich opracowano projekty mające na celu zmniejszenie występowania u owiec alleli niekorzystnych, ich celem jest kwalifikacja owiec do 5 grup o różnym ryzyku zachorowania na typową scrapie. Jednak pojawienie się i opisanie atypowej postaci scrapie Nor98, postawiło przed naukowcami kolejny problem badawczy i uświadomiło, jak niewiele wiemy o tej chorobie. Wykazano, że osobniki o genotypach

należących do klas opornych na scrapie są podatne na Nor98 i powiązano polimorfizm *PRNP* w kodonie 141 z podatnością/opornością na zachorowanie.

Recenzowana praca doktorska dotyczy identyfikacji polimorfizmu w pięciu kodonach genu *PRNP* u 9 ras i mieszańców owiec. Badania przeprowadzono u 424 owiec z Polski, Słowacji i Włoch. Zaplanowany zakres eksperymentu uznać należy za wystarczający, a tematyka podjętych badań jest aktualna i potrzebna. Autorka wytypowała do badań regiony genu *PRNP* o mało poznanej zmienności szczególnie u ras europejskich. Uważam, że wybór tematu pracy doktorskiej jest uzasadniony tak względami poznawczymi jak i praktycznymi.

Autorka podzieliła swoją pracę, liczącą 89 stron, na następujące rozdziały: *Wstęp i cel*, *Przegląd literatury*, *Materiał i metody*, *Wyniki i dyskusja, Podsumowanie i wnioski, Piśmiennictwo*. Zastosowany podział na rozdziały i podrozdziały jest logiczny i klarowny, co znacznie ułatwia śledzenie wywodów i w sposób wygodny dla czytelnika porządkuje zawarte w pracy treści. Zamieszczenie w tekście pracy wyników w 10 tabelach, poparte 6 rycinami oraz 5 wykresami jest prawidłowe. W pracy cytowane jest 167 publikacji naukowych (w większości w języku angielskim) oraz nielicznych, najnowszych podręczników obejmujących zagadnienia poruszane w przestawionej do recenzji rozprawie. W dysertacji zamieszczono też krótkie streszczenie w językach polskim i angielskim. Układ pracy jest typowy dla tego typu opracowań i nie budzi zastrzeżeń.

Rozdział *Wstęp* zawiera informacje uzasadniające podjęte badania, dotyczące identyfikacji polimorfizmów w genie *PRNP* u owiec ras krajowych, Słowacji i Włoch. Zaprezentowano w nim syntetyczne wprowadzenie do tematu i wyjaśniono zasadność podjętych badań w obrębie sekwencji kodonów 127, 141, 151, 171 i 189. W ostatniej dekadzie podejmowano w Polsce badania przesiewowe mające na celu rozpoznanie rozkładu genotypów w *locus* genu *PRNP* u wielu ras krajowych, jednak nie przeprowadzono takich badań w odniesieniu do 3 pierwszych kodonów zaproponowanych przez Doktorantkę. Na podkreślenie zasługuje podjęcie próby określenia obecności rzadko spotykanej u europejskich ras owiec leucyny w kodonie 171. *Wstęp* pracy zakończono zwięźle sformułowanym celem. W kwestii omawianego podrozdziału uwaga recenzenta dotyczy uzasadnienia wyboru przez Autorkę kodonów 127 i 189 z 30 znanych u owiec polimorficznych kodonów wobec faktu braku jego związku z wrażliwością na scrapie.

Na uwagę zasługuje rozdział *Przegląd literatury,* w którym Autorka na 20 stronach maszynopisu zacytowała prace bezpośrednio związane z tematem rozprawy. Zdaniem

recenzenta pierwsze 12 stron stanowi podręcznikowe, ale na poziomie akademickim, przypomnienie wiedzy z zakresu etologii encefalopatii gąbczastych ludzi i zwierząt, budowy białka prionowego i jego funkcji oraz znanych teorii prionu, poszerzone o najnowsze wyniki badań naukowych. Ostatnie osiem stron to charakterystyka genu kodującego białko prionowe z wykazaniem u owiec olbrzymiej zmienności w badanym genie. Jeśli taka obszerny rozdział ma stanowić kompendium wiedzy to Doktorantka doskonale wywiązała się ze swojej roli.

Kolejny rozdział rozprawy obejmuje opis materiału badawczego i użytych metod. Badaniami objęto 9 ras i mieszańców. Z krajowych ras analizowano zmienność u owiec wrzosówka, ile de france, kamieniecka. Populacja badana w Słowacji to owce francuskiej rasy lacaune, cigaja oraz mieszańce zošľachtená valaška x lacaune i lacaune x cigaja. Natomiast we Włoszech przebadano rasy apennine i apennine x merynos derivertia. Uwaga recenzenta dotyczy nie precyzyjnego określenia płci zwierząt oraz uzasadnienia wyboru właśnie tych a nie innych ras w poszczególnych krajach. Czy na dobór ras i krajów złożyła się tylko konieczność zróżnicowania materiału badawczego? Natomiast zamieszczenie uwagi o systemie utrzymania zwierząt w odniesieniu do rasy apennine użytkowanej we Włoszech uważam za dyskusyjne. W rozdziale brak jest zamieszczenia informacji czy stada, z których pobrano materiał biologiczny, były wolne od scrapie. Taką informację znajdujemy dopiero na str. 48 w rozdziale *Wyniki i dyskusja*. W podrozdziale *Metody* Doktorantka opisała i dobrała właściwe metody oznaczania polimorfizmu *PRNP*. Domyślam się, że większość z nich Doktorantka wykonała samodzielnie, co podkreśliłoby Jej dodatkowy atut – opanowanie trudnych technik laboratoryjnych. Przyjęta metoda badawcza PCR-RFLP tzn. użycie 5 enzymów restrykcyjnych jest jak najbardziej uzasadniona. Czy jednak zważając na otrzymanie trudnych do rozdziału i odczytu produktów trawienia nie powinno się założyć użycia wybiórczo metody sekwencjonowania? Rozumiem, że jest to dość droga analiza jednak może być stosowana tylko w odniesieniu do reprezentatywnej liczby prób, jako metoda potwierdzająca prawidłowość przeprowadzonych oznaczeń metodą RFLP. W opisie zastosowanych reakcji amplifikacji fragmentów genu *PRNP* proszę o uściślenie opisu mieszaniny reakcji PCR – koncentracje końcowe podanego chlorku magnezu i dNTP (str. 54). Również przedstawiony opis metody RFLP (str. 36) nie jest dość przejrzysty (wiersze 21-25). Autorka na tej samej stronie podaje jakie enzymy wykorzystano do trawienia sekwencji w poszczególnych kodonach. Do identyfikacji zmienności w kodonie 127 wykazuje enzym *Hae*III ale w rozdziale *Wyniki i dyskusja* uzyskujemy informację o dodatkowym trawieniu produktów PCR enzymem *Ava*II w celu odróżnienia genotypów m.in. V127V od S127S.

Dokładność zapisu tych reakcji jest wymagana w tego typu opracowaniach. Rozdział *Materiał* i *metody* Autorka zakończyła informacją o wyliczeniu frekwencji alleli i genotypów z uwzględnieniem rasy i kraju pochodzenia zwierząt. Należałoby rozważyć zasadność oszacowania różnic wykazanego rozkładu w polimorficznym kodonie 151 znanymi metodami statystycznymi. W rozdziale *Wyniki* i *Dyskusja* oczekiwałam porównania i interpretacji wyników własnych Autorki w odniesieniu do danych literaturowych. Doktorantka bardzo wnikliwie takie porównanie przeprowadziła odwołując się do rezultatów uzyskanych u ras owiec praktycznie z wszystkich rejonów świata. Wykazała, że cała tak zróżnicowana badana populacja była jednak monomorficzna w kodonach 127 i 189. Wykryto homozygoty odpowiednio: G127G oraz Q189Q. Doktorantka zidentyfikowała w kodonie 141 obecność polimorfizmu przede wszystkim u występującej w Słowacji rasy cigája, w której zidentyfikowano allel F z frekwencją 0,233. Wszystkie badane rasy owiec z Polski i Włoch oraz pozostałe zwierzęta ze Słowacji były homozygotami L141L. Nie wykryto także mutacji warunkującej powstanie, pojawiającego się przede wszystkim u owiec ras azjatyckich, aminokwasu lizyny w kodonie 171. Natomiast kodonem najbardziej polimorficznym okazał się kodon 151, w którym wykryto SNP odpowiedzialny za kodowanie cysteiny lub argininy. Cysteina wystąpiła u 11,39 % owiec ras krajowych, 4,27 % zwierząt ze Słowacji oraz 2,46 % badanych owiec z Włoch. Haplotypy te wystąpiły w trzech możliwych układach, przy czym najczęściej identyfikowano R151R (frekwencja 83,02 %). W ostatnim podrozdziale 6.6 analizując u wszystkich zwierząt 5 badanych kodonów Autorka potwierdziła obecność jedynie 3 alleli : - $G_{127}L_{141}R_{151}X_{171}Q_{189}$ (90,45 %), $G_{127}L_{141}C_{151}X_{171}Q_{189}$ (8,61%) oraz - $G_{127}F_{141}R_{151}X_{171}Q_{189}$ (0,94 %), tworzących pięć genotypów: GLRXQ/GLRXQ (82,08%), GFRXQ/GFRXQ (0,71%), GLCXQ/GLCXQ (0,47%), GLRNQ/GLCNQ (16,27%) i GLRNQ/GFRNQ (0,47%).

Rozdział *Wyniki* i d*yskusja* obejmujący 30 stron maszynopisu został podzielony na podrozdziały adekwatnie do omawianych polimorfizmów, co znacznie ułatwiło prześledzenie omówienia wyników. Z dużym zainteresowaniem przeczytałam najobszerniejszy podrozdział 6.2 pt. „Polimorfizm w kodonie 141", ponieważ w stosunkowo niewielkim stopniu był on dotychczas badany u owiec w kraju. Autorka wyczerpująco porównała w nim wyniki badań własnych z wynikami prac innych badaczy, posiłkując się trafnie dobranym, licznym i aktualnym piśmiennictwem. Zastosowanie enzymu restrykcyjnego *Mnl*I potwierdziło wyniki wysokiej frekwencji allelu L, warunkującego odporność owiec na atypową postać scrapie, u ras krajowych i obecność przede wszystkim homozygot L141L. Wynik ten przy realnym

zagrożeniu pojawienia się u owiec Nor98 zasługuje na uwagę. Należy w tym miejscu podkreślić przytoczone przez Autorkę spostrzeżenia, że u owiec z Nor98, niewykazujących klinicznych objawów scrapie, wykryto genotypy zarówno L141L jak i F141L. Potwierdza to konieczność identyfikacji polimorfizmu w kodonie 141 z uwzględnieniem zmienności w podstawowych kodonach 136, 154 i 171 lub innych i zwrócenia uwagi na genotypy np. AFRQ/AFRQ i AFRQ/ALHQ. W odniesieniu do kodonu 151 stwierdzono polimorfizm pojedynczego nukleotydu warunkujący zarówno kodowanie cysteiny oraz argininy. Homozygoty R151R wystąpiły z najwyższą częstością, natomiast homozygoty C151C wykryto tylko u owiec utrzymywanych na Słowacji i w Polsce. Wynik ten jest interesujący, ponieważ polimorfizm ten może mieć powiązanie z wrażliwością na scrapie.

Rozdział *Podsumowanie* i *wnioski* jest bardzo ważnym rozdziałem w każdej publikacji naukowej. W związku z tym, każdy wniosek powinien być sformułowany, jednoznacznie, precyzyjnie i czytelnie. Autorka w syntetycznej formie 9 punktów podsumowujących lub raczej stwierdzeń podała najważniejsze rezultaty opisywanego eksperymentu. Zdaniem recenzenta najważniejszym, będącym wynikiem przemyśleń i rezultatem wykonywanych samodzielnie przez Autorkę analiz jest punkt IX. Doktorantka zawarła w nim uwagi odnośnie możliwości nieprawidłowości odczytu alleli w kodonie 171. Jest to cenna uwaga metodyczna do ewentualnego wykorzystania w innych laboratoriach. Autorka wykazała największe zróżnicowanie i obecność wszystkich zidentyfikowanych genotypów u owiec ze Słowacji. Uważam, że punkty II i III podsumowania powinny zostać połączone, ponieważ stwierdzenie że np. nie wykryto mutacji warunkującej pojawienie się w kodonie 127 aminokwasu waliny lub seryny oznacza, że populacja była monomorficzna i występowała w tym kodonie glicyna.

Wniosek końcowy stanowi rozbudowany ciąg 4 wywodów, w pełni nawiązujących do sformułowanego celu pracy i mających uzasadnienie w przeprowadzonych badaniach. W związku z wykazaniem polimorfizmu w kodonie 151 Autorka wskazała na konieczność rozszerzenia badań na inne rasy i sprawdzenie wpływu wskazanego polimorfizmu na wrażliwość owiec ras krajowych na scrapie klasyczne i Nor98. Ponieważ wnioski zamieszczone w pracy powinny opierać się przede wszystkim na wynikach przeprowadzonych badań, dlatego też sugeruję usunąć z tej części rozdziału zdanie „W związku z opisaniem Nor98 oraz powiązaniem wpływu polimorfizmu w kodonie 141 na atypową postać trzęsawki należy włączyć genotypowanie w tym triplecie do rutynowo przeprowadzanych badań".

Uwagi szczegółowe

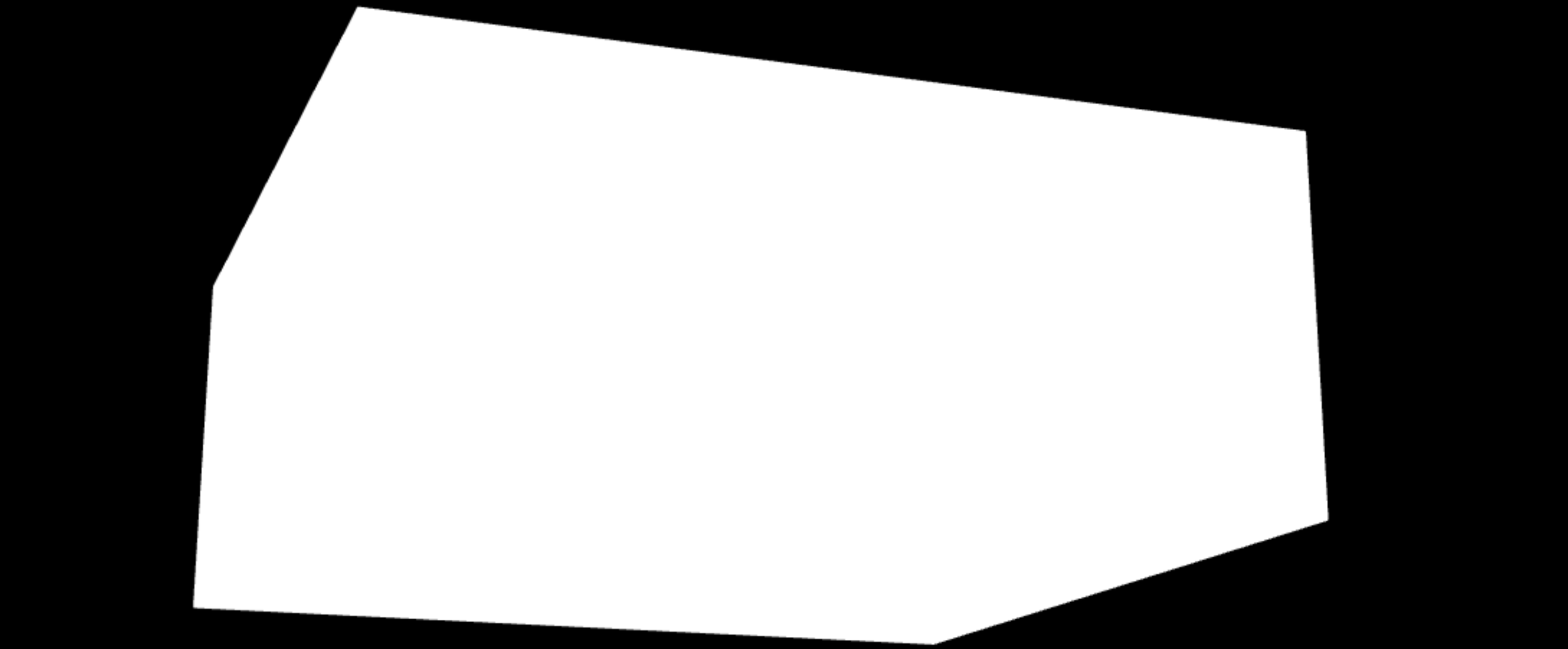
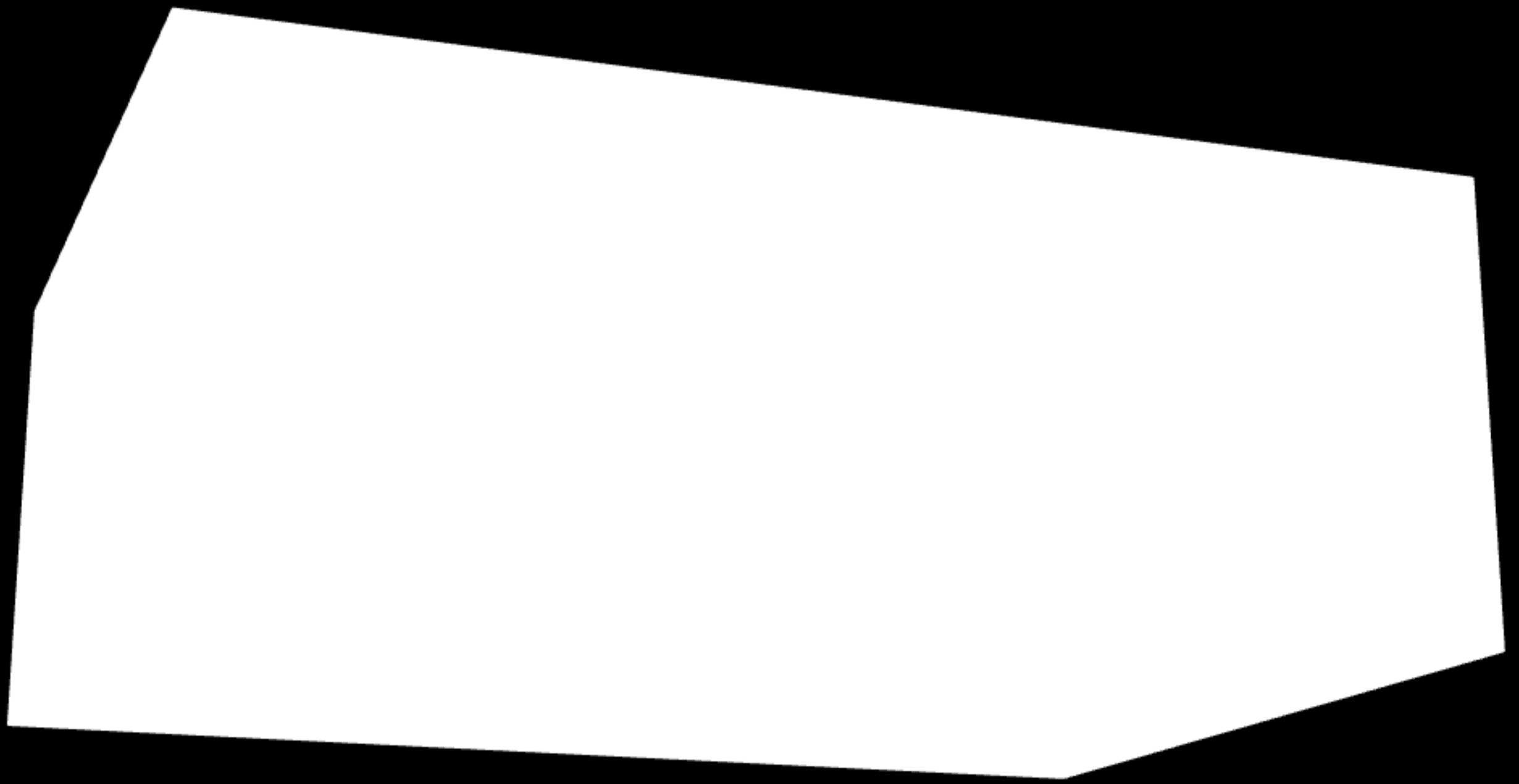
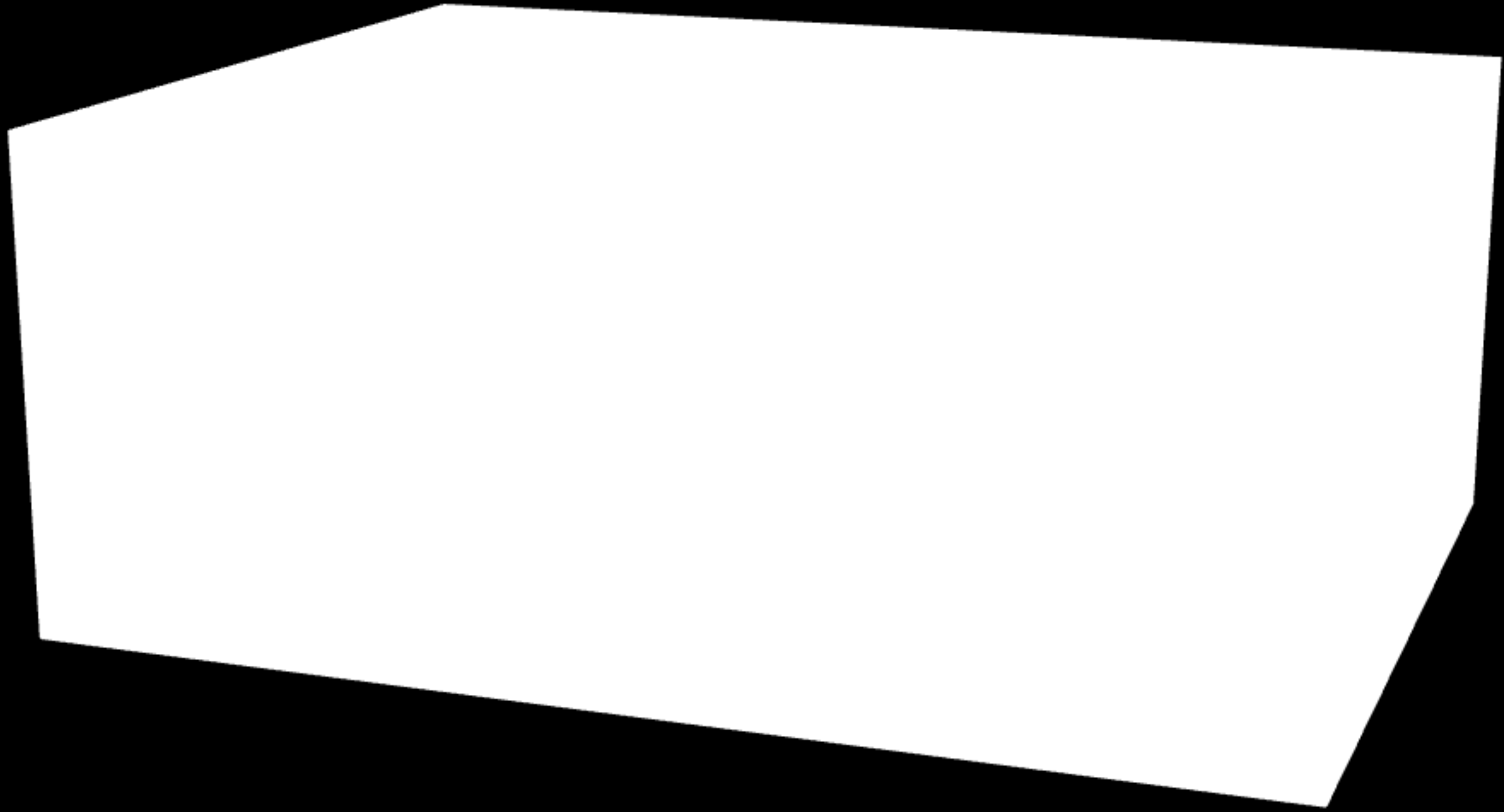
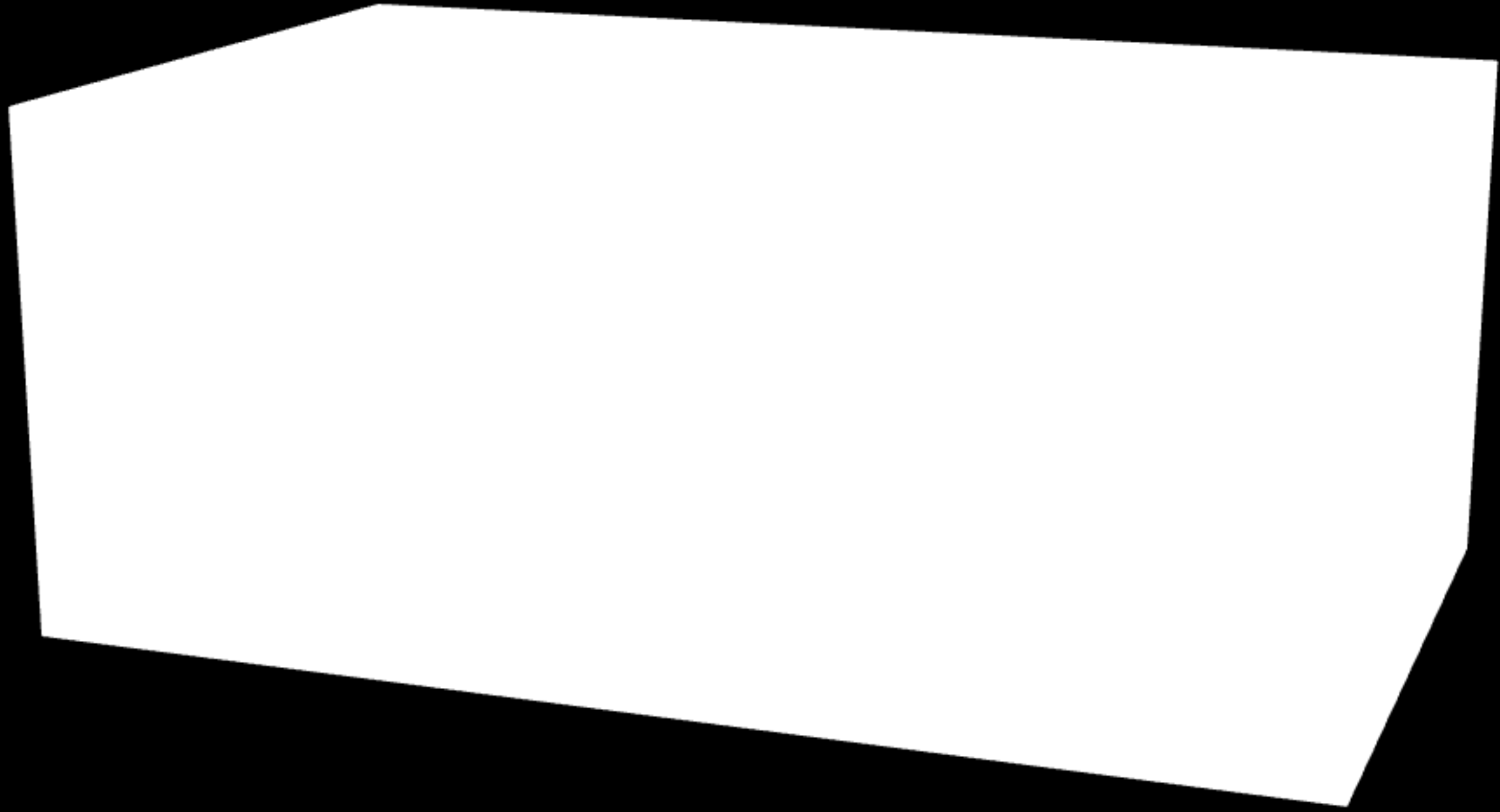
Praca napisana jest poprawnym językiem ale Autorka nie ustrzegła się błędów stylistycznych i edytorskich, które zaznaczyłam w egzemplarzu pracy recenzenta. W trakcie lektury maszynopisu nasunęło mi się kilka uwag:

Zapis niektórych pozycji literatury w rozdziale *Bibliografia* jest nie ujednolicony. Błędy dotyczą stosowanych skrótów czasopisma, kolejności zamieszczenia pozycji tego samego autora np. str.81 –autor Goldman a także pozycji: Kawęcka A, Sikora J. (brak podania strony www.?) str. 83, wykazano nieprawidłowo 2 pozycje autorstwa Meydan i in. (2013) str. 84 .

W odniesieniu do zamieszczonych rycin, będących w większości przypadków fotografiami rozdziału fragmentów DNA w żelu agarozowym, sugeruję zamieścić w przygotowywanych publikacjach zdjęcie po dokonaniu tzw. „inwersji". Fotografie (ryc. 2 i 5) są niezbyt czytelne ze względu na naturalnie słabą widoczność w żelu agarozowym małych fragmentów DNA.

Należy unikać sformułowań typu „genotypowanie pod kątem kodonów" oraz stosować zapisy enzymów restrykcyjnych wg ogólnie przyjętego schematu tzn. skrót oznaczający nazwę łacińską bakterii z jakiej enzym wyizolowano piszemy kursywą.

Wszystkie te uwagi mają tylko charakter pomocniczy, nie umniejszają wartości przedstawionej do recenzji pracy i nie mają wpływu na ostateczną ocenę pracy. Mogą one zostać wykorzystane przy przygotowywaniu dysertacji do druku.

Reasumując stwierdzam, że oceniana praca stanowi efekt dojrzałej koncepcji badawczej jej Autorki. Spełnia ona warunki określone w ustawie o stopniach i tytułach naukowych i na tej podstawie występuję z wnioskiem do Wysokiej Rady Wydziału Hodowli i Biologii Zwierząt Uniwersytetu Technologiczno-Przyrodniczego w Bydgoszczy o dopuszczenie Pani mgr Agnieszki Magdaleny Markowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego

Kraków 20.11.2013 r