

Genetiese merkers in die bloed van diere - 'n geskiedkundige oorsig

D.R. Osterhoff

Departement Etologie, Fakulteit Veeartsenykunde, Universiteit van Pretoria, Pretoria, 0002

Ontvang 15 Oktober 1996; aanvaar 4 April 1997

UITTREKSEL

In hierdie oorsig is gepoog om die belangrikste gebeurtenisse in die soeke na genetiese merkers in die bloed van diere aan te haal. In volgorde is bloedgroepe, biochemiese polimorfismes, limfosiet-antigene en DNS-merkers ontdek en in die praktyk gebruik.

Van al die praktiese toepassings het ouerskap- en vaderskapbepalings die meeste belangstelling verkry en dit kan met trots genoem word dat ook die Suid-Afrikaanse Stamboek se gegewens as korrek beskou kan word.

ABSTRACT

Genetic markers in the blood of animals - a historical overview

In this review an attempt is made to list the most important events in the search for genetic markers in the blood of animals. In chronological order there are blood groups, biochemical polymorphisms, lymphocyte antigens and the DNA markers that have been discovered and used in practice.

Of all practical uses the parentage verification and exclusion are regarded as most important and it can be said with pride that the South African Stud Book is as infallible as any other studbook in the world.

INLEIDING

Die studie van genetiese merkers in die bloed van diere het reeds honderd jaar gelede 'n aanvang geneem toe Landsteiner in 1900 individuele verskille in die bloed van bokke waargeneem het.¹ Sonder om in te veel tegniese besonderhede in te gaan, sal in hierdie oorsig aangetoon word wat veral in die laaste dekades ten opsigte van genetiese merkers bereik is.

Van al die praktiese toepassings - ingesluit die diagnose van tweelinge, vroeë diagnose van kwene, studies van populasiestrukture, verandering van graad van inteling, studies van geslagsgedrag in kuddes en verwante probleme het ouerskap- en vaderskapbepalings die meeste belangstelling van boere en telersverenigings gekry. Die toepaslike waarde van hierdie toetse is gou beseef en telersgenootskappe maak ten volle gebruik daarvan. Op die wyse word hulle lede verseker dat die Suid-Afrikaanse Stamboek so onfeilbaar as moontlik is.

Die basiese beginsel van ouerskapbepaling berus op die Mendelse wette: Die Mendelse wet van dominansie sluit 'n nageslag uit as dié 'n merker besit wat nie ten minste by een van die ouers voorkom nie. Die Mendelse wet van segregasie sluit 'n ouer uit wat nie deel het in 'n genetiese merker wat aan 'n nageslag oorgedra moes gewees het nie.

Die studie van genetiese merkers, veral die van rooibloedsel-antigene, het na die Tweede Wêreldoorlog met rasse skrede vooruitgegaan. Stormont het 'n fenomenale bydrae gelewer deurdat hy die bloedgroepe van beeste reeds in die vyftigerjare in genetiese sisteme geplaas en veral die B-sisteem met meer as 600 allele gerangskik het.²

Die ontplooiing ook in ander diersoorte was besonder snel en in 1996 was daar nie minder nie as 102 laboratoriums wêreldwyd waar navorsers besig is om genetiese merkers op te spoor en in die verbetering van plaasdiere te benut. Veral in die VSA waar nuwe tegnieke ontwikkel is, het die ontdekking van groot reekse immunogenetiese verskille met rasse skrede vooruitgegaan en daar is tans elf laboratoriums, waarvan die meeste as leiers op die gebied beskou kan word.

DIE STAND VAN BLOEDGROEPE AS GENETIESE MERKERS BY DIERE

Bloedfaktore op die rooibloedselle (rooisel-antigene) wat deur agglutinasie of hemolise bepaal word, was die eerste van die genetiese merkers wat volledig nagevors is. Dit is van pas om die stand van sake by beeste, skape, varke, perde en honde in die volgende tabel te toon.³

| TABEL 1 Die stand van bloedgroepe by plaas- en geselskapsdiere ³ | | | |
|---|---------------|--------------------|--------------|
| Diersoort* | Getal Sisteme | Getal Bloedfaktore | Getal Allele |
| Beeste | 11 | 121 | 709 |
| Skape | 7 | 22 | 69 |
| Varke | 15 | 76 | 76 |
| Perde | 7 | 26 | 36 |
| Honde | 11 | 12 | 24 |

* Die oorerwing van bloedgroepe by bokke⁴ en katte⁵ is nog nie volledig opgeklar nie, dus is dié twee diersoorte nie in die tabel ingesluit nie.

Die soek na nuwe rooibloedsel-antigene en -allele het sy hoogtepunt in die sestigerjare gehad. In die tagtigerjare het hierdie navorsing prakties tot 'n einde gekom en 'n klemverskuiwing na ander genetiese merkers het plaasgevind.

BIOCHEMIESE POLIMORFISMES

Die bepaling van biochemiese polimorfismes deur elektroforese het tot die ontdekking van 'n groot verskeidenheid genetiese merkers gelei. Verskillende media soos stysel, agarose of akriëlamied-jel word in die elektroforese gebruik om genetiese verskille tussen diere in die proteïene en ensieme sigbaar te maak. By alle diersoorte is daar 'n groot aantal sisteme met die toepaslike allele gevind. As voorbeeld word in tabel 2 die huidige

stand van die ondersoek na biochemiese polimorfismes by perde getoon, soos dit huidige in die laboratoriums te Onderstepoort uitgevoer word.^{5,6}

| Sisteem | Lokus-simbool | Erkende allele |
|--------------------------------|---------------|--|
| Albumien | ALB | A B 1 |
| Suurfosfatase | AP | F S |
| Karboonanhidrase | CA | E F I L O S |
| Katalase | Cat | F S |
| NADH-diaforase | Dia | F S |
| Esterase | Es | F G H I L M O R S |
| Peptidase | Pep A | F S |
| Vit. A-bindingsproteïen | Gc | F S |
| Hemoglobien | Hb | A A I I B I B I I N V |
| 6-fosfoglukonaat-dehidrogenase | PGD | D F S |
| Fosfoglukomutase | P G M | F S V |
| Fosfoheksose-isomerase | PHI | F I S |
| Protease-inhibeerder | Pi | F G H I J K L ₁ L ₂ N O P Q R S T U V W Z |
| Transferrien | Tf | D D ₂ E F ₁ F ₂ F ₃ G H ₁ H ₂ J M O R |
| A1B Glukoproteïen | A1B | F K S |
| Glukofosfo-isomerase | GPI | F I L S |
| Plasminogeen | PLG | 1 2 |

Internasionaal word toetse van bloedgroepe en biochemiese merkers nog as standaard vir ouerskapkontrolle aanvaar, maar daar word reeds DNS-toetspaneel wêreldwyd beskikbaar gestel.

DIE HOOFWEEFSELVERENIGBAARHEIDSKOMPLEKS (HWK)

Dit is bekend dat oorgeplante organe en weefsels in die meeste gevalle deur die ontvanger verwerp word. As die skenker egter aan die ontvanger verwant is, word die verwerpingreaksie beduidend verminder, wat dus op die genetiese basis vir die reaksie dui.

Die natuurlik voorkomende seloppervlakte-antigene (limfosiet-antigene LA) wat hiervoor verantwoordelik is, word hoofweefselverenigbaarheidskompleks (HWK) genoem (Eng. major histocompatibility complex MHC). 'n Goë uiteensetting van die HWK-sisteme word deur Newman en Antczek⁷ gegee.

Tabel 3 verduidelik die belangrikste HWK-sisteme.⁸

| Spesie | Naam | Simbool |
|----------|-------------------------|---------|
| Muis | H-2 | H-2 |
| Rot | RT1 | RT1 |
| Hond | hondlimfosiet-antigeen | DLA |
| Vark | varklimfosiet-antigeen | SLA |
| Bok | boklimfosiet-antigeen | GLA |
| Skaap | skaaplimfosiet-antigeen | OLA |
| Bees | beeslimfosiet-antigeen | BoLA |
| Perd | perdlimfosiet-antigeen | ELA |
| Resusaap | resuslimfosiet-antigeen | RhLA |
| Mens | menslimfosiet-antigeen | HLA |

By muise is die meeste navorsingswerk voltooi en meer as 30 genetiese lokusse is geïdentifiseer.⁸ In die jare tagtig het studies op limfosiet-antigene (LA) met groot skrede vooruit gegaan. Hoofsaaklik by beeste (BoLA), maar ook by varke (SLA) en perde (ELA) word die moontlike verband tussen HWK en siektetoleransie nagevors.

DNS-MERKERS

Die ondersoek van deoksiribonukleïensuur (Eng. DNA) het die deurbraak in die negentigerjare behaal, en sal mettertyd die bogenoemde genetiese merkers, die rooiselantigene, die biochemiese polimorfismes en die hoofweefselverenigbaarheidskompleks vervang.

Die groot voordeel van die DNS-bepalings is die direkte ondersoek van genetiese materiaal en enige bron van DNS, byvoorbeeld bloed en haarwortels is geskik. Die feit dat die DNS-toetsing nie aan vars bloedmonsters gebind is nie, het 'n soeke in tientalle laboratoriums aan die gang gesit.

Daar word vergelykings getref tussen veelvoudige lokus-vingerafdrukke (=minisatelliete), restriksiefragment-lengte-polimorfisme (RFLP - Eng. RFLP = restriction fragment length polymorphism), dialleliese sisteme of enkelnukleotied-polimorfisme (ENP - Eng. SNP = single nucleotide polymorphism) en mikrosatelliete, ook bekend as kort tandemherhalings (KTH - Eng. STR = short tandem repeats).⁵

In hierdie stadium blyk dit dat die mikrosatelliet-tegniek die gewildste is in die soeke na genetiese verskille. Die genetiese variasie in mikrosatelliete word bepaal deur van die polimerase-kettingreaksie (PKR - Eng. PCR = polymerase chain reaction) saam met elektroforese gebruik te maak. Die DNS-beginstukke (Eng. primer), wat die mikrosatellietstreek omsluit, dui die rigting van die samestelling van 'n spesifieke chromosoomgedeelte aan. Beginnende met 'n klein hoeveelheid - soveel as 'n enkele geenkopie - kan die polimerase-kettingreaksie die DNS-volgorde gedurende 'n paar ure miljoenvoudig dupliseer. Die tandemherhalings word deur die analise van die fragmentgrootte na die elektroforese van die PKR-produkte sigbaar gemaak.⁵

Gedurende die XXV Internasionale Konferensie oor Dieregenetika in Tours, Frankryk is besluit om die nomenklatuur van die DNS-mikrosatelliete internasionaal te standaardiseer. Die letters A tot Z sal gebruik word van die kleiner na die groter allele, met die letter M as die naam vir die middelallele.⁹

Tabel 4 toon die ontwikkeling aan van die navorsing oor genetiese merkers in die bloed van diere gedurende die laaste dertig jaar.¹⁰

| Onderwerpe | 1964 | 1974 | 1984 | 1994 |
|-------------------------------------|------|------|------|------|
| Bloedgroepe | 58 | 42 | 18 | 5 |
| Biochemiese polimorfismes | 34 | 50 | 48 | 18 |
| Hoofweefselverenigbaarheidskompleks | 8 | 8 | 33 | 17 |
| DNS en Geenkartering | 0 | 0 | 1 | 60 |

Groot verskuiwings van studies op bloedgroepe en biochemiese polimorfismes na molekulêre genetiese studies (DNS) oor die tydperk van 30 jaar is baie duidelik. Hierdie tendens kan gesien word in die bydraes gedurende die 1996-konferensie te Tours (tabel 5).⁹

TABEL 5 Bydraes van navorsers gedurende die 1996-konferensie te Tours, Frankryk⁹

| Onderwerpe | Getal bydraes | Persentasie |
|---|---------------|-------------|
| Polimorfismes en biodiversiteit | 105 | 26 |
| Hoofweefselverenigbaarheidskompleks | 47 | 12 |
| Geenkartering | 118 | 30 |
| Molekulêre genetica | 51 | 13 |
| Assosiasie tussen merkers en eienskappe | 76 | 19 |

Weereens het 'n verskuiwing plaasgevind, van die ondersoek van polimorfismes waarby bloedgroepe en DNS-merkers ingesluit is na geenkartering en assosiasies tussen genetiese merkers en kwalitatiewe en kwantitatiewe eienskappe by diere.

DIE TOEPASSINGSWAARDE VAN GENETIESE MERKERS

Die toepaslike waarde van genetiese merkers is ook in Suid-Afrika besef en reeds vanaf 1957 is vaderskapbepalings by beeste uitgevoer.

In die sestigerjare is in Suid-Afrika uitsluitlik bloedfaktore gebruik en 92,5% van alle ouerskapsgevalle kon opgelos word.¹¹ (Daar is ooreenstemmende faktore by ouers en nageslag wat oplossing onmoontlik maak.) In latere jare is meer en meer proteïen- en ensiemmerkers gebruik en die persentasie oplossings kon na 98% opgestoot word. Daar word nou in Suid-Afrika gewerk om DNS-merkers in te sluit om sodoende op 'n persentasie van nagenoeg 100% te kom.

Embrio-oorplasing by beeste het die belangrikheid van ouerskapsbewyse noodsaaklik gemaak en die toepassingswaarde van genetiese merkers by beeste verhoog. Die aantal foutiewe ouerskappe staan tans op drie persent.¹²

By skape het die belangrikheid van genetiese merkers by *in vitro*-bevrugting en klonering duidelik geword. Ook populasie-studies is van belang, soos uit die enkele voorbeeld van 'n karakoelvergelyking blyk.¹³

By varke is prestasie- en nageslagskemas besonder belangrik, maar groot kostes is daaraan verbonde. Die identifikasie van varke wat aan hierdie skemas deelneem, is vir dié redes onontbeerlik.

By perde is die perdepaspoort, wat alle genetiese merkers insluit, nou van groter belang aangesien Suid-Afrikaanse resiesperde weer vanaf 1997 op internasionale renbane kan meeding. Gedurende die jaar 1996/97 kon 99,5 persent van alle ouerskapsgevalle opgelos word. Soos by beeste was die aantal foutiewe ouerskappe by perde drie persent.⁶

By honde brei die identifikasie van rasse en die kontrole van ouerskappe steeds uit, aangesien die beweging van honde oor landsgrense heen al hoe belangriker word.⁹

GENETIESE MERKERS IN HUIDIGE EN TOEKOMSTIGE NAVORSING

Soos in tabel 5 aangedui, is die geenkartering reeds voluit aan die gang. Gedurende die Tours-konferensie was daar nie minder nie as 118 bydraes oor geenkartering by alle belangrikste plaasdierspesies.⁹ Hierdie navorsing is nie van direkte voordeel vir diere telers nie, maar sal van nut wees in die toepassing van korrelasies tussen gene en siektetoleransie van diere. Die

inligting sal lei tot beter begrip van genetiese tendense soos die BLUP-analise (Eng. BLUP = best linear unbiased prediction).

'n Nuwe rigting in die gebruik van genetiese merkers is MOS = merkerondersteunende seleksie (Eng. MAS = marker assisted selection).

Aangesien die getal merkers by die verskillende spesies meer en meer bekend geraak het, was dit voor die hand liggend om die loci van merkers en daarmee saam die kwantitatiewe eienskap-loci (KEL - Eng. QTL = quantitative trait loci) op te spoor. Die veelvoudige navorsing wêreldwyd is weerspieël in 76 bydraes wat die assosiasie tussen merkers en hoofsaaklik kwantitatiewe eienskappe probeer ontrafel (sien tabel 5).

Die volledige geenkartering is die hocksteen vir die soeke na die kwantitatiewe eienskap-loci (KEL) wat dan in die merkers ondersteunende seleksie (MOS) van diere sy deurslag vind. Van die molekulêre-genetiese metodes en die gebruik daarvan in die verwesening van teeldeelwitte word groot deurbrake verwag.¹⁴

Hoe meer merkers gevind word, hoe meer kompleks is die soeke na korrelasies en assosiasies tussen merkers en kwalitatiewe en kwantitatiewe eienskappe. Wat die oorerflike siektes betref, kon die volgende deur molekulêre-genetiese metodes gediagnoseer word: Kardiomiopatie (Eng. CMP), spinale muskulêre atrofie (Eng. SMA), uridiemonofosfaat-sintesetekort (Eng. DUMPS), bees progressiewe degeneratiewe miëlönsefalopatie (Eng. BPDME), bees spongiforme enkefalopatie (Malkoeisiekte) (Eng. BSE) en bees-limfosiet-antigeen-tekorte (Eng. BLAD).¹⁴

Molekulêre-genetiese tegnieke is ook van toepassing by infeksiesiektes soos beesleukose, beesrinotracheïtis, brusellose, bek- en klouseer en ander.

Maar die groot uitdaging lê op die gebied van MOS - merker ondersteunende seleksie. As daar merkers gevind word wat gekoppel kan word aan siekte of wat 'n direkte verband met vrugbaarheids-, groei- of produksie-eienskappe toon, was alles die moeite werd.

SUMMARY

An attempt is made to give an overview of the development in the field of research on genetical markers. During the last fifty years the progress made was phenomenal and it is impossible to do justice to all the contributors throughout the world.

Blood group antigens, biochemical polymorphisms, lymphocyte antigens and DNA markers have been discussed in chronological order.

The practical uses of genetical markers are extensive, but parentage verification is the most important. With regard to the South African Stud Book it can be said with pride that only three percent of registrations were inaccurate. The field of research in the uses of genetical markers is wide open, considering the search for associations between markers and diseases or markers and qualitative and quantitative traits. The new direction of research is MAS = marker assisted selection. Several results have been accomplished but the road ahead is certainly not an easy one.

LITERATUURVERWYSINGS

- Landsteiner, K. (1901). Über Agglutinationserscheinungen normalen menschlichen Blutes, *Wien. Klin. Wschr.*, 14, 1132-1134.
- Stormont, C. (1962). Current status of blood groups in cattle, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 97, 251-268.
- Agar, N.S., Board, P.E. (ed.) (1983). Red blood cells of domestica mammals (Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford).

4. Osterhoff, D.R. (1995). Studies on blood groups and biochemical polymorphisms in goats, *Arch. Tierz.*, 38, 553-561.
5. Bowling, A.I. (1996). *Horse Genetics* (CAB International, Wallingford).
6. Van Dyk, E. (1997). Hoof: Bloedgroeplaboratorium (Perde) Fak. Veeartsenykunde, Onderstepoort. Persoonlike mededeling.
7. Newman, M.J., Antezak, D.R. (1983). Histocompatibility polymorphisms of domestic animals, *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.*, 27, 1-76.
8. Nicholas, F.W. (1987). *Veterinary genetics* (Clarendon Press, Oxford).
9. Handeling. (1996). XXV Internasionale Konferensie oor Diergenetika, Tours, Frankryk.
10. Handeling. (1994). XXIV Internasionale Konferensie oor Diergenetika, Praag, Tsjeggiese Republiek.
11. Osterhoff, D.R. (1968). A decade of applied bovine blood grouping in the Republic of South Africa, *Proc. S. Afr. Soc. Anim. Prod.*, 1968, 163-169.
12. Du Plessis, S.J. (1996). Hoof: Bloedgroeplaboratorium (Beeste) Landbounavorsingsraad, Dierverbeteringsinstituut, Irene. Persoonlike mededeling.
13. Nguyen, T.C., Osterhoff, D.R. (1992). Comparison between Russian and South African Karakul sheep based on blood group markers, *Jl. S. Afr. vet. Ass.*, 63, 20-22.
14. Stranzinger, G.F. (1994). Realisierbarkeit von Zuchtzielen mit Hilfe von molekulargenetischen Methoden, *Züchtungskunde*, 66, 484-488.