

ORIGINAL PAPER

---

**DETECTION OF RECESSIVE MUTATIONS (CVM, BLAD AND RED FACTOR) IN HOLSTEIN BULLS IN SLOVENIA****DOLOČANJE RECESIVNIH MUTACIJ (CVM, BLAD IN ALEL ZA RDEČO BARVO) PRI BIKIH ČRNO-BELE PASME V SLOVENIJI****LOGAR Betka\*, KAVAR Tatjana, MEGLIČ Vladimir**

Agricultural Institute of Slovenia, Hacquetova 17, SI-1000 Ljubljana, Slovenia

\* Tel. +386 (0)1 2805130, Fax: +386 (0)1 2805255, E-mail: [betka.logar@kis.si](mailto:betka.logar@kis.si)

Manuscript received: January 10, 2007; Reviewed: February 19, 2008; Accepted for publication: March 11, 2008

**ABSTRACT**

Detection of recessive mutations that causes complex vertebral malformation (CVM) and bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) in Holstein cattle is especially required for bulls, which are used for artificial insemination (A.I.); these enable elimination of carriers from the A.I. programs and therefore prevent transmission of unwanted mutations to a large number of offspring. Some breeders are also interested in the identification of carriers of recessive allele for red and white coat colour (Red factor). Here, we performed genetic tests for detection of mutations associated with CVM, BLAD and Red factor using methods previously reported or modified methods. Analysis of Holstein bulls, which were recommended for A.I in Slovenia in the years 2007 and 2008, revealed four (10 %) carriers of CVM, and two (5.4 %) carriers of red gene, while all bulls were non-carriers of BLAD.

**Keywords: cattle, genetic test, SLC35A3, CD18, MC1-R****IZVLEČEK**

Pri bikih, ki so namenjeni za osemenjevanje, je zaželena detekcija mutacij povezanih s CVM (prirojena kompleksna vretenčna anomalija) in BLAD sindromom (odsotnost sposobnosti obrambe levkocitov), ker s pravočasnim izločanjem nosilcev, lahko preprečimo prenos nezaželenih mutacij na veliko število potomcev. V interesu nekaterih rejcev je tudi identifikacija nosilcev recesivnega alela za rdečo-belo barvo dlake (Red factor). V tem delu smo izvedli detekcijo mutacij povezanih s CVM in BLAD oz. rdečo-belo barvo dlake (Red factor) z genetskimi testi po že znanih metodah oz. s spremenjenimi metodami. Rezultati analize vzorcev plemenskih bikov črno-bele pasme, ki so bili priporočeni za osemenjevanje v Sloveniji v letih 2007 in 2008 so bili naslednji: štiri biki (10 %) so nosilci mutacije, ki povzroča CVM, dva bika (5,4 %) sta nosilca alela za rdečo barvo, medtem ko so vsi biki prosti mutacije, ki povzroča BLAD.

**Ključne besede: govedo, genetski test, SLC35A3, CD18, MC1-R**

## DETAILED ABSTRACT IN ENGLISH

Complex vertebral malformation (CVM) and bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) are recessively inherited diseases in Holstein cattle [1, 7]. They are both lethal for homozygous calves (nn) while the heterozygous carriers (Nn) are healthy. When the carriers are used for A.I., these disorders can be transmitted to a large number of offspring.

CVM is caused by a point mutation from G to T at nucleotide position 559 (G559T) of the SLC35A3 gene [11]. Two genetic tests were developed for genotyping of SLC35A3 G559T substitution: AS-PCR (the allele-specific polymerase chain reaction), and PCR-PIRA (polymerase chain reaction-primer introduced restriction analysis) for which, two mismatch primers were designed in order to introduce artificial restriction site for EcoT22I and PstI [8]. In this work we performed genetic test for detection of SLC35A3 G559T mutation by PIRA-PCR method (Fig. 1) or by sequence analysis. PIRA-PCR was performed using PstI primers by method previously described [8]. After the overnight digestion with PstI restriction enzyme, DNA fragments were separated by 2 % agarose gel electrophoresis (Fig. 1). For sequence analysis, we designed two novel primers (5'-TGTAATCCCCAGGAATGGAA and 5'-AAGCCACTGGAAAAACATGC), which amplify 219 bp DNA fragment.

BLAD is associated with the point mutation G383A of the bovine CD18 gene [10]. For genotyping of this mutation different PCR-RFLP methods have been developed; according to the first method [10] primers generate 58 bp PCR products and according to the second method [4] primers generate 343 bp PCR products. Fragments were cleaved either with TaqI or with HaeIII restriction enzyme. In this work we performed PCR-RFLP analysis using slightly modified primers (5'-CCTGCATCATATCCACCAG and 5'-GTTTCAGGGGAAGATGGAG) from the second method [4]. After the overnight digestion with HaeIII restriction enzyme, DNA fragments were separated by 3.5 % agarose gel electrophoresis (Fig. 1). The same primers were also used for sequence analysis (Fig. 2).

MC1-R gene (extension (E) locus) has a major function in the regulation of black (eumelanin) versus red (pheomelanin) pigment synthesis within melanocytes [3]. Several alleles were postulated at the E-locus, among them are E<sup>D</sup> for dominant black and e for recessive red coat colour [5, 9]. A point mutation T296C in the dominant allele E<sup>D</sup> gives black coat colour, whereas in the recessive allele e, a deletion of guanine in the position 310 leads to the frameshift and a predicted protein of 155 aa [9]. In this work, our genetic test was limited to genotyping

of MC1-R T296C mutation. We designed a novel set of primers (5'-TGTCTGACTTGCTGGTGAGC and 5'-ATGGAGATGTAGCGGTCCAC) for PCR amplification of 193 bp DNA fragment. After the overnight digestion with SsiI (AciI) restriction enzyme, DNA fragments were separated by 3.5 % agarose gel electrophoresis (Fig. 1). The same primers were also used for sequence analysis.

First, 16 bulls were non-randomly selected to test the methods. The results of genetic tests were in agreement with the expected results. Second, Holstein bulls (n=41 for CVM; n=39 for BLAD and n=37 for Red factor) which were recommended for A.I. in Slovenia in the years 2007 and 2008 were genotyped. DNA analysis revealed four (10 %) carriers of CVM, and two (5.4 %) carriers of red gene, while all bulls were non-carriers of BLAD.

## UVOD

Vse večja globalizacija v govedoreji prinaša tudi povečevanje stopnje sorodnosti v populaciji, s čimer se povečuje nevarnost pojava genetskih napak. Z osemenjevanjem namreč v populacijo lahko hitro vnesemo okvarjen gen, ki nam v kasnejših generacijah povzroča veliko gospodarsko škodo. Temu se povsem seveda ni moč izogniti, lahko pa škodo zmanjšamo s pravočasno identifikacijo in izločanjem prenašalcev okvarjenih genov. Genetske napake odkrivamo na dva načina. Prvi je spremljanje dogajanj na nivoju fenotipa, drugi način pa je odkrivanje s pomočjo analize DNK. Kadar gre za napake, ki so posledica recesivnih mutacij, so na fenotipskem nivoju opazne samo pri recesivnih homozigotih (nn). Medtem ko jih na nivoju DNK, lahko detektiramo tudi pri heterozigotih (Nn); torej pri možnih prenašalcih mutacij v naslednje generacije. Njihova detekcija je še posebej pomembna, kadar gre za mutacije povezane z boleznimi, ki so letalne za recesivne homozigote. Pri črno-beli pasmi sta to predvsem CVM in BLAD sindrom. Pri bikih, ki so namenjeni za osemenjevanje, je zaradi možnega prenosa na veliko število potomcev, diagnostika teh mutacij še posebej zaželeno. S tem, da prepoznamo bike, ki so možni prenašalci, se lahko izognemo prenašanju v naslednje generacije oz. lahko učinkovito eliminiramo določeno mutacijo iz populacije. Na nivoju DNK lahko detektiramo tudi mutacije, ki sicer niso povezane z boleznimi, a je njihovo poznavanje ravno tako zaželeno. Taka je na primer mutacija, ki vpliva na rdeče-belo barvo dlake pri pasmi holštajn. Nekateri rejci želijo potomce z rdeče-belo barvo dlake.

Obe zgoraj omenjeni bolezni in barvo dlake so v preteklosti že uspešno povezali z določenimi mutacijami. Običajno gre za točkovne mutacije, ki vplivajo na spremembo aminokislinskega zaporedja. Zaradi

zamenjave ene aminokisljine z drugo, novo nastali protein ni več funkcionalen oz. ima drugačne lastnosti. Razvite so tudi metode, ki omogočajo hitro detekcijo mutacij in s tem odkrivanje prenašalcev. Večina metod temelji na restrikcijski analizi (PCR-RFLP). Ker so znana nukleotidna zaporedja za fragmente genov, v katerih se nahajajo omenjene mutacije, je možna uporaba tudi drugih metod za detekcijo mutacij, kot sta npr. sekvenčna analiza ali alelna diskriminacija. Slednja je še posebej primerna za tipizacijo večjega števila vzorcev, kadar je na voljo sistem za PCR v realnem času.

V tem delu smo analizirali vzorce izbranih bikov črno-bele pasme in vzorce bikov, ki so bili priporočeni za osemenje v Sloveniji v letih 2007 in 2008. Za detekcijo mutacij, ki povzročajo CVM, BLAD ali vplivajo na rdečo barvo dlake (Red factor) smo uporabili že znane metode oz. smo na podlagi znanih nukleotidnih zaporedij fragmentov genov v katerih se nahajajo mutacije, uvedli nove, rahlo modificirane metode.

### CVM

CVM je okrajšava za »Complex Vertebral Malformation«, kar pomeni prirojeno kompleksno vretenčno anomalijo, ki se odraža pri novorojenih teletih. Ta so nenormalno razvita, prednje in zadnje okončine so nezadostno razvite z nezmožnostjo raztezanja določenih sklepov kot posledica fibroze kit ter fascij. Anomalije hrbtenice, ki je izmaličena, se kažejo v degeneraciji hrbteničnega kanala v vratnem in prsnem delu. Zgodi se celo, da pride do anomalije srca. Taka teleta so pogosto mrtvorojena, poginejo na dan telitve, lahko so predčasno rojena ali pa so izvrženi fetusi (plodovi) v katerem koli obdobju bremnosti [1].

CVM povzroča točkovna mutacija: transverzija G→T na nukleotidni poziciji 559 (G559T) v genu SLC35A3 (solute carrier family 35 (UDP-N-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc) transporter). Mutacija vpliva na spremembo aminokislinskega zaporedja (valin→fenilalanin) na kodonu 180 (V180F) [11]. Izvor te mutacije vodi do enega skupnega prednika, bika z imenom Carlin-M Ivanhoe Bell, ki se je zaradi izjemno dobre mlečnosti hčera veliko uporabljal v reji mlečnih krav po vsem svetu [11]. V slovenski aktivni populaciji nastopa ta bik v poreklu več kot 40.000 ženskih živali. Običajno so se točkovne mutacije, vsaj v preteklosti, določale z restrikcijsko analizo. Ker za to mutacije ni na voljo restrikcijskih mest, sta bili razviti dve drugi metodi: AS-PCR (alelna specifična verižna reakcija s pomočjo polimeraze), ki je predmet patenta (International patent WO 02/40709 A2, 2002, Ministeriet for Fodervarer, Landburg og Fiskeri Danmarks Jordbrugsforskning) in PCR-PIRA (verižna reakcija s pomočjo polimeraze z uvedbo umetnih restrikcijskih mest z začetnimi

oligonukleotidi) [2]. Za slednjo so avtorji izdelali dva seta začetnih oligonukleotidov, pri čemer so v vsakem setu enega od začetnih oligonukleotidov spremenili tako, da uvedejo v PCR produkte restrikcijsko mesto za encim EcoT22I oz. za encim PstI.

### BLAD

BLAD je okrajšava za »Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency« in pomeni odsotnost sposobnosti obrambe levkocitov, ki jo poznamo pri normalnih živalih. Posledica tega je smrt živali, največkrat že v prvem letu starosti. Prenášalci okvarjenega gena ne kažejo znakov obolenj [7].

Sindrom BLAD je povezan s točkovno mutacijo: tranzicija G→A na nukleotidni poziciji 383 (G383A) v genu CD18, ki kodira adhezijsko molekulo na površini nevtrofilov,  $\beta 2$  integrin [10]. Mutacija vpliva na spremembo aminokislinskega zaporedja (aspartat → glicin) na kodonu 128 (D128G). Njen izvor vodi do enega bika, katerega seme se je v petdesetih in šestdesetih letih prejšnjega stoletja veliko uporabljalo za osemenje. Za detekcijo nosilcev D128G mutacije sta opisani dve metodi, ki temeljita na restrikcijski analizi. S prvo metodo [10] pomnožimo 58 bp dolg odsek, z drugo [4] nekoliko daljši odsek (343 bp). Pri obeh metodah sledi restrikcija ali z encimom TaqI (reže DNK, ki ne vsebuje mutacije povezane z BLAD sindromom) ali z encimom HaeIII (reže DNK, ki vsebuje mutacijo povezano z BLAD sindromom).

### ALEL ZA RDEČO BARVO DLAKE

Tretja recesivna mutacija, ki nas tudi pogosto zanima pri črno-beli pasmi, je povezana z barvo dlake. Glavno vlogo v regulaciji sinteze črnega (evmelanina) ali rdečerjavega pigmenta (pheomelanina) v melanocitah ima gen za MC1-R (melanocyte-stimulating hormone receptor) na lokusu extension (E-lokus) [2]. Na tem lokusu so našli več različnih alelov, med drugimi tudi dominanten alel za črno barvo ( $E^D$ ) in recesiven alel za rdečo barvo (e) [5, 9]. Črna barva dlake je posledica točkovne mutacije: tranzicije T→C na nukleotidni poziciji 296 v genu MC1-R. Mutacija vpliva na spremembo aminokislinskega zaporedja (levcin → prolin). Rdeča barva dlake je značilna za recesivne homozigotne živali (ee), pri čemer ima alel e delečijo gvanina na nukleotidni poziciji 310, zaradi česar pride do prekinitve čitalnega okvirja in posledično do sinteze krajšega proteina [9]. Poleg omenjenega (klasičnega) prenosa rdeče barve (povezanega z E-lokusom) obstajajo pri črno-belem govedu še drugi mehanizmi prenosa rdeče barve. Eden izmed njih je povezan z genom VR (Variant Red) [6].

### MATERIAL IN METODE

**MATERIAL**

V analizo smo skupaj vključili vzorce 57 plemenskih bikov črno-bele pasme, ki so se uporabljali za osemenjevanje v Sloveniji. Šestnajst bikov je bilo izbranih namensko. Podlaga za izbor je bilo predvidevanje o prisotnosti posamezne mutacije na podlagi opažanj pri potomcih ali z DNK analizo že potrjena prisotnost posamezne mutacije. V nadaljevanju smo analizirali še vzorce 41 plemenskih bikov črno-bele pasme, ki so bili priporočeni za osemenjevanje v letih 2007 in 2008.

**DETEKCIJA MUTACIJ**

DNK smo izolirali iz krvi, dlake oziroma semena bikov po standardnih postopkih za izolacijo iz tkiv živalskega izvora in jo uporabili kot matrico za verižno reakcijo s pomočjo polimeraze (PCR). Vse PCR reakcije smo izvedli v cikličnem termostatu GeneAmp PCR System 9700 (PE Applied Biosystems) pod naslednjimi pogoji: denaturacija: 95°C / 3 min., 35 ciklov: 94°C / 1 min., 60°C / 1 min., 72°C / 1 min. in sinteza: 72°C / 7 min. 20 µl PCR reakcije so vsebovale 1x PCR pufer (Biotools), 200 µM dNTP, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5U Taq DNA Polymerase (Biotools), 5 pmol začetnih oligonukleotidov in približno 50 ng DNA.

**CVM**

Transverzijo G559T v genu SLC35A3 smo detektirali s PIRA-PCR metodo oz. s sekvenčno analizo. PIRA-PCR smo izvedli z že objavljenimi začetnimi oligonukleotidi, ki vnesejo v PCR produkte restrikcijsko mesto za encim PstI [2]. Po restrikciji s tem encimom smo fragmente ločili z elektroforezo na 2 % agaroznem gelu (Slika 1). Za sekvenčno analizo smo s programom Primer3

[8] določili dva začetna oligonukleotida: 5'-TGTAATCCCCAGGAATGGAA in 5'-AAGCCACTGGAAAAACATGC, in ju uporabili za pomnoževanje 219 bp dolgega odseka DNK in za izvedbo sekvenčnih reakcij.

**BLAD**

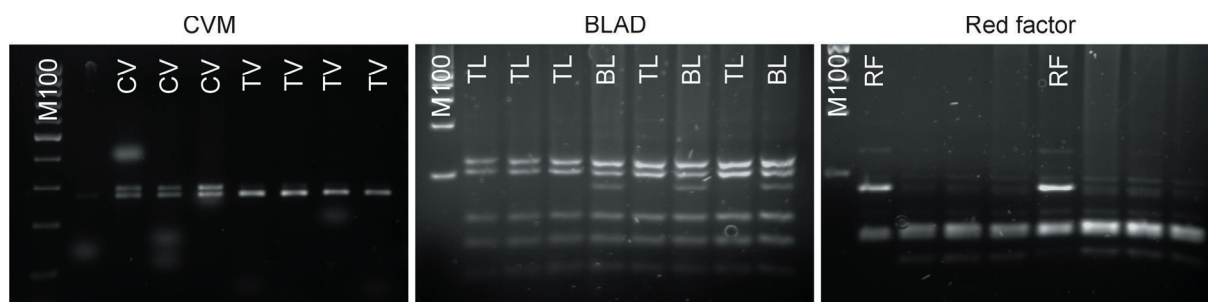
Tranzicijo G383A na nukleotidni poziciji 383 v genu CD18 [10] smo detektirali s PCR-RFLP metodo oz. s sekvenčno analizo (Slika 2). Za obe metodi smo uporabili podobne začetne oligonukleotide kot Kriegesmann et al. [4]: 5'-CCTGCATCATATCCACCAG in 5'-GTTTCAGGGGAAGATGGAG. Po restrikciji z encimom HaeIII smo fragmente ločili na 3,5 % agaroznem gelu (Slika 1).

**Alel za rdečo barvo dlake**

Pri analizi mutacij, ki vplivajo na barvo dlake, smo se omejili na detekcijo mutacije značilne za alel E<sup>D</sup> (T296C v genu MC1-R). Na podlagi znanih sekvenc smo s programom Primer3 [8] določili začetna oligonukleotida: 5'-TGTCTGACTTGCTGGTGAGC in 5'-ATGGAGATGTAGCGGTCCAC, in ju uporabili za pomnoževanje 193 bp dolgega odseka DNK. Detekcijo smo izvedli s sekvenčno analizo oz. s PCR-RFLP metodo. Pri slednji smo po restrikciji z encimom SsiI (Acil) fragmente ločili na 3,5 % agaroznem gelu (Slika 1).

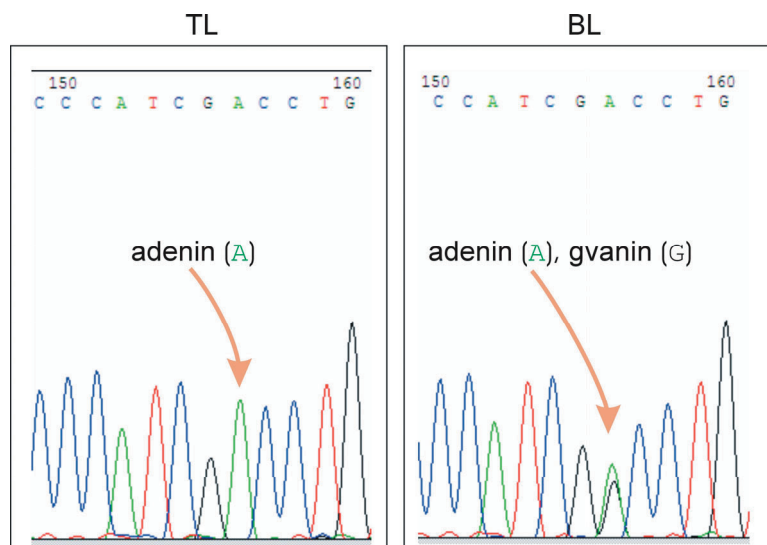
**REZULTATI IN RAZPRAVA**

Na mutacije, ki povzročajo CVM, BLAD ali rdečo barvo dlake, je bilo najprej analiziranih šestnajst namensko izbranih plemenskih bikov črno-bele pasme. Analize so potrdile prisotnost posamezne mutacije, tako v primerih,



Slika 1: Detekcija recesivnih mutacij s PIRA-PCR metodo (CVM) in z restrikcijsko analizo (BLAD in Red factor). CV – nosilec mutacije, ki povzroča CVM; TV – nima mutacije, ki povzroča CVM; BL - nosilec mutacije, ki povzroča BLAD; TL – nima mutacije, ki povzroča BLAD; RF - nosilec alela za rdečo barvo; M100 – označevalec velikosti (100 bp DNA Ladder (Fermentas))

Figure 1: Detection of genetic recessives using PIRA-PCR method (CVM) and restriction analysis (BLAD and Red factor). CV – carrier of CVM; TV – non-carrier of CVM; BL – carrier of BLAD; TL – non-carrier of BLAD; RF – carrier of red gene; M100 – marker (100 bp DNA Ladder (Fermentas))



Slika 2: Detekcija mutacije, ki povzroča BLAD s sekvenčno analizo. TL –nima mutacije, ki povzroča BLAD; BL – nosilec mutacije, ki povzroča BLAD

Figure 2: Detection of mutation that causes BLAD. TL – non-carrier of BLAD; BL – carrier of BLAD

ko so bili vzorci predhodno že analizirani, kot tudi pri vzorcih, kjer z DNK analizo mutacija še ni bila potrjena in smo o njej sklepali le na podlagi opažanj na potomcih.

V nadaljevanju smo analizirali še vzorce 41 plemenskih bikov črno-bele pasme, ki so bili priporočeni za osemenje v letih 2007 in 2008. Na mutacijo povezano s CVM smo tipizirali vseh 41 vzorcev, na mutacijo povezano z BLAD sindromom 39 vzorcev (za dva bika so bili podatki DNK analize že na voljo) in na mutacijo povezano z rdečo-belo barve dlake 37 vzorcev (izključeni so bili vzorci za katere je prisotnost e alela razvidna že na osnovi fenotipa – barve dlake). Rezultati analize so bili naslednji: štirje biki so nosilci mutacije, ki povzroča CVM, vsi biki so prosti mutacije, ki povzroča BLAD, in dva bika sta nosilca alela za rdečo barvo.

Na podlagi informacije o nosilstvu recesivne genetske posebnosti pri plemenjaku se lahko izognemo defektu kot je na primer CVM pri teletih ali po drugi strani z načrtnim parjenjem staršev nosilcev alela za rdečo barvo dobimo rdeče-bele potomce. Uvedene DNA analize omogočajo sistematično spremljanje genetskih posebnosti plemenskih živali. Tako lahko bika, nosilca nezaželene genetske posebnosti, izločimo že kot teleta, vsekakor pa preden je vključen v osemenje.

## SKLEPI

Zaradi velikega gospodarskega pomena, ki ga ima preprečevanje genetskih bolezni in poznavanje genetskih posebnosti, je potrebno s sistematičnim spremljanjem

plemenskih bikov v populaciji nadaljevati in spremljanje prenesti tudi na druge nivoje vzreje plemenskih živali.

## VIRI

- [1] Agerholm J.S., Bendixen C., Andersen O., Arnbjerg J., Complex vertebral malformation in Holstein calves. *J. Vet. Diagn. Invest.* (2001) 13: 283–289.
- [2] Kanae Y., Endoh D., Nagahata H., Hayashi M., A method for detecting complex vertebral malformation in Holstein calves using polymerase chain reaction-primer introduced restriction analysis, *J. Vet. Diagn. Invest.* (2005) 17: 258-262.
- [3] Klungland H., Våge D.I., Gomez-Raya L., Adalsteinsson S., Lien S., The role of melanocyte-stimulating hormone (MSH) receptor in bovine coat color determination, *Mammalian genome* (1995) 6: 636-639.
- [4] Kriegesman B., Jansen S., Baumgartner B.G., Brenig B., Partial Genomic structure of the Bovine CD18 Gene and the Refinement of Test for Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency, *J. Dairy Sci.* (1997) 80: 2547-2549.
- [5] Kriegesmann B., Jansen S., Baumgartner B.G., Brenig B., Two breed-specific bovine MC1-R Alleles in Brown Swiss and Saler Breeds. *J. Dairy Sci.* 2001: 84: 1768-1771.
- [6] Leduc M., The various mechanisms of red colour transmission in the Holstein Breed, *Holstein J.* (2006) May: 45-47.

[7] Nagahata H., Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency (BLAD): A Review, *J. Vet. Med. Sci.* (2004) 66: 1475-1482.

[8] Rozen S., Skaletsky H.J., Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S., Misener S. (Eds.) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, 2000, pp 365-386. [http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)

[9] Rouzaud F., Martin J., Gallet P.F., Delourme D., Goulemot-Leger V., Amigues Y., Ménissier F., Leveziel H., Julien R., Oulmouden A., A first genotyping assay of French cattle breeds based on a new allele of the

extension gene encoding the melanocortin-1 receptor (Mclr), *Genet. Sel. Evol.* (2000) 32: 511-520.

[10] Shuster D.E., Kehrli M.E., Ackermann M.R., Gilbert O., Identification and prevalence of a genetic defect that causes leukocyte adhesion deficiency in Holstein cattle, *PNAS* (1992) 89: 9225-9229.

[11] Thomsen B., Horn P., Panitz F., Bendixen E., Petersen A.H., Holm L-E., Nielsen V.H., Agerholm S., Arnbjerg J., Bendixen C., A missense mutation in the bovine SLC35A3 gene, encoding a UDP-N-acetylglucosamine transporter, causes complex vertebral malformation, *Genome Res.* (2006) 16: 97-105.