

ŠTUDIJA POVEZAVE GENETSKIH VPLIVOV NA SOMATSKE CELICE V MLEKU PRI GOVEDU RJAVE PASME

ASSOCIATION STUDY OF GENETIC EFFECTS ON SOMATIC CELL COUNT IN MILK OF THE BROWN SWISS CATTLE

Daša JEVŠINEK SKOK¹, Janez JERETINA¹

IZVLEČEK

Subklinični mastitisi so pogosta bolezen krav molznic, ki jih lahko povzročijo okoljski ali kužni bolezenski povzročitelji. V splošnem ločimo subklinično in klinično obliko mastitisa, katero določa stopnja vnetja mlečne žleze in izražanje bolezenskih znakov. Za razliko od klinične oblike, pri subklinični obliki ni vidnih vnetnih znakov v mleku ali na sami mlečni žlezi, zato so za odkrivanje te oblike mastitisa potrebni posebni diagnostični testi. Število somatskih celic (SCC) je pri tem najpogostejši in najzanesljivejši kazalnik sprememb v mlečni žlezi, nastalih zaradi vnetnih procesov. Cilj naše raziskave je bil preučiti genetske vplive na kazalnike subkliničnega mastitisa v slovenski populaciji rjavega goveda. V ta namen smo analizirali vpliv polimorfizmov posameznih nukleotidov (SNP) na predhodno razviti indeks presežka somatskih celic (IPSC) za krave rjave pasme, ki so bile genotipizirane z uporabo SNP mikromrež ICBF International "Dairy and Beef v3" (ICBF, Irska). Dokazali smo vpliv nekaterih SNP označevalcev na kazalnike subkliničnega mastitisa. Ti lokusi lahko služijo kot močni kandidati za selekcijske programe s pomočjo označevalcev pri naših in morda tudi drugih populacijah govedi. Rezultati analize lahko pripomorejo k razvoju molekularnih označevalcev za uporabo v selekcijskih programih goveda za učinkovitejšo odbiro živali, ki imajo zelen genotip za večjo odpornost na subklinične mastitise, temelječe na genetskih označevalcih.

Ključne besede: govedo, subklinični mastitis, geni, DNA mikromreže, indeks presežka somatskih celic (IPSC)

ABSTRACT

Subclinical mastitis is very prevalent disease that affects cows in milk production herds caused by contagious and environmental pathogens. In general, mastitis is classified as clinical or subclinical depending on the degree of inflammation in the mammary gland. Since there are no visible abnormalities in the milk or udder, subclinical mastitis requires special diagnostic tests for detection. Somatic cell count (SCC) is the most common test to detect changes in the milk due to the inflammatory process. In this study, the aim was to identify new candidate genetic markers for subclinical mastitis indicators in Slovenian population of Brown Swiss cattle (BS). For that purpose, we analysed the association between single-nucleotide polymorphisms (SNPs) and previously developed somatic cell index (SCCI) for BS cows, which was genotyped using SNP microarray ICBF International Dairy and Beef v3 (ICBF, Ireland). The analysis revealed SNP markers with a significant effect on subclinical mastitis indicators. Those loci can serve as strong candidates for the marker-assisted selection programs in our and possibly other populations of dairy cattle. Results of this study can contribute to the development of molecular markers in cattle selection programs allowing more effective, marker assisted selection for animals with genotype for reduced incidence of subclinical mastitis.

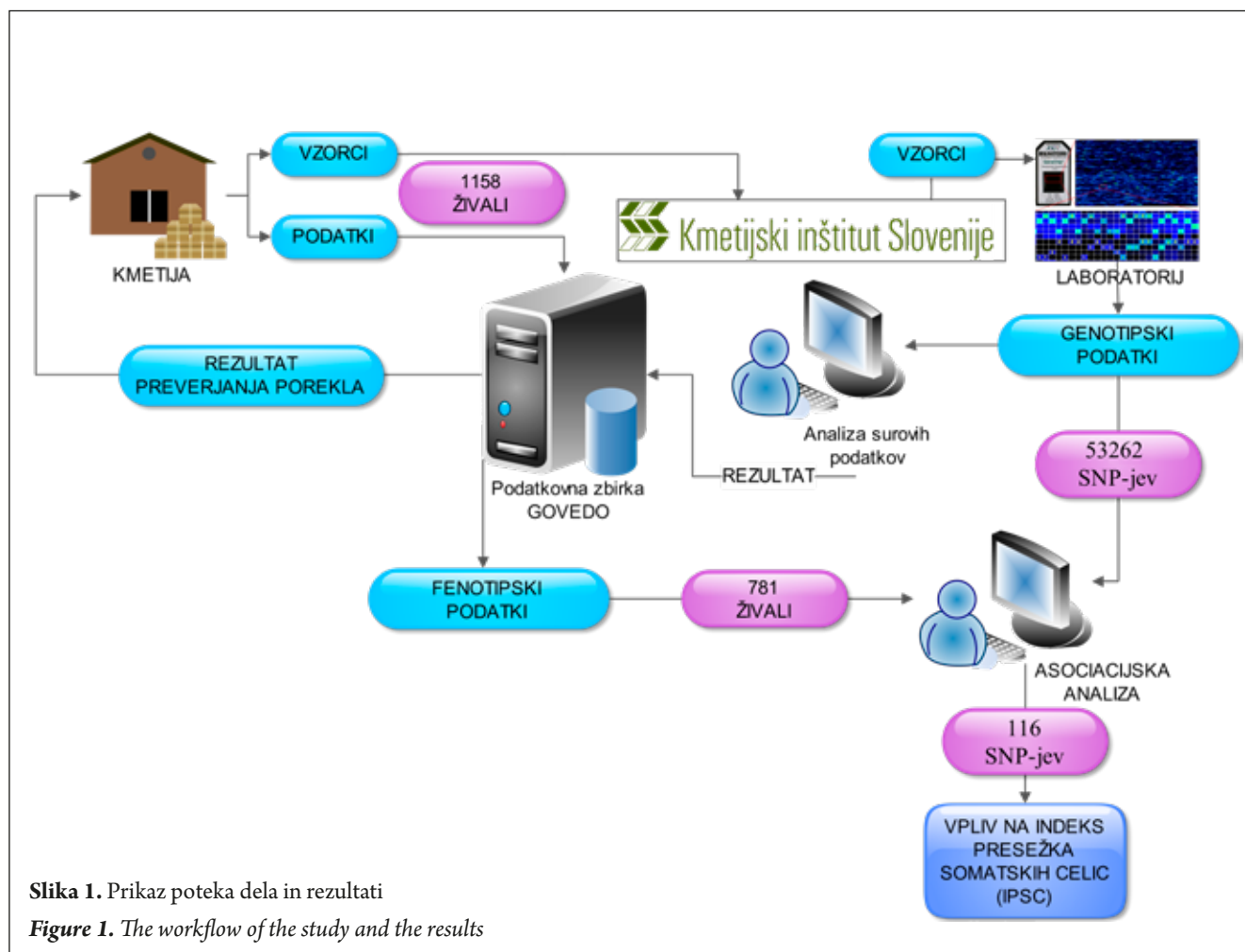
Keywords: cattle, subclinical mastitis, genes, SNP-array, somatic cell index (SCCI)

1 UVOD

Mastitis je zelo razširjena bolezen krav molznic, ki jo povzročajo nalezljivi in okoljski patogeni. Znanih je veliko dejavnikov tveganja, povezanih z mastitisom, kot so: prisotnost mikroorganizmov, okolje ali tehnologija reje (Rahularaj in sod., 2019). Poznamo klinično in subklinično obliko mastitisa, odvisno od poteka vnetja mlečne žleze. Za klinični mastitis (KM) so značilne vidne spremembe v mleku ali na vimenu, subklinični mastitis (SM) pa je vnetje mlečne žleze brez vidnih sprememb. Živali same po sebi ne kažejo očitnih kliničnih znakov bolezni, zato SM predstavlja skrito grožnjo na videz zdravim kravam v čredah. Razvoj bolezni poleg zmanjšane dobrobiti in dolgoživosti živali vodi k manjši priraji mleka ter poslabšanju kakovosti le-tega. Razmeroma zanesljiv in dostopen indikator subkliničnih mastitisov so somatske celice (SC), ki so odziv imunskega sistema na okužbo in zato bistvenega pomena. Število somatskih celic (ŠSC) s pridom izkoriščamo pri interpretaciji zdravstvenega stanja mlečne žleze. Določeno ŠSC je prisotno tudi v mleku popolnoma zdravih krav, vendar takrat govorimo o normalnem številu, ki znaša med 50.000 in 150.000. Število SC v mleku se praviloma takoj po telitvi poveča in po nekaj dneh pade na normalne vrednosti, nato

pa se proti koncu laktacije postopoma povečuje. V predhodnih študijah smo ovrednotili dnevne izgube mleka na ravni krave v odvisnosti od stadija laktacije zaradi SM oziroma povečanega ŠSC ob upoštevanju zaporedne laktacije in intenzivnosti mlečne prireje (Jeretina in sod., 2017). V ta namen smo razvili nov kazalnik presežka ŠSC. Indeks presežka ŠSC (IPSC) je kumulativna vrednost izračunana na podlagi ŠSC, trajanja povečanega ŠSC in stadija laktacije.

Odziv živali na okužbo s patogenimi organizmi je odvisen od več dejavnikov, med njimi tudi genetskih. Hiter razvoj molekularno-genetskih tehnik je privedel do uvedbe novega načina selekcije (genomske selekcije), saj so informacije o genomu posamezne živali bistveno bolj dostopne kot še pred nekaj leti. Uvedba genomske selekcije predstavlja številne prednosti, kot so: krajši generacijski interval, uporaba živali ob spolni zrelosti, povečevanje točnosti napovedi plemenskih vrednosti, nižja stopnja inbridinga ipd. Kljub temu, da so znani nekateri genetski vzroki za odpornost na mastitis (Sender in sod., 2013) je za boljše razumevanje genske arhitekture te zapletene bolezni potreben razvoj dovolj informativnih genetski označevalcev, ki omogočajo hitrejšo in natančnejšo odbiro goveda, odpornega na mastitis. Cilj naše študije je bil poiskati nove potencialne označevalce za



SM. V ta namen smo analizirali vpliv polimorfizmov posameznih nukleotidov (SNP) na predhodno razviti indeks presežka somatskih celic (IPSC) za krave rjave pasme (RJ). Potek študije je prikazan na sliki 1.

2 MATERIAL IN METODE

V obdelavo podatkov smo vključili 1158 genotipiziranih živali slovenske populacije RJ, ki jih zbiramo v centralni podatkovni zbirki Govedo na Kmetijskem inštitutu Slovenije (Jeretina in sod., 1997). Krave RJ smo genotipizirali z uporabo DNA-mikromreže "ICBF International Dairy and Beef v3" (ICBF, Irska) za skupno 53.262 polimorfizmov posameznega nukleotida (angl. SNP; single nucleotide polymorphism). Polimorfizme smo ovrednotili z uporabo spletnega orodja SNPChimp v3 (Nicolazzi in sod., 2015). Genotipske podatke smo združili s fenotipskimi podatki, s čimer smo dobili nabor podatkov za 781 krav s po vsaj tremi standardnimi laktacijami trajajočimi najmanj 200 dni. Na genomskih podatkih smo naredili test kontrole kakovosti (angl. QC: Quality control), za kar smo uporabili orodje PLINK (Purcell in sod., 2007). V analizo smo vključili 781 živali, kjer smo analizirali vpliv 18.136 SNP-jev na IPSC. Vrednosti IPSC smo pridobili iz centrale podatkovne zbirke Govedo. Asociacijsko analizo smo izvedli s statističnim paketom lme4 v programski opremi R (Bates in sod. 2015), pri tem smo uporabili sledeči model:

$$y_{ijklm} = \mu + P_i + G_j + M_k + b(x_{ijklm} - \bar{x}) + sh_l + e_{ijklm} \quad (1)$$

kjer y_{ijklm} predstavlja IPSC, μ srednjo vrednost za IPSC, P_i laktacijo ($i = 1-3$), G_j genotip ($j = 1-18.136$), M_k način reje ($k = 1-2$), x_{ijklm} starost ob prvi telitvi, sh naključni vpliv bika znotraj črede in e_{ijklm} naključni ostanek.

Genomske lokacije polimorfizmov in genov, ki kodirajo proteine (angl. protein coding genes) smo pridobili iz podatkovne

zbirke Ensembl Biomart Release 94 (Aken in sod., 2016). Genska nomenklatura je temeljila na smernicah HUGO o genski nomenklaturi (<http://www.genenames.org>). V celotnem besedilu so genomske lokacije SNP-jev in genov poenotene na verzijo govejega genoma UMD3.1 (Zimin in sod., 2009). Podatke smo uvozili v podatkovno zbirko Oracle in s stavki SQL poiskali polimorfizme znotraj protein-kodirajočih genov. Genomski prikaz polimorfizmov povezanih z IPSC in prekrivajočih genov smo izvedli z vizualizacijskim orodjem Flash GViewer (<http://gmod.org/wiki/Flashgviewer/>). Za pregled literature smo uporabili zbirko znanja GeneRIF (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/about-generif>).

3 REZULTATI IN DISKUSIJA

Za preverjanje vpliva genetske variabilnosti 18.136 polimorfizmov na IPSC smo imeli na voljo predhodno izračunane vrednosti za 781 krav molznic rjave pasme. Z analizo smo ugotovili, da 116 SNP-jev vpliva na IPSC. Deset najbolj statistično značilnih razlik v IPSC glede na genotip živali je prikazanih v tabeli 1. Statistično najvišje razlike smo opazili med IPSC in rs109726632 ($p = 0,00019$) ter rs43665600, ki se nahaja v intronu gena *LTBP1* ($p = 0,00025$). Ocene srednje vrednosti po metodi najmanjših kvadratov za IPSC je najvišja pri živalih z alelna različico AA za SNP rs109594954, ki se nahaja na kromosomu BTA18, medtem ko je srednja vrednost najnižja pri živalih z alelna različico AA za SNP rs43665600 (tabela 1). Največjo razliko v oceni srednje vrednosti po metodi najmanjših kvadratov za IPSC smo opazili med homozigoti za SNP rs109726632 (-3,80) in SNP rs41677295 (3,65) v genu *TMEM255B*.

Genomske lokacije polimorfizmov z vplivom na IPSC smo prekrili z genomskimi lokacijami protein-kodirajočih genov (slika 2A). Ugotovili smo, da se 48 SNP-jev nahaja v intronih 46-ih genov, ostali SNP-ji so medgenski. Največ SNP-jev z vplivom na IPSC je lociranih na kromosomu BTA12 (14 SNP-jev), sledita mu kromosoma BTA11 in BTA5 z 11 oz. 10 SNP-ji

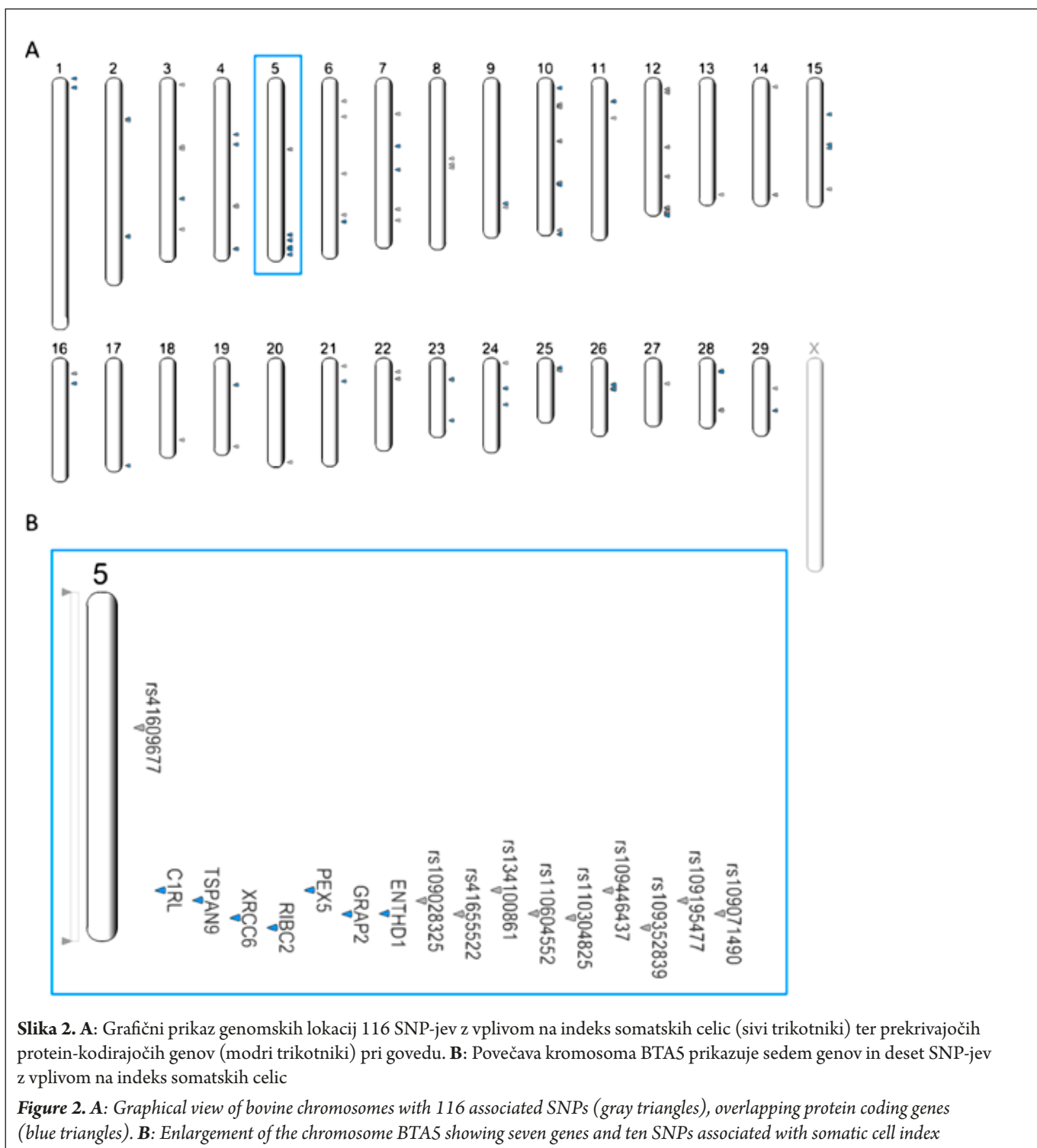
Tabela 1. Ocenjene vrednosti za IPSC za deset najbolj statistično značilnih razlik med IPSC in SNP

Table 1. Estimated values of IPSC for ten the most significant differences between IPSC and SNP

SNP	Ime probe	AA	AB	BB	GEN	P-vrednost
rs109726632	ARS-BFGL-NGS-114545	10,38	8,85	6,58	/	0,00019
rs43665600	BTB-00462303	6,31	8,97	9,87	<i>LTBP1</i>	0,00025
rs110803484	ARS-BFGL-NGS-60044	7,42	9,61	10,71	/	0,00029
rs41677295	ARS-BFGL-NGS-44210	7,43	9,38	11,09	<i>TMEM255B</i>	0,00034
rs109352839	ARS-BFGL-NGS-7979	11,08	8,98	7,53	<i>RIBC2</i>	0,00045
rs108946848	ARS-BFGL-NGS-58080	10,93	8,19	8,36	/	0,00060
rs41663102	Hapmap48138-BTA-96848	7,42	9,92	10,03	/	0,00094
rs109049782	BovineHD0600004157	7,02	9,03	9,89	/	0,00094
rs109088129	ARS-BFGL-BAC-10952	10,38	8,75	7,24	/	0,00104
rs41848307	ARS-BFGL-NGS-6902	10,19	7,94	7,66	/	0,00107

(slika 2B). Največ prekrivanj SNP-jev z vplivom na IPSC znotraj protein-kodirajočih genov je na kromosomu BTAS, in sicer SNP rs109028325 je intronski SNP v genu *TSPAN9*, rs109071490 v *ENTHD1*, rs109352839 v *RIBC2*, rs109446437 v *C1RL*, rs110304825 v *XRCC6*, rs134100861 v *PEX5* in rs41655522 v genu *GRAP2*.

Za gene, ki se prekrivajo s SNP-ji z vplivom na IPSC smo v literaturi preverili ali so bili predhodno že povezani z mastitisom ali s katerim drugim znanim vnetnim procesom v telesu sesalcev. Ugotovili smo, da so bili geni *GAS6*, *SLCO3A1* in *NCAM1* predhodno že povezani z vnetnimi procesi pri ljudeh (Hurtado in de Frutos, 2010; Wei in sod., 2014; Krissansen in sod., 2015) in miših (Han in sod., 2016).



4 ZAKLJUČKI

Študija predstavlja obsežno asociacijsko analizo, kjer smo preučevali vpliv polimorfizmov na kazalnike subklinične oblike mastitisa. Indeks presežka somatskih celic je kumulativna vrednost izračunana na podlagi ŠSC, trajanja povečanega ŠSC in stadija laktacije. Somatske celice so odziv imunskega sistema na okužbo in zato bistvenega pomena za interpretacijo zdravstvenega stanja mlečne žleze. Z analizo smo dokazali vpliv 116 SNP-jev na IPSC pri kravah pasme RJ. Nekateri geni, ki se prekrivajo z lokacijami SNP-jev z vplivom na IPSC so bili predhodno že povezani z vnetnimi procesi pri drugih sesalcih, zato bi bilo smiselno te gene podrobneje preučiti tudi v povezavi s SM pri krava saj lahko ti geni služijo kot močni kandidati za selekcijske programe s pomočjo markerjev pri naših in morda drugih populacijah goveda.

5 LITERATURA

Aken, B.L., Ayling, S., Barrell, D., Clarke, L., Curwen, V., Fairley, S., Fernandez Banet, J., Billis, K., García Girón, C., Hourlier, T., Howe, K., Kähäri, A., Kokocinski, F., Martin, F.J., Murphy, D.N., Nag, R., Ruffier, M., Schuster, M., Tang, Y.A., Vogel, J.-H., White, S., Zadissa, A., Flicek, P., Searle, S.M.J. 2016. The Ensembl gene annotation system. Database: The Journal of Biological Databases and Curation.

Bates, D., Maechler, M., Bolker, B., Walker, S. 2015. Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *Journal of Statistical Software*, 67: 1-48.

Han, J., Bae, J., Choi, C.-Y., Choi, S.-P., Kang, H.-S., Jo, E.-K., Park, J., Lee, Y.S., Moon, H.-S., Park, C.-G., Lee, M.-S., Chun, T. 2016. Autophagy induced by AXL receptor tyrosine kinase alleviates acute liver injury via inhibition of NLRP3 inflammasome activation in mice. *Autophagy*, 12: 2326-2343.

Hurtado, B., de Frutos, P.G. 2010. GAS6 in systemic inflammatory diseases: with and without infection. *Critical Care (London, England)*, 14: 1003.

Jeretina, J., Ivanovič, B., Podgoršek, P., Perpar, T., Logar, B., Sadar, M., Jenko, J., Glad, J., Božič, A., Žabjek, A., Babnik, D., Verbič, J. 1997. Centralno podatkovna zbirka Govedo. Kmetijski inštitut Slovenije, Ljubljana. <http://www.govedo.si>.

Jeretina, J., Škorjanc, D., Babnik, D. 2017. A new somatic cell count index to more accurately predict milk yield losses. *Archives Animal Breeding*, 60: 373-383.

Krissansen, G.W., Yang, Y., McQueen, F.M., Leung, E., Peek, D., Chan, Y.C., Print, C., Dalbeth, N., Williams, M., Fraser, A.G. 2015. Overexpression of miR-595 and miR-1246 in the sera of patients with active forms of inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, 21: 520-530.

Nicolazzi, E.L., Caprera, A., Nazzicari, N., Cozzi, P., Strozzi, F., Lawley, C., Pirani, A., Soans, C., Brew, F., Jorjani, H., Evans, G., Simpson, B., Tosser-Klopp, G., Brauning, R., Williams, J.L., Stella, A. 2015. SNPchiMp v.3: integrating and standardizing single nucleotide polymorphism data for livestock species. *BMC Genomics*, 16.

Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M.A.R., Bender, D., Maller, J., Sklar, P., de Bakker, P.I.W., Daly, M.J., Sham, P.C. 2007. PLINK: A Tool Set for Whole-Genome Association and Population-Based Linkage Analyses. *American Journal of Human Genetics*, 81: 559-575.

Rahularaj, R., Deshapriya, R.M.C., Ranasinghe, R.M.S.B.K. 2019. Influence of bovine sub-clinical mastitis and associated risk factors on calving interval in a population of crossbred lactating cows in Sri Lanka. *Tropical Animal Health and Production*.

Sender, G., Korwin-Kossakowska, A., Pawlik, A., Hameed, K.G.A., Oprządek, J. 2013. Genetic Basis of Mastitis Resistance in Dairy Cattle-A Review/ Podstawy Genetyczne Odporności Krów Mlecznych Na Zapalenie Wymienia-Artykuł Przeglądowy. *Annals of Animal Science*, 13: 663673.

Wei, S.-C., Tan, Y.-Y., Weng, M.-T., Lai, L.-C., Hsiao, J.-H., Chuang, E.Y., Shun, C.-T., Wu, D.-C., Kao, A.-W., Chuang, C.-S., Ni, Y.-H., Shieh, M.-J., Tung, C.-C., Chen, Y., Wang, C.-Y., Xavier, R.J., Podolsky, D.K., Wong, J.-M. 2014. SLCO3A1, A novel crohn's disease-associated gene, regulates nf- κ B activity and associates with intestinal perforation. *PLoS One*, 9: e100515.

Zimin, A.V., Delcher, A.L., Florea, L., Kelley, D.R., Schatz, M.C., Puiu, D., Hanrahan, F., Pertea, G., Van Tassell, C.P., Sonstegard, T.S., Marçais, G., Roberts, M., Subramanian, P., Yorke, J.A., Salzberg, S.L. 2009. A whole-genome assembly of the domestic cow, *Bos taurus*. *Genome Biology*, 10: R42.