

ASSOCIATION BETWEEN LACTOFERRIN GENE POLYMORPHISM AND BOVINE MAMMARY GLAND INFLAMMATION

Šrubařová P., Dvořák J.

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

E-mail: s.petra@volny.cz

ABSTRACT

Lactoferrin, glycoprotein, plays an important role in defense mechanism of mammary gland of milk producing animals. The amount of lactoferrin increases during inflammatory process and viral infections. *Lactoferrin* gene (*LTF*) is localized on the 22q24 bovine chromosome. In locus of *LTF* gene two different allelic variants were mapped. These variants code three different genotypes – *AA*, *AB* and *BB*. Genotype *AA* is associated with lower somatic cell count, genotype *AB* with higher somatic cell count. It was confirmed that *LTF* gene can be used as a genetic marker for somatic cell concentration in milk and as a marker for susceptibility/resistance to mastitis in dairy cows. Mastitis is one of the main reasons of decreasing cow's milk quality. Mastitis has an influence to composition and technological properties of milk. The aim of this study was to analyze *lactoferrin* gene polymorphism and evaluate interactions between genotypes of this gene and selected traits in chosen group of dairy cattle.

DNA was isolated from milk (n=49) using JETQUICK Blood & Cell Culture DNA Spin Kit (Genomed GmbH, Germany). PCR was performed according to SEYFERT and KUHN (1994). PCR product was restricted by *EcoRI*, fragments were visualized on 3% agarose gel. Genotypes were associated with somatic cell count, yield of milk and lactation. Data were processed by Proc GLM SAS 9.1.4. Two genotypes of *LTF* gene were found in this study: *AA* and *AB*, of frequencies equal to 57.14% and 42.86%, respectively. Genotype *BB* was not detected. It was established that no statistically significant association exist between the somatic cell count and *LTF* genotype, lactation and yield of milk. Some of the reasons of differences between studies could be different amount of animals, variation in frequencies of genotypes and alleles and fact that mastitis is multifactorial disease caused especially by pathogens. According to results of this study *lactoferrin* gene cannot be used as a marker for resistance/susceptibility to mastitis in dairy cattle.

Key words: *Lactoferrin* gene, Mastitis, Somatic Cell Count

Acknowledgments: Author would like to thank Anna Zielak-Steciwko from Institute of Animal Breeding, Faculty of Biology and Animal Science, University of Environmental and Life Sciences in Wrocław, Poland, for helpful advice and cooperation. This study was supported by Ministry of Agriculture of the Czech Republic (project No. 1G58073).

ÚVOD

Laktoferin, glykoprotein dříve známý jako laktotransferin, patří do skupiny transferinů. Molekulární hmotnost proteinu je 80 kDa (1). Podobně jako transferin je i laktoferin složen ze dvou vazebných míst pro železo (Fe^{3+}) a z bikarbonátového aniontu. Je hlavním proteinem v sekundárních granulech neutrofilů (4). Významným zdrojem laktoferinu jsou neutrofilové. Laktoferin má různé biologické funkce. Hraje významnou roli v metabolismu železa, dělení a proliferaci buněk a vyznačuje se také antibakteriální, antivirovou a antiparazitickou aktivitou (1). Laktoferin hraje důležitou roli v obranném mechanismu mléčných žláz zvířat produkujících mléko. Bakterie potřebují železo pro růst a laktoferin dokáže inhibovat výskyt těchto bakterií díky chelaci železa, může přímo zabít některé kmeny bakterií (2). Množství laktoferinu se výrazně zvyšuje během zánětlivého procesu a virového onemocnění (8). Poprvé byl laktoferin izolován z kravského mléka, následně potom i z mléka mateřského. Kromě mléka byl detekován např. ve slinách, slzách, nosních a průduškových sekretech, gastrointestinální tekutině, žluči a moči. Slezina a kostní dřeň obsahují velké množství tohoto proteinu. Množství laktoferinu v mléce je rozdílné mezidruhově – vyšší je u lidí, prasat a myší, nižší potom v kravském mléce a mléce ostatních přežvýkavců (3). Množství laktoferinu v kravském mléce se může výrazně zvýšit při výskytu mastitidy a stání na sucho (7).

Gen *laktoferin* (*LTF*) se skládá ze 17 exonů. Velikost genu je variabilní mezi druhy skotu, myším a lidským genem, a to od 23 do 35 kb. Hlavní rozdíl leží mezi exony 2 a 11, protože myší, kravský a prasečí *LTF* obsahuje o jednu až dvě aminokyseliny méně než *LTF* lidský (4). Exprese genu *LTF* byla poprvé detekována ve stádiu 2 - 4 buněk embryonálního vývoje (6). *LTF* gen skotu se nachází na chromozomu 22q24. V rámci tohoto genu byla zmapována mutace. V lokusu tohoto genu byly nalezeny dvě alely, alela *A* a alela *B*, které kódují tři rozdílné genotypy – *AA*, *AB*, *BB*. Genotyp *AA* je spojován s nízkým výskytem somatických buněk v mléce, kdežto u genotypu *AB* je počet somatických buněk nejvyšší. Počet somatických buněk se zvyšuje s narůstajícím věkem dojnice a obdobím laktace. Bylo potvrzeno, že *LTF* gen může sloužit jako genetický marker pro koncentraci somatických buněk v mléce a také jako marker pro rezistenci/náchylnost mléčných krav k mastitidě, onemocnění mléčné žlázy (5). Koncentrace laktoferinu v mléce je ovlivněna stádiem laktace a počtem somatických buněk (2).

Mastitida je jedno z onemocnění, které může postihnout dojný skot. Ve většině případů je způsobena především infekčními patogeny, mezi které patří zejména *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* a *Escherichia coli* (9). Rozdíly ve výskytu tohoto onemocnění jsou značné. Mléčná plemena pocházející z východní Francie (např. Montbeliarde) a střední Evropy (např. Simmental, Brown Swiss) mají nižší počet somatických buněk v mléce a výskyt klinické mastitidy než holštýnský skot. Existují i rozdíly v rámci plemene, které jsou způsobené zejména prostředím. Přímá selekce zvířat proti mastitidě je složitá, protože ve většině zemí nejsou případy výskytu mastitidy zaznamenávány a heritabilita tohoto onemocnění je velmi nízká (10).

Mastitida je jednou z hlavních příčin snižování kvality mléka skotu. Kromě smyslových vlastností mléka jsou narušeny i jeho fyzikální, biologické a nutriční vlastnosti a složení. Snižena je i jeho

technologická zpracovatelnost. Zdraví člověka je ohroženo patogeny, které se vyskytují v mléce nebo toxiny, které tyto patogeny produkují, popřípadě i rezidui antibiotik používaných při léčbě mastitid.

Cílem této práce bylo stanovit polymorfismus genu *laktoferin* u vybraného souboru dojného skotu a zjistit vztah mezi stanovenými genotypy a vybranými vlastnostmi mléka.

MATERIÁL A METODIKA

Vzorky mléka byly získány s klinicky zdravých dojnic holštýnského plemene skotu (n=49). Vzorky byly odebírány bez ohledu na věk dojnic a laktaci. Získané vzorky byly před následnými analýzami uchovány v mrazáku při -20 °C.

DNA byla izolována z mléka kolonkovou metodou pomocí kitu JETQUICK Blood & Cell Culture DNA Spin Kit (Genomed GmbH, Germany). Fragment genu *LTF* o délce 301 bp (base pair) byl namnožen pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) podle metodiky SEYFERT and KUHN (1994). PCR reakce proběhla v termálním cykluer MJ Research PTC-200 Peltier Thermal Cycler®. Získaný PCR produkt byl štěpen restriční endonukleázou *EcoRI* (Fermentas) při 37 °C po dobu 3 hodin. Tento restriční enzym rozpozná mutaci v genu *LTF* a rozštěpí PCR produkt o délce 301bp na fragmenty o délkách 201bp a 100bp. Pokud není fragment štěpen restriční endonukleázou, tzn. pokud se v úseku DNA nenachází mutace, jedná se o alelu *A*. Alela *B* je charakterizována dvěma fragmenty (201bp a 100bp). Získané fragmenty byly vizualizovány elektroforeticky na 3 % agarozovém gelu.

Stanovené genotypy byly porovnávány s počtem somatických buněk, množstvím nadojeného mléka a stádiem laktace dojnic. Data byla zpracována GLM procedurou programu SAS 9.1.4. Pro výpočet byla použita následující rovnice:

$$y = \mu + E_1 + E_2 + E_3 + e$$

kde:

y = počet somatických buněk (pozorovaná hodnota)

μ = průměr počtu somatických buněk

$E_1 - E_3$ = efekty: laktace, množství nadojeného mléka a *LTF* genotyp

e = náhodná reziduální chyba

VÝSLEDKY A DISKUZE

U sledovaného souboru zvířat byly u genu *LTF* detekovány genotypy *AA* a *AB*, genotyp *BB* se nevyskytl. Frekvence jednotlivých genotypů byly následující: genotyp *AA* 57.14 % a genotyp *AB* 42.86 %. Frekvence alely *A* byla 78.57 %, alely *B* byla 21.43 %. Při srovnání výsledků frekvencí alel s WODJDAK-MAKSZYMIĘC *et.al.* (2006) se data výrazně neliší (alela *A* 67.74 %; alela *B* 32.56 %). Rozdíl je ve frekvencích genotypů, a to z důvodu nepřítomnosti genotypu *BB* v řešené studii. To může být způsobeno výběrem zvířat pro tuto studii. Výběr byl náhodný, rozložení genotypů v populaci by mělo být rovnoměrné, a to v tomto případě není. Rozšířením počtu jedinců by se populace mohla dostat do genetické rovnováhy.

Podle WODJDAK-MAKSYMIEC *et al.* (2006) existuje statisticky průkazná asociace mezi počtem somatických buněk a *LTF* genotypem a laktací. Podle CHENG *et al.* (2007) byl gen *LTF* signifikantně asociován s laktací a denní produkcí mléka. Podle WODJDAK-MAKSYMIEC *et al.* (2006) je genotyp *AA* spojován s nízkým počtem somatických buněk v mléce, genotyp *AB* s vyšším počtem somatických buněk v mléce. Analýzou dat použitých v této studii nebyl stanoven statisticky průkazný rozdíl mezi genotypem genu *LTF* a počtem somatických buněk, množstvím nadojeného mléka a laktací. Pouze v případě asociace mezi počtem somatických buněk a genotypy *AA* a *AB* v první laktaci se vypočítaná hodnota blížila statistické průkaznosti (0.0569).

Jednou z možných příčin rozdílného výsledku analýz mezi výše zmíněnými publikacemi a vypracovanou studií může být velikost souboru zvířat použitých k analýze, dále pak v rozdílnost plemen a to, že se studovaná populace nenachází v genetické rovnováze. Navýšením počtu jedinců může dojít k tomu, že populace bude v genetické rovnováze, tzn. že při laboratorní analýze budou detekovány všechny možné alely a genotypy genu *laktiferin*. Další příčinou toho, že výsledek asociační analýzy nebyl statisticky průkazný, může být i to, že mastitida je onemocnění, které není způsobeno jen jednou příčinou. Je to polyfaktorové onemocnění, na jejím vzniku se podílí celá řada činitelů vnějšího prostředí, a proto asociační analýza vybraného genu a vlastností nemusí být statisticky průkazná.

ZÁVĚR

Mastitidy představují problém především ve snížení kvality mléka a jeho zpracování. Podle recentních publikací je gen *laktiferin* vhodným markerem pro množství somatických buněk v mléce, tedy jako marker pro náchylnost/rezistenci mléčného skotu k mastitidám. Cílem této práce bylo stanovit polymorfismus genu *laktiferin* u vybrané populace holštýnského skotu a provést asociační analýzu mezi stanovenými genotypy genu *LTF* a vybranými znaky (počet somatických buněk, množství nadojeného mléka, laktace). Výsledky získané v této studii hypotézu, že *LTF* gen je vhodným molekulárně-genetickým markerem pro náchylnost/rezistenci dojného skotu k mastitidám, nepotvrzují. Jednou z příčin, proč nebyla prokázána žádná asociace mezi polymorfismem genu *LTF* a vybranými znaky, může být velikost populace, popřípadě plemeno dojného skotu a také fakt, že mastitida je ve většině případů způsobena různými činiteli vnějšího prostředí. V další studii bude otestován větší soubor zvířat, provedena asociační analýza a výsledky porovnány s recentní literaturou.

LITERATURA

- (1) ADLEROVA, L., BARTOSKOVA, A., FALDYNA, M.. Lactoferrin: a review. *Veterinari Medicina*. 2008, no. 53, s. 457-468.
- (2) CHENG, J.B., et al. Factors affecting the lactoferrin concentration in bovine milk. *J.Dairy Sci*. 2007, no. 91, s. 970-976.
- (3) ÖZTAS, Y.E., ÖZGÜNES, N. Lactoferrin: a multifunctional protein. *Adv.Mol.Med*. 2005, no. 4, s. 149-154.
- (4) TENG, Ch.T. Lactoferrin gene expression and regulation: an overview. *Biochem.Cell Biol*. 2002, no. 80, s. 7-16.

- (5) WODJAK-MAKSYMIEC, K., KMIEC, M., ZIEMAK, J. Associations between bovine lactoferrin gene polymorphism and somatic cell count in milk. *Veterinari Medicina*. 2006, no. 51, s. 14-20.
- (6) WARD, P.P., PAZ, E., CONNEELY, O.M. Multifunctional roles of lactoferrin: a critical overview. *Cell.Mol.Life Sci.* 2005, no. 62, s. 2540-2548.
- (7) O'HALLORAN, F., et al. Characterisation of single nucleotide polymorphism identified in the bovine lactoferrin gene sequences across a range of dairy cow breeds. *Biochimie*. 2009, no. 91, s. 68-75.
- (8) KANYSHKOVA, T.G., BUNEVA, V.N., NEVINSKY, G.A.. Lactoferrin and its biological functions. *Biochemistry*. 2001, vol. 66, no. 1, s. 5-13.
- (9) CHANETON, L., et al. Relationship between milk lactoferrin and etiological agent in the mastitic bovine mammary gland. *J.Dairy Sci.* 1.1.2008, vol. 91, no. 5, s. 1865-1873.
- (10) RUPP, R., BOICHARD, D.. Genetics of resistance to mastitis in dairy cattle. *Vet.Res.* 1.1.2003, no. 34, s. 671-688.
- (11) SEYFERT, H.M., KUHN, C. Characterization of a first bovine lactoferrin gene variant, based on EcoRI polymorphism. *Animal Genetics*. 1994, no. 25, s. 54.