

THE POLYMORPHISMS OF PRNP GENE ASSOCIATED WITH BSE IN CATTLE

POLYMORFIZMY GENU PRNP ASOCIOVANÉ S BSE U SKOTU

Weisz F., Knoll A.

Department of Animal Morphology, Physiology and Genetics, Faculty of Agronomy, Mendel University of Agriculture and Forestry Brno, Zemědělská 1, 613 00, Brno, Czech Republic.

E-mail: filipw@seznam.cz, knoll@mendelu.cz

ABSTRACT

This study deal with the polymorphisms in *PRNP* gene which encodes the structure of this protein. The mutation which prevent the changes in normal prion protein to pathological form has not found in cattle but it has found the polymorphisms which offer significantly more often in cattle affected BSE. These polymorphisms are indel 12 bp and 23 bp in non-coding region of *PRNP* gene. The genotypes of these polymorphisms were determined by PCR and PCR-RFLP. It was tested 96 bulls of Holstein and 68 bulls of Czech Fleckvieh. In polymorphism indel 23 bp the highest frequency of heterozygous genotype was observed in Holstein, on the contrary the highest frequency of homozygous genotype of deleted allele was observed in Czech Fleckvieh. In polymorphism indel 12 bp the highest frequency of both deleted alleles was observed in Holstein. In this breed homozygous genotype +/+ was observed too, compared to Czech Fleckvieh – in this breed heterozygous genotype was mostly represented. The genotype of this polymorphism of number of octapeptide repeat was determined also by PCR. In Holstein the genotype 6/6 was the most frequent, the genotype 5/5 wasn't found. In Czech Fleckvieh the most frequent genotype was the same (6/6), but the genotype 5/5 was found and the genotype 5/6 was more frequent than in Holstein. For indel polymorphism probable haplotypes were designed with combination of effects of both genotypes. Haplotype 23del/12del which is linked to increased danger of incidence BSE was the most often observed in both breeds. Haplotype 23ins/12ins whose some scientists connect with resistance was observed in the same frequency. The association analysis of all 3 polymorphisms in gene *PRNP* was made - indel 23 bp was observed in all 3 genotypes in Holstein and was statistically significantly associated with some breeding values.

Key words: BSE, prion, PRNP, polymorfismus, indel

ÚVOD

Prionový protein je považován za původce skupiny onemocnění označovaných jako transmisivní spongiformní encefalopatie (TSE). K nejvýznamnějším onemocněním patří Creutzfeldt-Jakobova choroba (CJD) u člověka a bovinní spongiformní encefalopatie (BSE) u skotu. Charakteristickým znakem onemocnění je dlouhá inkubační doba a to, že vždy končí smrtí. Priony jsou infekční agens zodpovědné za TSE a jsou charakterizovány přeměnou buněčného prionového proteinu (PrP^{C}) na patogenní formu (PrP^{Sc}) (Knowles and Zahn, 2006). Obě formy proteinu (buněčná i patogenní) mají stejnou aminokyselinovou sekvenci ale rozdílné fyzikální vlastnosti (MacGregor, 2001). Aminokyselinová sekvence prionů je u různých druhů savců z 90 % homologní. U turovitých a jelenovitých má prion délku 256 aminokyselin. Postranlačnými úpravami dojde ke zkrácení proteinu na 210 aminokyselin (Goldmann, 2008). Protein je přenašečem s nejméně 1 vazebným místem pro Cu^{2+} (Novakofski *et al.*, 2005), které je oktarepetitivní doménou na N-konci proteinu (Dormon, 2002). Tato místa jsou bohatá na prolin a glycin a obvykle jich bývá 5 (Harris, 1999). Funkce PrP^{C} ve zdravém organismu zůstává neznáma. (Dormont, 2002). Jeho struktura je ze 42 % alfa helix a jen 3 % tvoří beta skládaný list na rozdíl od PrP^{Sc} (MacGregor, 2001).

PrP^{Sc} je abnormální patologická izoforma prionového proteinu, která se od PrP^{C} liší konformační strukturou. Jeho struktura je ze 30 % alfa helix a z 42 % beta skládaný list. (MacGregor, 2001). Jedna z nejvíce pozoruhodných charakteristik PrP^{Sc} je jeho rezistence pro inaktivaci čistícími a sterilizačními technikami. Nelze ho zničit formaldehydem, hydrogen peroxidem, ethanolem, etherem nebo acetonem. Má i vysokou odolnost k teplotám, účinná je teplota 121°C nebo více po dobu delší než 30 minut. (Novakofski *et al.*, 2005).

Gen prionového proteinu *PRNP* (*PrP*, *prn-p*) kóduje prionový protein, který hraje důležitou roli v transmisivních spongiformních encefalopatiích. U skotu se nachází na 13. chromozomu v pozici q17 (Goldmann, 2008; Czarnik *et al.*, 2007). Délka genu je přibližně 21 kb a obsahuje 3 exony. Exon I má délku 53 bp a exon II 98 bp a tvoří nekódující 5'UTR oblast transkriptu. Exon 3 má velikosti asi 4 kb a obsahuje celý ORF o délce 795 bp (Gurgul and Słota, 2007; Goldmann, 2008). Gen obsahuje 2 introny, a to intron I o délce 2 442 bp a intron II o délce 13 552 bp (Hills *et al.*, 2001). Jedním z nejdůležitějších polymorfizmů v kodující oblasti genu *PRNP* jsou oktapeptidové repetice které zahrnují 3 alely: s 5ti, 6ti nebo 7mi opakováními 24 bp, které kódují 8 aminokyselin na N-konci prionového proteinu (Pro-His-Gly-Gly-Gly-Trp-Gly-Gln) (Goldmann, 2008). Alela 6 a genotyp 6/6 se vyskytuje nejčastěji, zatímco alela 7 byla nalezena jen u plemene brown swiss (Walawski and Czarnik, 2003). Korelace mezi variabilitou oktarepetitivních genotypů nebyla potvrzena, nicméně u homozygotů pro alelu 5 nebylo nikdy nalezeno onemocnění BSE (Nakamitsu *et al.*, 2005), čemuž ovšem odporuje tvrzení Geldermanna *et al.* (2006), který našel genotyp 5/5 u BSE nemocného skotu, objevil i genotyp 7/7 u zdravého i u BSE nemocného skotu. Alela 4 byla nalezena v genotypu 4/6 u býka plemene brown swiss (Seabury *et al.*, 2004). V nekódujících oblastech byl nalezeny jako nejdůležitější polymorfizmy se vztahem k odolnosti k BSE indels (inzerce/delece). Jedná se o indel 12 bp, který se nachází v intronu I a indel 23 bp, který se nachází v promotorové oblasti exonu I. Indel 12 bp obsahuje vazné místo pro transkripční

faktor Sp1. Pokud se v sekvenci vyskytuje alela s delecí, pak se zde nenaváže transkripční faktor. Indel 23 bp obsahuje vazné místo pro RP58 (repressorový protein s hmotností 58 kDa). Sekvence s 23 bp inzercí silně váže transkripční faktor, zatímco delece tuto vazbu oslabuje. Promotor s inzercí na obou polymorfních místech (23 bp ins-12 bp ins) překvapivě redukuje expresi genu ve srovnání s delecí v obou místech (23 bp del – 12 bp del) (Gurgul and Słota, 2007). U těchto polymorfizmů byla nalezena asociace s výskytem BSE a obě deletované alely byly statisticky průkazně ve vyšší frekvenci u BSE nemocných zvířat (Sander *et al.*, 2004). Homozygotní skot pro inzerci obou polymorfizmů, je považován za více rezistentní než skot který, má deletované alely (Brunelle *et al.*, 2008).

MATERIÁL A METODIKA

Testovaný soubor se skládal z 96 býků plemene holštýnský skot, z nichž 68 má v registru plemenných býků plemennou hodnotu mléčné užitkovosti, 68 býků plemene české strakaté, z nichž 22 má v registru plemenných býků plemennou hodnotu masné užitkovosti a mléčné užitkovosti a 20 má pouze plemennou hodnotu masné užitkovosti. U těchto vzorků byly metodou PCR stanoveny polymorfizmy oktapaptidových repetic a indel 23 bp a metodou PCR-RFLP polymorfizmus indel 12-bp. Podmínky cyklování po optimalizaci a sekvence primerů jsou uvedeny v tabulce číslo 1 a 2. Při stanovení polymorfizmu indel 12-bp bylo použito enzymu *SacII*. Alela s delecí 12 bp měla na gelu velikost 414 a alela s inzercí 12 bp byla štěpena na fragmenty o velikosti 276 bp a 150 bp.

Pro vyhodnocení předpokládaných haplotypů u indel polymorfizmů bylo využito programu Arlequin 3.1.(Excoffier *et al.*, 2005) a pro vyhodnocení vazbové nerovnováhy programu Genepop 4.0.6. (Raymond and Rousset, 1995). Pro asociační analýzu byl použit lineární model s pevnými efekty GLM, v programu SAS 9.1.3 (2004), pro každé plemeno zvlášť. Data pro tuto analýzu zahrnovala u plemene holštýnský skot tyto plemenné hodnoty pro mléčnou užitkovost: kg mléka, % tuku, kg tuku, % bílkovin, kg bílkovin a relativní plemennou hodnotu pro kg bílkovin. U plemene české strakaté zahrnovala plemenné hodnoty pro mléčnou užitkovost stejné jako u holštýnského skotu a navíc relativní plemenné hodnoty pro masnou užitkovost, a to pro: netto přírůstek, jatečné třídy, podíl masa a jatečnou výtěžnost.

Tab. 1 Sekvence primerů

Polymorfizmus	Primery
Oktapeptidové repetice	Přímý (A): 5'-ACG TGG GCC TCT GCA AGA AGC GAC-3' Zpětný (B): 5'-GCA CTT CCC AGC ATG TAG CCA CCA-3' Premzl <i>et al.</i> , (2000)
indel 23 bp	Přímý (A): 5'-GTG CCA GCC ATG TAA GTG-3' Zpětný (B): 5'- TGG ACA GGC ACA ATG GG -3' Sander <i>et al.</i> , (2004)
indel 12 bp	Přímý (A): 5'-CTT CTC TCT CGC CGC AGA AGC AG -3' Zpětný (B): 5'- CCC TTG TTC TTC TGA GCT CC -3' Nakamitsu <i>et al.</i> (2005)

Tab. 2 Podmínky cyklování reakce

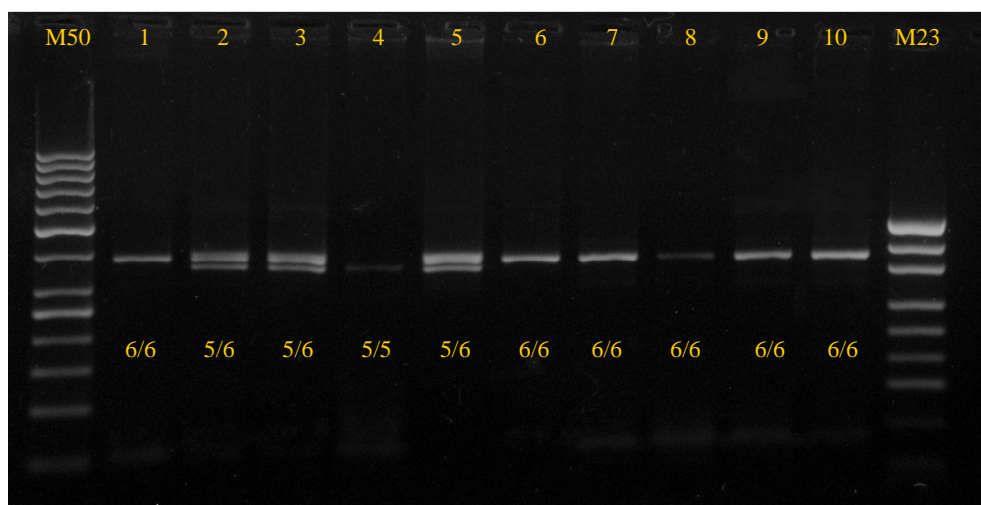
Polymorfizmus	Podmínky cyklování po optimalizaci
oktapeptidové repetice	95°C/2 min, 30x (95°C/20 s, 65°C/30 s, 72°C/30 s), 72°C/7 min
indel 23 bp	94°C/4 min, 30x (94°C/30 s, 60°C/30 s, 72°C/20 s), 72°C/7 min
indel 12 bp	95°C/4 min, 30x (94°C/30 s, 62°C/30 s, 72°C/20 s), 72°C/7 min

VÝSLEDKY A DISKUZE

Detekce a frekvence genotypů

Genotyp oktapeptidových repetic

Detekce genotypu byla provedena na 2% agarózovém gelu, byly detekovány genotypy 5/5, 5/6 a 6/6. Alela 5 měla délku PCR produktu 349 bp a alela 6 373 bp. Viz. obrázek číslo 1.



Obr. 1 Gel pro vizualizaci oktapeptidových repetic

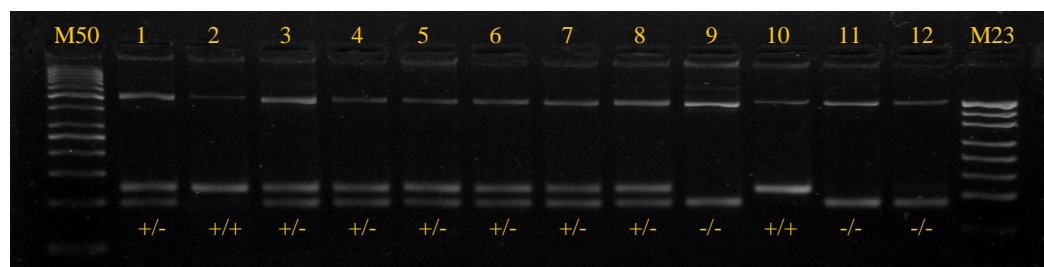
Frekvence polymorfizmů oktapeptidových repetic jsou uvedeny v tabulce 3. Zkoumaná populace se v tomto lokusu nachází v Hardy-Weinbergově rovnováze. U holštýnského skotu nebyla nalezena alela 5/5 na rozdíl od souboru české strakatého skotu, u něhož byla také zjištěna nižší frekvence alely 6, nicméně u obou plemen tato alela převažuje; tyto výsledky korespondují s výsledky Vrtková *et al.* (2001), Walawski a Czarnik (2003), Sander (2004), Nakamitsu *et al.* (2005), Jeong *et al.* (2005), Miluchová *et al.* (2006), Saunder *et al.* (2007), Tkáčiková *et al.* (2007). Oproti tomu Tkáčiková *et al.* (2007) našla u slovenského strakatého skotu, který má shodný fylogenetický původ s českým strakatým skotem, frekvenci heterozygotů pouze 0,023 a žádného homozygota pro alelu 5. Nakamitsu *et al.* (2005) prezentuje, že tu tohoto homozygota (5/5) nebylo nikdy nalezeno onemocnění BSE, ovšem Geldermann *et al.* (2006) uvádí, že tento genotyp našel i mezi skotem nemocným BSE a Miluchová *et al.* (2006) dokonce považuje tento genotyp za zodpovědný za onemocnění BSE.

Tab. 3 Polymorfismus oktapeptidových repetic u testovaného souboru skotu

Plemeno	Počet zvířat	Frekvence genotypů			Frekvence alel		Heterozygotnost		P
		5/5	6/5	6/6	5	6	pozorovaná	očekávaná	
Holštýnský skot	96	0	0,094	0,906	0,047	0,953	0,0938	0,0898	1,000
Český strakatý skot	68	0,015	0,206	0,779	0,118	0,882	0,2059	0,2092	1,000

Genotyp indel 23 bp

Detekce genotypu byla provedena na 3% agarózovém gelu, byly detekovány genotypy +/+, +/- a -/-. Alela, ve které se nachází inserce, měla délku PCR produktu 123 bp a alela s delecí 100 bp. Při PCR vznikaly i nespecifické produkty, které se i po optimalizaci nepovedlo odstranit, ovšem velikost těchto nespecifit byla nad 500 bp a nijak nevadila ani neovlivňovala odečítání genotypů. Viz. obrázek číslo 2.



Obr. 2 Gel pro vizualizaci indel 23 bp

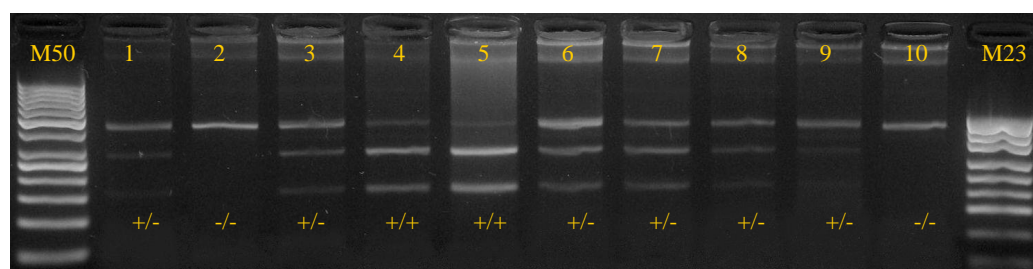
Frekvence polymorfizmů indel 23 bp jsou uvedeny v tabulce číslo 4. Zkoumaná populace se v daném lokusu nachází v Hardy-Weinbergově rovnováze. U holštýnského skotu je nejvyšší zastoupení heterozygotního genotypu, ale u českého strakatého je to homozygot pro deletovanou alelu. U obou plemen převládá frekvence deletované alely. Pokud porovnáme frekvence u plemene holštýnský skot s ostatními publikacemi, tak musíme konstatovat: populace ve spojených státech má srovnatelné genotypové i alelové zastoupení (Brunelle *et al.*, 2008), stejně je tomu tak i u populace v Německu a Anglii (Juling *et al.*, 2006) a Polsku (Czarnik *et al.*, 2007) ovšem v Japonsku (Nakamitsu *et al.*, 2005) je nejvíce zastoupeným genotypem (0,63) -/- a také deletovanou alelou (0,79). U českého strakatého skotu jsou výsledné frekvence shodné jakou u německého strakatého skotu (Juling *et al.*, 2006).

Tab. 4 Polymorfismus indel 23 bp u testovaného souboru skotu

Plemeno	Počet zvířat	Frekvence genotypů			Frekvence alel		Heterozygotnost		
		+/+	+/-	-/-	+	-	pozorovaná	očekávaná	P
Holštýnský skot	96	0,188	0,458	0,354	0,417	0,583	0,4583	0,48866	0,671
Český strakatý skot	68	0,059	0,426	0,515	0,272	0,728	0,42647	0,39902	0,761

Genotyp indel 12 bp

Detekce genotypu byla provedena na 3% agarózovém gelu, po restrikci PCR produktů. Byly nalezeny alely +/+, +/- a -/-. Alela, v které se nachází inserce, tedy i štěpné místo pro endonukleázu *SacII* má na gelu délku 276 a 150 bp a alela s delecí má délku 414 bp. Viz. obrázek číslo 3.



Obr.3 Gel pro vizualizaci indel 12 bp

Frekvence polymorfizmů indel 12 bp jsou uvedeny v tabulce číslo 5. Hodnota P je menší než 0,05 u obou plemen, tedy testovaná populace se v daném lokusu nenachází v Hardy-Weinbergově rovnováze. U populace holštýnského skotu je nejfrekventovanějším genotypem homozygot pro deletovanou alelu, zatímco u českého strakatého jím je heterozygot. Obě plemena mají vyšší zastoupení deletované alely. U holštýnského skotu v

populaci v USA (Brunelle et al., 2008) je nejvyšší zastoupení heterozygotního genotypu, ale také převládá deletovaná alela. Podobné zastoupení jako v USA je nalezeno i u holštýnského skotu v Německu, Anglii (Juling et al., 2006) a Polsku (Czarnik et al., 2007). Ovšem shodné frekvence genotypů a alel našel Nakamitsu et al. (2005). U plemene český strakatý nebyl nalezen genotyp $+/+$ na rozdíl od výsledků Juling *et al.* (2006) a nejfrekventovanějším je shodně heterozygotní genotyp.

Tab. 5 Polymorfismus indel 12 bp u testovaného souboru skotu

Plemeno	Počet zvířat	Frekvence genotypů			Frekvence alel		Heterozygotnost		
		$+/+$	$+/-$	$-/-$	$+$	$-$	pozorovaná	očekávaná	P
Holštýnský skot	96	0,021	0,479	0,5	0,260	0,740	0,47917	0,38722	0,0005
Český strakatý	68	0	0,574	0,426	0,287	0,713	0,57353	0,41209	0,0007

Haplotypová analýza

Frekvence předpokládaných haplotypů jsou v tabulce číslo 6.

Tab. 6 Frekvence předpokládaných haplotypů

Haplotypy	Holštýnský skot	Český strakatý skot
23 ins 12 ins	0,223	0,191
23 del 12 del	0,549	0,632
23 ins 12 del	0,192	0,081
23 del 12 ins	0,036	0,096

Haplotyp s převažující frekvencí byl 23del/12del a tento haplotyp je podle Juling *et al.* (2006) spojen s zvýšeným nebezpečím výskytu BSE a naopak haplotyp 23ins/12ins vyskytující se v této studii jako druhý nejvíce zastoupený shodně u obou plemen je považován za „rezistentní“ haplotyp. U testovaných zvířat byly zjištěny 4 haplotypy, oproti tomu Brunelle *et al.* (2008) nenalezl u holštýnského skotu v USA haplotyp 23ins/12del, a haplotyp 23ins/12ins našel ve frekvenci 0,43, nicméně haplotyp 23del/12del byl u jeho populace stejně jako u výsledků této práce nejzastoupenější. Czarnik *et al.* (2007) u testované populace holštýnského skotu také nenalezl u býků haplotyp 23ins/12del ovšem u krav této populace nalezen byl, i zde se nejvíce vyskytoval haplotyp 23del/12del. Juling *et al.* (2006) neobjevil již zmiňovaný haplotyp 23ins/12del ani u holštýnského skotu v Německu a Anglii a ani u strakatého skotu v Německu. V obou zemích převládal u holštýnského skotu genotyp 23del/12del (UK 0,63 a Německo 0,53), což je překvapující vzhledem k epidemii BSE v UK.

Tento jev vysvětluje Juling *et al.* (2006) různým podmínkám prostředí jako například rozdílné používání masa a masa odřezaného od kosti ve výživě přežvýkavců. Ovšem v UK je již od roku 1996 přísný zákaz zkrmování živočišné bílkoviny všem hospodářským zvířatům, což polemizuje s tvrzením Julinga *et al.* (2006). Navíc se BSE objevilo i u zvířat narozených po zákazu zkrmování živočišných bílkovin přežvýkavcům, i když v menší míře.

Asociační analýza

Vzhledem k neznalosti přesné funkce prionového proteinu byla provedena asociační analýza polymorfizmů jeho genu s produkčními znaky zastoupenými plemennými hodnotami. Tuto vazbu již naznačují někteří autoři (Czarnik *et al.*, 2007). Asociace byla provedena u holštýnského a českého strakatého plemene s plemennou hodnotou pro kg mléka (PH1), % tuku (PH2), kg tuku (PH3), % bílkovin (PH4), kg bílkovin (PH5) a relativní plemennou hodnotou pro kg bílkovin (RPHM). U plemene české strakaté byla také provedena asociační analýza pro plemenné hodnoty pro masnou užitkovost, a to: plemennou hodnotu netto přírůstku (RPH1), jatečnou třídu (RPH2), podílu masa (RPH3) a jatečné výtěžnosti (RPH4), ale nebyly zde nalezeny žádné asociace mezi jednotlivými genotypy a masnými plemennými hodnotami. Následně jsou uváděny pouze výsledky u kterých byla nalezena statistická průkaznost.

Vliv polymorfizmu indel 23 bp

U holštýnského plemene byly nalezeny vysoce statisticky průkazné rozdíly pro genotyp -/- a +/- u plemenné hodnoty pro kg mléka (PH1). Statisticky průkazný rozdíl byl nalezen u genotypu -/- a +/+ pro plemennou hodnotu % tuku (PH2), kdy genotyp -/- koreluje s vyššími hodnotami a u stejných genotypů byla nalezena statisticky prokazatelná rozdílnost pro % bílkovin (PH4) se stejnou korelací. U plemenné hodnoty pro kg bílkovin (PH5) byla nalezen statisticky významný rozdíl u genotypů -/- a +/-, kde je heterozygotní genotyp asociován s vyšší plemennou hodnotou. Byl zjištěn i statistický rozdíl blížící se průkaznosti u relativní plemenné hodnoty pro kg bílkovin (PH5) mezi genotypem -/- a +/-, viz. tabulka číslo 7.

Tab. 7 Asociace polymorfizmu indel 23 bp pro plemeno holštýnský skot (LSM \pm S_E)

Lokus pro 23 bp indel pro 68 jedinců			
23 bp	-/-	+/-	+/+
PH1	-26,18** ^b \pm 158,59	598,99** \pm 149,25	461,01 ^b \pm 218,55
PH2	-0,01** \pm 0,07	-0,13 \pm 0,06	-0,25** \pm 0,09
PH3	-2,74 \pm 5,55	8,06* \pm 5,17	-7,08* \pm 7,57
PH4	0,02** \pm 0,04	-0,04 ^a \pm 0,03	-0,12** ^a \pm 0,05
PH5	-0,91** \pm 5,0	17,18** ^a \pm 4,70	5,33 ^a \pm 6,90
RPHM	94,21** \pm 3,02	105,16** ^b \pm 2,84	98,39 ^b \pm 4,16

Hodnoty se stejnými exponenty v řádku vykazují následující statisticky významné rozdíly
 ** $P \leq 0,01$, *, ^b $P \leq 0,05$, ^a blíží se průkaznosti, LSM - průměrný nejmenší čtverec, S_E - střední chyba průměru

Vliv polymorfizmu indel 12 bp

Pro indel 12 bp byly nalezeny statisticky průkazné rozdíly mezi genotypy -/- a +/- pro PH5 a RPHM u plemene holštýnský skot a rozdíly blíží se průkaznosti u PH1. U plemene české strakaté tyto rozdíly pro plemenné hodnoty mléka nebyly nalezeny žádné asociace a pro masné plemenné hodnoty byl nalezen rozdíl blíží se statistické průkaznosti u RPH2, viz. tabulka číslo 8.

Tab. 8 Asociace polymorfizmu indel 12 bp pro plemeno holštýn (LSM \pm SE)

<i>H</i>	<i>Lokus pro 12 bp indel pro 68 jedinců</i>		
	<i>-/-</i>	<i>+/-</i>	<i>+/+</i>
<i>PH1</i>	508,92 ^a \pm 177,25	180,29 ^a \pm 137,38	-
<i>PH2</i>	-0,19 \pm 0,07	-0,06 \pm 0,06	-
<i>PH3</i>	-0,60 \pm 6,14	-0,58 \pm 4,76	-
<i>PH4</i>	-0,04 \pm 0,04	-0,05 \pm 0,03	-
<i>PH5</i>	13,10* \pm 5,61	1,28* \pm 4,34	-
<i>RPHM</i>	103,00* \pm 3,37	95,50* \pm 2,61	-

Hodnoty se stejnými exponenty v řádku vykazují následující statisticky významné rozdíly

** $P \leq 0,01$, * $P \leq 0,05$, ^a blíží se průkaznosti, LSM - průměrný nejmenší čtverec, S_E - střední chyba průměru

ZÁVĚR

Cílem mé práce bylo stanovení genotypů u vybraných polymorfizmů v genu *PRNP* u souboru skotu plemen holštýnský skot a českého strakatého a provést statistickou analýzu dat.

U holštýnského plemene byla nalezena dominantní frekvence genotypu 6/6 a nebyl nalezen genotyp 5/5. U plemene české strakaté byl také dominantním genotypem 6/6, ovšem byl nalezen i genotyp 5/5 a genotyp 6/5 měl vyšší frekvenci než u holštýnského skotu. Obě plemena se pro tento polymorfismus nacházejí v Hardy-Weinbergově rovnováze. U polymorfizmu indel 23 bp byla u holštýnského skotu nalezena nejvyšší frekvence heterozygotního genotypu, naopak u českého strakatého byl nejvíce zastoupen homozygotní genotyp pro deletovanou alelu. U polymorfizmu indel 12 bp byla u holštýnského skotu zjištěna nejvyšší frekvenci genotypu pro obě deletované alely -/-, ovšem heterozygotní genotyp byl také vysoce zastoupen, navíc byl u 2 jedinců zjištěn homozygotní genotyp +/+; tyto alely však nebyly zastoupeny u plemene české strakaté, kde převládal heterozygotní genotyp.

Pro indel polymorfizmy byly sestaveny pravděpodobné haplotypy, v nichž jsou zkombinovány efekty obou polymorfizmů. Haplotyp 23del/12del, který je spojen se zvýšeným nebezpečím výskytu BSE, byl nalezen v nejvyšší frekvenci u obou plemen. Zajímavé je, že vyšší předpokládanou frekvenci tohoto haplotypu měl český strakatý skot, i když holštýnský skot je plemeno, které je nejvíce spojováno s BSE. Haplotyp 23ins/12ins, který někteří autoři spojují s rezistencí, měl podobné zastoupení u obou plemen. U obou indelů bylo statisticky prokázáno, že se nalézají v oblasti s vysokou frekvencí vazbové nerovnováhy. Byl nalezen statisticky průkazný rozdíl u zastoupení genotypů v oktapeptidovém polymorfizmu a u genotypů 23 indel mezi testovanými plemeny, ovšem nebyl nalezen statisticky průkazný rozdíl ve variabilitě u genotypu indel 12 mezi plemeny.

Byla provedena asociační analýza genotypů 3 polymorfizmů v genu *PRNP*, přičemž nejvíce asociací měl 23 bp indel, který jako jediný byl testován ve všech třech genotypech u holštýnského skotu. Asociační analýza byla ovlivněna omezeným počtem býků s plemennými hodnotami v registrech a jejich nevyrovnaností v rámci roku narození a testování. Nicméně další asociační analýzy, s větším počtem vyrovnaných býků by mohla lépe odhalit asociaci mezi plemennými hodnotami a polymorfizmy v genu *PRNP*, tudíž i zřejmou funkcí prionového proteinu.

Vzhledem k tomu, že byly nalezeny podobné předpokládané haplotypové frekvence u býků českých plemen a holštýnského skotu v UK, dalo by se předpokládat obdobné zastoupení nemocných zvířat, což se nepotvrdilo. Obdobné frekvence byly zjištěny v Německu a dalších státech. Tato a další nejasnosti, jako například biologická funkce prionového proteinu, by měla motivovat vědce (a zvláště molekulární biology) k dalšímu výzkumu a objasnění přenosu a hlavně vzniku nemoci.

LITERATURA

- BRUNELLE, B.W., KEHRLI, M.E.JR., STABEL, J.R., SPURLOCK, D.M., HANSEN, L.B., NICHOLSON, E. M. Short Communication: Allele, Genotype, and Haplotype Data for Bovine Spongiform Encephalopathy-Resistance Polymorphisms from Healthy US Holstein Cattle. *Journal of Dairy Science*, 2008, vol. 91, p. 338-342.
- CZARNIK, U., ZABOLEWICZ, T., STRYCHALSKI, J., GRZYBOWSKI, G., BOGUSZ, M., WALAWSKI, K. Deletion/insertion polymorphism of the prion protein gene (PRNP) in Polish Holstein-Friesian cattle. *Journal of Applied Genetics*, 2007, vol. 48, no. 1, p. 69-71.
- DORMONT, D. Prion diseases: pathogenesis and public health concerns. *FEBS Letters*, 2002, vol. 529, p. 17-21.
- EXCOFFIER, L., LAVAL, G., SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 2005, vol. 1, p. 47-50.
- GELDERMANN, H., HE, H., BOBAL, P., BARTENSCHLAGER, H., PREUß, S. Comparison of DNA variants in the *PRNP* and *NFI* regions between bovine spongiform encephalopathy and control cattle. *Animal Genetics*, 2006, vol. 37, no. 5, p. 469-474.
- GOLDMANN, W. PrP genetics in ruminant transmissible spongiform encephalopathies. *Veterinary Research*, 2008, vol. 39, no. 4, p. 30.
- GURGUL, A., SŁOTA, E. Effect of Bovine PRNP Gene Polymorphisms on BSE Susceptibility in Cattle. *Folia Biologica*, 2007, vol. 55, no. 3-4, p. 81-86.
- HARRIS, D.A. Cellular biology of prion diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 1999, vol. 12, p. 429-444.
- HILLS, D., COMINCINI, S., SCHLAEPFER, J., DOLF, G., FERRETTI, L., WILLIAMS, J.L. Complete genomic sequence of the bovine prion gene (PRNP) and polymorphism in its promoter region. *Animal Genetics*, 2001, vol. 32, no. 4, p. 231-232.
- JEONG, B.H., SOHN, H.J., LEE, J.O., KIM, N.H., KIM, J.I., LEE, S.Y., CHO, I.S., JOOY, S., CARP, R.I., KIM, Y.S. Polymorphisms of the prion protein gene (PRNP) in Hanwoo (*Bos taurus coreanae*) and Holstein cattle. *Genes & Genetic Systems*, 2005, vol. 80, p. 303-308.
- JULING, K., SCHWARZENBACHER, H., WILLIAMS, J.L., FRIES, R. A major genetic component of BSE susceptibility. *BMC Biology*, 2006, vol. 4, p. 33-42.
- KNOWLES, T.P.J., ZAHN, R. Enhanced Stability of Human Prion Proteins with Two Disulfide Bridges. *Biophysical Journal*, 2006, vol. 91, p. 1494-1500.
- MACGREGOR, I. Prion protein and developments in its detection. *Transfusion Medicine*, 2001, vol. 11, no. 1, p. 3-14.

- MILUCHOVÁ, M., TRAKOVICKÁ, A., KULÍŠEK, V., BUJKO, J. Molekulový základ priónov, výskyt priónóz u ľudí a zvierat a ich klinická charakteristika a diagnostika. *Slovak Journal of Animal Science*, 2007, no. 2, vol. 40, p. 105-112.
- NAKAMITSU, S., MIYAZAWA, T., HORIUCHI, M., ONOE, S., OHOBA, Y., KITAGAWA, H., ISHIGURO, N. Sequence Variation of Bovine Prion Protein Gene in Japanese Cattle (Holstein and Japanese Black). *Journal of Veterinary Medical Science*, 2005, vol. 68, no. 1, p. 27-33.
- NOVAKOFSKI, J., BREWER, M.S., MATEUS-PINILLA, N., KILLEFER, J., MCCUSKER, R.H. Prion biology relevant to bovine spongiform encephalopathy. *Journal of Animal Science*, 2005, vol. 83, no. 6, p. 1455 - 1476.
- PREMZL, M., BOZIC, P., GAMULIN, V. PRNP octarepeat allele genotype frequencies among the modern and rare cattle breeds in Croatia. *Animal Genetics*, 2000, vol. 31, no. 6, p. 408 – 409.
- RAYMOND, M., ROUSSET, F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, 1995, vol. 86, p. 248-249.
- SANDER, P., HAMANN, H., PFEIFFER, I., WEMHEUER, W., BRENIG, B., GROSCHUP M.H., ZIEGLER, U., DISTL, O., LEEB, T. Analysis of sequence variability of the bovine prion protein gene (PRNP) in German cattle breeds. *Neurogenetics*, 2004, vol. 5, no. 1, p. 19-25.
- SAUNDER, G.C., GRIFFITHS, P.C., CAWTHRAW, S., TOUT, A.C., WIENER, P., WOOLLIAMS, J.A., WILLIAMS, J.L., WINDL, O. Polymorphisms of the prion protein gene coding region in born-after-reinforced-ban (BARB) bovine spongiform encephalopathy cattle in Great Britain. *Journal of General Virology*, 2007, vol. 88, p. 1374-1378.
- SEABURY, C.M., HONEYCUTT, R.L., ROONEY, A.P., HALBERT, N.D., DERR, J.N. Prion protein gene (PRNP) variants and evidence for strong purifying selection in functionally important regions of bovine exon 3. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*, 2004, vol. 101, p. 15142-15147.
- VRTKOVÁ, I., KÚBEK, A., FILISTOWICZ, A., ŘEHOUT, V., DVOŘÁK, J. The polymorphism of PRNP gene in cattle. *Acta fytotechnica et zootechnica*, 2001, vol. 4, p. 160-163.
- WALAWSKI, K., CZARNIK, U. Prion octapeptide-repeat polymorphism in Polish Black-and-White cattle. *Journal of Applied Genetics*, 2003, vol. 44, no. 2, p. 191-195.