

Breytileikinn T137 í riðupólærkt sauðfjár

Sheep T137 allele in classical scrapie resistance breeding

Fulltrúar ScIce¹-rannsóknarhópsins ScIce consortium: Christine Fast, Vincent Beringue, Juan Carlos Espinosa, Jörn Gethmann, Fiona Houston, Gesine Lühken, Romolo Nonno, John Spiropoulos, Stefania Porgeirsdóttir

Staða þekkingar um breytileikinn T137:

Scientific knowledge of the T137 allele:

Stökkbreytingar/breytileikar í stökum núkleótíðum príonprótein-gensins (PRNP) hafa mikil áhrif á næmi fyrir riðusmiti og þróun príonstofna. Þessir breytileikar geta valdið stökum breytingum í amínósýrum í undirliggjandi svo kölluðu hýsil-tjáðu príonpróteini (PrP^C), sem hefur áhrif á mögulega aflögun þess í sýkta útgáfu (PrP^{Sc}). Í sauðfé skipta aðallega stökkbreytingar máli í sætunum 136 (Alanín eða Valín), 154 (Argínín eða Histidín) og 171 (Argínín, Glútamín, Histidín), sem leiða að fimm ólíkum genasamsætum/breytileikum (ARQ, VRQ, AHQ, ARR og ARH) og í kjölfarið að 15 mismunandi arfgerðum² (Goldmann 2008). Niðurstöður úr faraldsfræðilegum rannsóknum og smittilraunum sýna að kindur með ARR/ARR eru sterklega, en ekki fullkomlega þolnar gegn riðusmitefni (Groschup et al., 2007). Í sauðfé er ARR eini breytileikinn sem hefur verið notaður til þolræktar til þessa, samkvæmt ESB-reglugerðinni 999/2001 síðan 2004.

Susceptibility to classical scrapie and of prion strains evolution are strongly influenced by single nucleotide polymorphisms of the prion protein gene (PRNP). These polymorphisms may cause single amino acid changes in the underlying host- encoded prion protein (PrPC), impacting in turn its conversion into the disease- associated isoform (PrPSc). Of major interest in sheep are polymorphisms at codon 136 (Alanine or Valine), 154 (Arginine or Histidine) and 171 (Arginine, Glutamine, Histidine), which result in five different alleles (ARQ, VRQ, AHQ, ARR and ARH), leading to 15 different genotypes (Goldmann 2008). Epidemiological and experimental evidence indicate that ARR/ARR sheep are strongly, but not absolutely resistant to classical scrapie prions (Groschup et al., 2007). In sheep, ARR is the only allele used for resistance breeding so far, regulated in the EU by the Regulation 999/2001 since 2004.

Síðan ESB-þolræktunaráætlun var innleidd, hafa hins vegar fundist fleiri breytileikar og tengjast riðupól, meðal annars breytileikinn T137, sem er sérstaklega algengur í ítalska kyninu Sarda sheep (Vaccari et al. 2009).

¹ meira um ScIce-verkefnið: sjá bls. 3

² arfgerð = samsetning úr tveimur genasamsætum; hver og ein kind er með 2 genasamsætur frá sitt hvoru foreldri

However, since the implementation of the resistance breeding program of the EU, other polymorphisms have been identified and associated with resistance to classical scrapie, among others the T137 allele, which is especially prominent in Italian Sarda sheep (Vaccari et al. 2009).

Samkvæmt EFSA³ (EFSA 2017) eru eftirfarandi atriði tengd riðuónæmi ákveðins PRPN-breytileika:

- *engin umbreyting í næmisprófum í tilraunaglasí⁴,*
- *einstaklingar í smittilraunum í gegnum munninn⁵ smitast ekki og*
- *einstaklingar [smitaðir beint í heilann] eru með marktækt lengri meðgöngutíma*
 - *og/eða minna smithlutfall en einstaklingar með villigerðina (ARQ/ARQ), og*
 - *fáir eða engir riðujákvæðir gripir í raunveruleikanum*

As stated by EFSA (EFSA 2017) the resistance of a certain PRNP allele is indicated by

- The lack of conversion / amplification in *in vitro* studies,
- No transmission following experimental oral challenge, and
- No transmission or transmission with significantly prolonged incubation periods
 - and/or reduced attack rate than that of challenges in wild-type recipients and
 - rare field cases or no field cases

Í gegnum árin söfuðust haldbær vísindaleg gögn sem sýna fram á riðuþol T137. Fyrst og fremst hefur til þessa enginn riðujákvæður gripur fundist sem bar þennan breytileika meðal yfir 3.000 raðgreindra riðujákvæðra gripa (Romolo Nonno, persónuleg samskipti, júlí 2024).

Over the years solid scientific evidence for the resistant properties of the T137 allele has been generated. First of all, up until now, no classical scrapie case has been diagnosed in Italy carrying this allele, with more than 3000 classical scrapie cases examined (Romolo Nonno, personal communication, July 2024).

Auk þess sýndi arfgerðar-samanburðarrannsókn á mismunandi hjörðum⁶ á eina verstu riðusvæði Ítalíu fram á sterka mótstöðu AT137RQ/ARQ⁷ undir raunverulegum kringumstæðum (Vaccari et al. 2009). Bráðabirgðaniðurstöður á Íslandi eru í sam-

³ EFSA = matvælastofnun ESB

⁴ á borð við PMCA-næmispróf (protein misfolding cyclic amplification)

⁵ Þessi aðferð í smittilraunum endurspeglar raunverulegar kringumstæður og skiptir því mestu máli ef markmið er að nota niðurstöðurnar í raunveruleikanum. Auk þess er til aðferð þar sem smitefnið er sprautað beint í heilann ("i.c.") sem hraðar myndun sjúkdóms og leiðir að ýktum niðurstöðum (t.d. er hægt að smita ARR/ARR-kindur með þessa aðferð), en kemur á þennan hátt aldrei fyrir í raunveruleikanum.

⁶ nánar tiltekið 5 hjarðir, með yfir 7.700 gripi samtals

⁷ = arfblandið T137 með villigerð á móti, einnig kallað "T137/ARQ"

ræmi við þessar niðurstöður: Þótt tíðni breytileikans T137 er almennt lág á Íslandi, hefur hann fundist í riðuhjörðum með hátt smithlutfall en jafnvel þar voru allir T137-gripir riðuneikvæðir. Vegna lágrar tíðni breytileikans eru hins vegar frekari rannsóknir nauðsynlegar til að ná tölfræðilegri marktækni þessara áhrifa þar.

In addition, a multi-flock study, all originating from an Italian region which is heavily affected by classical scrapie, revealed a strong protective effect of AT137RQ/ARQ under field conditions (Vaccari et al. 2009). Preliminary results in Iceland support this observation: Although the frequency of the T137 allele is in general low in Iceland, the allele had been found in highly scrapie affected flocks, and even there all T137-animals were negative. However, due to the low frequency of this allele further investigations are necessary to achieve a statistical significance of this effect.

Auk þess, kindur með T137-geñasamsætu (arfblendnar) voru smitaðar bæði beint í heilann með hefðbundna sauðfjárriðu og kúariðu og einnig í gegnum munninn með hefðbundna sauðfjárriðu. Þessum kindum var logað 1550 dögum eftir að þær voru smitaðar án þess að þær þróuðu sjúkdómann [þær tóku aldrei sjúkdóminn], sem bendir ótvírætt til þess að þær bjuggu yfir sterkri mótstöðu gagnvart smitandi prionsjúkdómum (TSE) (Vaccari o.fl. 2007). Hins vegar drápust samanburðarkindur með ARQ/ARQ [villigerð] á meðaltali 462 dögum eftir að þær voru smitaðar (Vaccari o.fl. 2007).

Furthermore, sheep carrying a single T137 allele (heterozygous) allele had been inoculated intracerebrally with classical scrapie and BSE, as well as orally with classical scrapie. These animals were finally killed after 1550 days post infection without ever developing the disease, clearly indicating a strong protection against transmissible spongiform encephalopathies (TSE) (Vaccari et al. 2007). In clear contrast, control sheep with an ARQ/ARQ genotype had a mean survival time of 462 days post infection (Vaccari et al. 2007).

Tilraunir í tilraunaglasí [*in vitro*], sem sami rannsóknarhópurinn framkvæmdi í kjölfarið við heilabúta úr heilbrigðum kindum með T137-geñasamsætu annars vegar og riðusmítefni (hefðbundna sauðfjárriðu) hins vegar sem PMCA-næmispróf⁸, leiddi ekki til neinnar marktækrar umbreytingar. Þessar niðurstöður styðja kenninguna að T137-Pr^{Pc} aflagast/umbreytist ekki í Pr^{PSc} þrátt fyrir hámarks smitálag, sem bendir ótvírætt til ónæmishæfileika í raunheimi [*in vivo*]. Sem hluti af yfirstandandi ScIce-rannsóknarverkefninu urðu til bráðarbirgðaniðurstöður úr svipaðri PMCA-uppsetningu sem ótvírætt staðfestu að T137-geñasamsætan dregur úr næmi fyrir riðu, en þar voru notuð 13 mismunandi íslensk riðusmítefni. Sömu niðurstöður komu í ljós þegar fleiri evrópsk riðusmítefni voru notuð (m.a. smítefni sem líktust ekki ítalska riðusmítefninu). Athyglisvert var hér að þetta fyrirbæri sást þegar í arfblendnum samsetningum við næma breytileika (AT137RQ/ARQ) og sjáanlegt ónæmi er sambærilegt við ARR/ARR eða jafnvel meira (Vincent Béringue, persónuleg samskipti).

⁸ PMCA = protein misfolding cyclic amplification, þar sem eðlilega smitferlið er hraðað með því að nota m.a. hita og hljóðbylgjur í endurteknu ferli

Subsequent *in vitro* experiments conducted by the same group, using healthy sheep brains with the T137 allele as substrate and classical scrapie as seed in protein misfolding cyclic amplification (PMCA), did not reveal any significant amplification. These results support the view that T137 PrP^C fail to undergo seeded conversion into PrP^{Sc} (Buccalossi et al. 2011), clearly indicating the potential for resistance *in vivo*. Within the ongoing ScIce project, preliminary data obtained by a similar PMCA set-up, but using 13 different Icelandic classical scrapie isolates instead, unambiguously confirmed the observation that T137 allele decreases the convertibility of PrP^C. These observations were further extended to other European classical scrapie isolates (i.e. different from Italian sheep scrapie). Remarkably, this effect was already seen in heterozygous substrates with susceptible variants (AT137RQ/ARQ) and the observed conversion inefficacy is comparable to ARR/ARR controls or even higher (Vincent Beringue, personal communication).

Í þessu samhengi er rétt að geta að þekkingin varðandi riðupól ARR/X-arfgerða var miklu minni þegar ESB-þolræktunaráætlanir voru innleiddar 2004 en þekkingin varðandi riðupól T137-genasamsætunnar er í dag.⁹

In this context, it is of interest to know that the knowledge of the protective effect of ARR/X genotypes at the time of the introduction of resistance breeding programmes in the EU in 2004 was much less than the knowledge we have today about the T137 allele.

Í stuttu máli höfum við af þessum ástæðum mikla trú á að kindur með T137/X-arfgerð ættu að flokkast varðandi ákveðin atriði eins og ARR/X-arfgerðir. Þetta varðar sér í lagi sérstaka stöðu Íslands sem er ólík þeirra í ESB.

Taken together, for these reasons we strongly believe that sheep with T137/X genotypes should be kept in the same category as with ARR/X genotypes in certain aspects. This refers in particular to the special situation in Iceland, which is different from the EU.

T137 með tilliti til íslenskar aðstæður

The T137 allele with regard to the Icelandic situation:

Íslandi er skipt upp í mismunandi varnarhólf á meðan í ESB hvert og eitt land er með sína útfærslu af ESB-riðureglugerðarinnar 999/2001. Þar af leiðandi eru ólíkar reglur í gildi varðandi flutning sauð- og geitfjár yfir landamærin innan ESB eða innan sama ESB-lands. Í öðru lagi er Ísland ekki undir ESB-reglugerðunum. Þess vegna getur [fyrirhugaða] nýja [riðu]reglugerðin á Íslandi farsællega tekið upp stóran hlut ESB-reglugerðarinnar, en einnig væri upplagt að aðlaga ákveðna hluti m.t.t. sérstakra krafa á Íslandi sem eru afleiðingar margra ára útrýmingaraðgerða.

Iceland is divided into different protection zones within one country whereas in EU the

⁹ Þ.e. við vitum miklu meira um T137 í dag en vitað var um ARR á sínum tíma, þegar ARR var skilgreind sem verndandi í ESB.

different member states have their respective scrapie regulation within the confines of the EU TSE regulation 999/2001. As a consequence different regulation apply for the transport of sheep/goat across borders within the EU or within one EU member state. Secondly Iceland is not subjected to EU regulation. Due to this situation, the new regulation in Iceland can successfully adopt large parts of the EU regulation, but it would also make sense to adapt certain parts to the specific requirements of Iceland, which have resulted from many years of eradication programs.

Allir ESB-aðilar eru undir ESB-reglugerðinni 999/2001 sem inniheldur ennþá eingöngu ARR/ARR sem lokamarkmið þolræktunar. Fyrir ESB-aðila þessi einblínun á einn breytileika var aldrei vandamál því í flestum löndum voru nógu margir ARR-arfberar til til að rækta á þessum grunni á farsælan hátt, að minnsta kosti í flestum kynjum. Þar af leiðandi var hvorki tekið til greina að leita eftir fleiri breytileikum með svipaða varnareiginleika né að taka umræðu um upptöku fleiri verndandi breytileika.

All EU member states are subjected to the Regulation 999/2001 which still only includes ARR/ARR as the final goal of resistance breeding. For EU member states this focus on one allele was never a problem as in most countries enough ARR allele carriers were available for a successful breeding, at least in most breeds. As a consequence, neither a search for additional alleles with similar protection capacities nor a discussion of including additional protective alleles was taken into account.

Hins vegar eru ARR-arfberar mjög sjaldgæfir í sumum kynjum og/eða löndum, eins og í íslensku sauðfé, eða jafnvel alls ekki til, sem er vandamál sem varðar sérstaklega kyn í útrymingarhættu. Hvers konar ræktunarstefna án frekari valmöguleika leiðir því til alvarlegs erfðafræðilegs "flöskuháls" í þessum tilfellum sem geta valdið glötun ákveðna eiginleika (sem gætu skipt máli í framtíðinni). Auk þess eykur umfangsmikil notkun fárra ARR-ræktunargripa áhættu að dreifa sjaldgæfum erfðagöllum í stofninum. Einnig má búast við því að það taki lengri tíma að byggja upp riðupólinn stofn og fleiri riðutilfelli en nauðsynleg er til lengri tíma séð, ef ræktunarstefnan einblínir eingöngu á ARR í staðinn fyrir að minnsta kosti einn annan breytileika (t.d. T137).

However, ARR carriers are very rare in some breeds and/or countries, as in Icelandic sheep, or may even be absent, a problem that in particular affect endangered breeds. Breeding strategies without alternatives therefore lead to massive genetic bottlenecks in such cases, which can be associated with the loss of certain traits (which could be needed in future). Moreover, a frequent use of few breeding animals with the ARR allele increases the risk to distribute rare defect alleles in the population. It must also be expected that the development of a scrapie resistant population will take longer and that more outbreaks than necessary are to be expected in the long term, when breeding only focuses on ARR instead of at least one additional allele (i.e. T137).

Hins vegar ættu valmöguleikarnir fyrir markvissa ræktun í besta falli bjóða upp á sérsniðna stefnu sem varðveitir á sama tíma bæði fjölbreytileikann og sérstaka afurðaeiginleika fyrir hvert og eitt sauðfjárkyn. Auk þess gæti vaxandi fjölbreytileiki

breytileika, sem eru notaðir til þolræktunar, verið kostur í framtíðinni með tilliti til - í dag enn óþekktrar, en ekki útilokaðrar - þróunar eða aðlögunar riðusmitefnisins. Þess vegna væri það til mikils gagns að taka T137 upp í ESB-þolræktunaráætlunina, sem er viðmið á heimsvísu.

On the other hand, the options for selective breeding should ideally offer breed-specific selection strategies, while simultaneously maintaining the diversity and specific production traits of each sheep breed. In addition, increasing diversity of alleles used in breeding for scrapie resistance could be an advantage in the future with regard to, at the moment unknown, but not excluded, resistance developments or evolution of the scrapie agent. It would therefore be of great benefit to include the T137 allele in the EU resistance breeding programs, which serve as a reference worldwide.

Þetta er eitt helsta markmið yfirstandandi [rannsóknar]verkefnisins “Riða á Íslandi: lífandi líkan af prionsjúkdómum á heimsvísu” (“Scrapie in Iceland: a model for prion diseases worldwide (ScIce)”), fjármagnað af ICRAD-ERA-NET í samhengi við ESB-prógrammið “Horizon research and innovation” og framkvæmd af riðusérfræðingum úr sex mismunandi löndum. Á þennan hátt mun verkefnið bæta enn fleirum gögnum við þá þekkingu sem nú þegar er fyrir hendi um breytileikann T137, m.a. af fleirum nýjum riðutilfellum, en einnig af eldri tilfellum bæði á Íslandi og í ESB-löndum, gögnum úr in-vitro¹⁰-tilraunum sem rannsaka T137 undir smítalagi íslenskra riðusmitefna og loks einnig gögnum úr in-vivo-tilraunum með erfðabreyttum músum sem bera T137-breytileikann og eru smitaðar með smitefni ólíkra riðustofna.

This is one of the overarching goals of the ongoing project “Scrapie in Iceland: a model for prion diseases worldwide (ScIce)” funded by ICRAD-ERA-NET within the context of EU Horizon research and innovation program and conducted by prion experts from six countries. Thus, the ScIce project will add even more data to the already existing knowledge of the T137 allele, among others from further currently occurring scrapie cases as well as from retrospective field studies from Iceland and EU classical scrapie outbreaks, from *in vitro* studies using T137 allele as substrate and Icelandic classical scrapie isolates as seed, as well as from *in vivo* experiments using transgenic mice carrying the ovine T137 allele and challenged with a panel of different classical scrapie prion strains.

Í stuttu máli benda vísindalegu sönnunargögnin til þessa greinlega til þess, að áhættan að dreifa riðu í gegnum T137-kindur er mjög lítil, á meðan kostirnir við nýja nálgun til þolræktunar [sem inniheldur T137] eru mjög miklir.

In summary, the scientific evidence to date clearly indicates that the risk of spreading classical scrapie through animals carrying the T137 allele is very low, whereas the benefits of new resistant breeding strategies are very high.

[Staða: 13.9.2024; þýðing og útskýringar: Karólína Elísabetardóttir. Þar sem hún er ekki löggiltur skjalapýðandi, er enska útgáfan bindandi ef vafi leikur á.]

¹⁰ “in vitro” = í tilraunaglassi; “in vivo” = í raunheimi

Heimildir:

References:

Bucalossi C, Cosseddu GM, D'Agostino C, Angelo Di Bari M, Chiappini, M, Rosone F, De Grossi L, Scavia G, Agrimi U, Nonno R, Vaccari G. Assessment of the Genetic Susceptibility of Sheep to Scrapie by Protein Misfolding Cyclic Amplification and Comparison with Experimental Scrapie Transmission Studies. *J. Virol.* 2011; 85: 8386-8392 doi.org/10.1128/jvi.00241-11

EFSA. Scientific Opinion on the Genetic resistance to transmissible spongiform encephalopathies (TSE) in goats. *EFSA J.* 2017; 15:4962. doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4962.

Groschup MH, Lacroux C, Buschmann A, Lühken G, Mathey J, Eiden M, Lugan S, Hoffmann C, Espinosa JC, Baron T, Torres JM, Erhardt G, Andreoletti O. Classic scrapie in sheep with the ARR/ARR prion genotype in Germany and France. *Emerg Infect. Dis.* 2007; 13:1201-7. Doi: 10.3201/eid1308.070077.

Vaccari G, D'Agostino C, Nonno R, Rosane F, Conte M, Di Bari MA, Chiappini B, Esposito E, De Grosi L, Giordani F, Marcon S, Morelli L, Borroni R, Agrimi U. Prion Protein Alleles showing a protective effect on susceptibility to sheep to scrapie and Bovine Spongiform Encephalopathy. *J. Virol.* 2007; 81, doi: 10.1128/JVI.02880-06.

Vaccari G, Scavia G, Sala M, Cosseddu GM, Chiappini B, Conte M, Esposito E, Lorenzetti R, Perfetti G, Marconi P, Scholl F, Barbaro K, Bella A, Nonno R, Agrimi U. Protective effect of the AT137RQ and ARQK176 PrP allele against classical scrapie in Sarda breed sheep. *Vet Res.* 2009; 40:19. doi:10.1051/vetres/2009002.