

Identyfikacja mutacji C295G genu *T* u psów rasy polski owczarek nizinny

Joanna Gruszczyńska, Aleksandra Haska, Beata Grzegorzółka

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie,
Wydział Nauk o Zwierzętach, Katedra Genetyki i Ogólnej Hodowli Zwierząt,
ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa; e-mail: joanna_gruszczyńska@sggw.pl

Celem przeprowadzonych badań była identyfikacja mutacji C295G genu *T* w polskiej populacji psów rasy polski owczarek nizinny oraz analiza konsekwencji kojarzenia nosicieli wspomnianej mutacji genu *T* warunkującego krótkoogoniastość i bezogoniastość. Próby pobrano od 61 psów. Amplifikację genu *T* przeprowadzono przy wykorzystaniu starterów opracowanych przez Indrebø i wsp. [6]. W celu identyfikacji mutacji C295G w eksonie 1 genu *T* wykorzystano enzym restrykcyjny *BstEII*, który tnie sekwencję o długości 702 pz w 191 pozycji nukleotydowej. W wyniku mutacji powstaje dodatkowe miejsce restrykcyjne w pozycji 160. Wśród 61 przebadanych psów zidentyfikowano 18 homozygot recesywnych i 43 heterozygoty. Mutacja C295G w genie *T* jest letalna w układzie homozygotycznym, gdyż prowadzi do poważnych wad rozwojowych tkanek i narządów wywodzących się z mezodermy tylnej części zarodka. Wśród przebadanych psów nie stwierdzono homozygot dominujących. Zaobserwowano mniejszą liczbę szczeniąt w miotach pochodzących z kojarzenia rodziców o krótkich ogonach, w porównaniu z wielkością miotów pochodzących z pozostałych typów kojarzeń. Potwierdza to istotną rolę genu *T* w przebiegu embriogenezy i charakter letalnego występowania tej mutacji w formie homozygotycznej. Zaobserwowane różnice nie były istotne statystycznie. Dzięki zastosowaniu niniejszego testu molekularnego można w prosty i skuteczny sposób określić genotyp psa w *locus T* i stwierdzić, czy skrócenie ogona ma podłoże naturalne, czy jest wynikiem interwencji chirurgicznej.

SŁOWA KLUCZOWE: mutacja C295G / gen *T* / polski owczarek nizinny

Polski owczarek nizinny jest jedną z pięciu polskich ras psów oficjalnie uznanych przez Międzynarodową Federację Kynologiczną (<http://www.fci.be/>). Pierwsze wzmianki o istnieniu psów w tym typie, wskazujące także na cechę charakterystyczną tej rasy, czyli występowanie osobników o skróconym lub szczątkowym ogonie, pochodzą już z XVIII wieku [9, 10]. Dawne wzorce rasy wymagały, aby ogon u psów był naturalnie krótki, względnie bardzo krótko cięty [7, 12]. Obecnie obowiązujący wzorzec polskiego owczarka nizinnego dopuszcza każdą możliwą długość ogona, ze względu na istnienie w wielu państwach regulacji prawnych dotyczących kopiowania uszu i ogona u psów (http://www.fci.be/uploaded_files/251GB98_en.doc). W państwach, które ratyfikowały Europejską Konwencję

o Ochronie Zwierząt Towarzyszących obowiązuje całkowity zakaz kopiowania uszu i ogona u psów (<http://conventions.coe.int/Treaty/en/Treaties/Html/125.htm>). Zakaz ten obowiązuje również w Polsce, gdyż został wprowadzony do ustawy o ochronie zwierząt, mimo iż Polska nie jest Stroną Konwencji [13]. W związku z tym, wiele stowarzyszeń kynologicznych wprowadziło zakaz wystawiania psów z kopiowanymi uszami i/lub ogonami na wystawach i oficjalnych pokazach (http://www.zkwp.pl/zg/komunikat_ZG_ciecie_uszu.pdf). Psy ras, w których występują skrócone ogony, aby uczestniczyć w wystawie muszą posiadać zaświadczenie potwierdzające, iż skrócenie ogona nie jest wynikiem zabiegu kopiowania. U polskich owczarków nizinnych oraz 17 innych ras psów stwierdzono genetyczną przyczynę odpowiadającą za skrócenie ogona, którą jest mutacja w obrębie genu *T* [5]. Gen *T* należy do dużej rodziny czynników transkrypcyjnych, zwanej rodziną T-box. U psów niesynonimiczna mutacja C295G w eksonie 1 tego genu skutkuje zamianą aminokwasów Ile63Met [3]. Oprócz psów, jego homologi występują także u innych gatunków zwierząt. Gen *T* wpływa na rozwój tylnych struktur ciała, w tym ogona, a mutacje w jego obrębie mogą prowadzić nie tylko do skrócenia ogona, ale także do powstania poważnych wad rozwojowych [1, 3, 5, 6].

Celem przeprowadzonych badań była identyfikacja nosicieli mutacji C295G genu *T*, odpowiadającej za skrócenie ogona u rasy polski owczarek nizinny oraz analiza konsekwencji kojarzeń nosicieli wspomnianej mutacji.

Material i metody

Materiał biologiczny do badań stanowiła krew obwodowa od 61 psów rasy polski owczarek nizinny, pochodzących z polskich hodowli (zgoda 9/2013 III Lokalnej Komisji Etycznej w Warszawie z 27 marca 2013 r.), pobrana z żyły odpromieniowej do próbek z K_3EDTA o pojemności 4 ml. Wśród psów, których krew wykorzystano do badań było 14 mających fenotypowo długi ogon oraz 41 mających ogon skrócony lub całkowicie pozbawionych ogona, także na skutek przeprowadzenia zabiegu kopiowania. Ponadto w badaniach wykorzystano krew od 6 psów, w przypadku których nie dysponowano informacjami dotyczącymi długości ogona.

Genomowy DNA z pełnej krwi izolowano metodą fenolowo-chloroformową, a następnie do dalszych badań przechowywano w lodówce w temperaturze 4°C. W celu oceny jakości wyizolowanego genomowego DNA przeprowadzono jego rozdział elektroforetyczny w 1% żelu agarozowym oraz badano spektrofotometrycznie (NanoDrop 2000, Thermo Scientific).

Amplifikację fragmentu (702 pz) genu *T* [6] przeprowadzono metodą łańcuchowej reakcji polimerazy (ang. *Polymerase Chain Reaction* – PCR), w próbkach 200 µl, w termocyklerze Trioblock Termocykler (Biometra), z zastosowaniem starterów (tab.) oraz warunków termicznych i składu mieszaniny reakcyjnej PCR takich samych jak w pracy Gruszczyńskiej i Czapli [2]. Aby dokonać oceny jakościowej produktów reakcji PCR wykonano ich elektroforezę w 2% żelu agarozowym o wysokiej rozdzielczości, z dodatkiem bromku etydy (0,5 µg/ml). Wizualizacji wyników w świetle UV dokonano w aparacie ImageMaster® VDS (PharmaciaBiotech).

Tabela – Table

Sekwencje starterów wykorzystanych w PCR

Sequences of primers used in PCR

Starter – Primer	Sekwencja (5'-3') Sequence (5'-3')
Starter 1 Primer 1 (Forward)	GAAGAGCCTGCAGTACCGAGT
Starter 2 Primer 2 (Reverse)	CACTCTCCGTTACGTA CTTC

W celu zidentyfikowania mutacji C295G amplifikowany fragment genu *T* poddawano procesowi trawienia enzymem restrykcyjnym *Bst*EII (BioLabs), zgodnie z procedurą rekomendowaną przez producenta. Produkty trawienia poddawano rozdzielowi elektroforetycznemu w natywnym 12% żelu poliakrylamidowym, a następnie żele barwiono azotanem srebra, suszono w suszarce próżniowej (Biometra) i fotografowano w celach dokumentacyjnych.

Informację o liczebności miotów pochodzących z odpowiednich typów kojarzeń uzyskano z kart miotów. Przeanalizowano następujące typy kojarzeń: 23 – krótki ogon x krótki ogon; 7 – długi ogon x długi ogon; 25 – długi ogon x krótki ogon. Istotność różnic pod względem średniej wielkości miotu w zależności od typu kojarzenia, z którego pochodziły mioty, sprawdzono testem χ^2 .

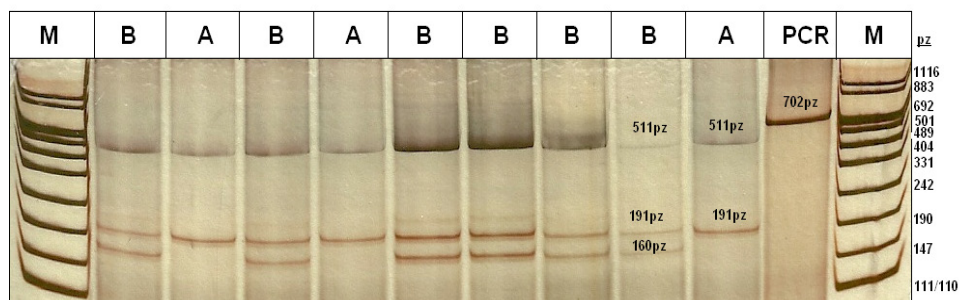
Wyniki i dyskusja

W wyniku reakcji amplifikacji w przypadku wszystkich badanych prób uzyskano produkt o długości 702 pz. Trawienie enzymem restrykcyjnym *Bst*EII produktu PCR pozwoliło określić genotyp badanych psów pod względem genu *T*, gdyż enzym ten przecina niezmutowaną sekwencję tylko w pozycji 191 pz, natomiast obecność mutacji prowadzi do powstania dodatkowego miejsca restrykcyjnego w pozycji 160 pz. W przypadku allelu dzikiego powstają dwa fragmenty restrykcyjne o długości odpowiednio 511 i 191 pz, a allel zmutowany daje trzy fragmenty restrykcyjne o długości 511, 160 i 31 pz (rys. 1). Na wybarwionym żelu poliakrylamidowym, w przypadku homozygot recesywnych widoczne są 2 prążki o długości 511 i 191 pz. W przypadku heterozygot, mimo iż w rzeczywistości powstają cztery fragmenty restrykcyjne o długości 511, 191, 160 i 31 pz, widoczne są tylko trzy prążki o długości 511, 191 i 160 pz, a prążek o długości 31 pz pozostaje niewidoczny (rys. 2). Haworth i wsp. [3] oraz Hytönen i wsp. [5] w celu identyfikacji badanej mutacji wykorzystali także enzym restrykcyjny *Bst*EII. Ze względu na fakt, iż wykorzystali oni do amplifikacji genu *T* inne startery, długość amplifikowanej sekwencji, jak i wielkość uzyskanych fragmentów restrykcyjnych była odmienna od uzyskanej w niniejszych badaniach.

W przeprowadzonych badaniach własnych określono genotyp 61 psów rasy polski owczarek nizinny. Zidentyfikowano 18 homozygot recesywnych i 43 heterozygoty. Nie stwierdzono żadnej homozygoty dominującej. Podobnie jak inni autorzy [3, 5, 6], stwierdzono, iż wszystkie homozygoty recesywne posiadały ogon normalnej długości, a heterozygoty były pozbawione ogona lub był on skrócony. Długość ogonów skróconych

Długość fragmentów restrykcyjnych (pz) The length of the restriction fragments (bp)	Homozygota recesywna Recessive homozygote	Heterozygota Heterozygote	Homozygota dominująca Dominant homozygote
511	_____	_____	_____
191	_____	_____	_____
160		_____	_____
31		_____	_____
Wzór restrykcyjny Restriction pattern	A	B	C

Rys. 1. Możliwe wyniki testu diagnostycznego, wykrywającego mutację C295G genu *T* u psów
Fig. 1. Possible results of the diagnostic test, to detect the C295G mutation of *T* gene in dogs



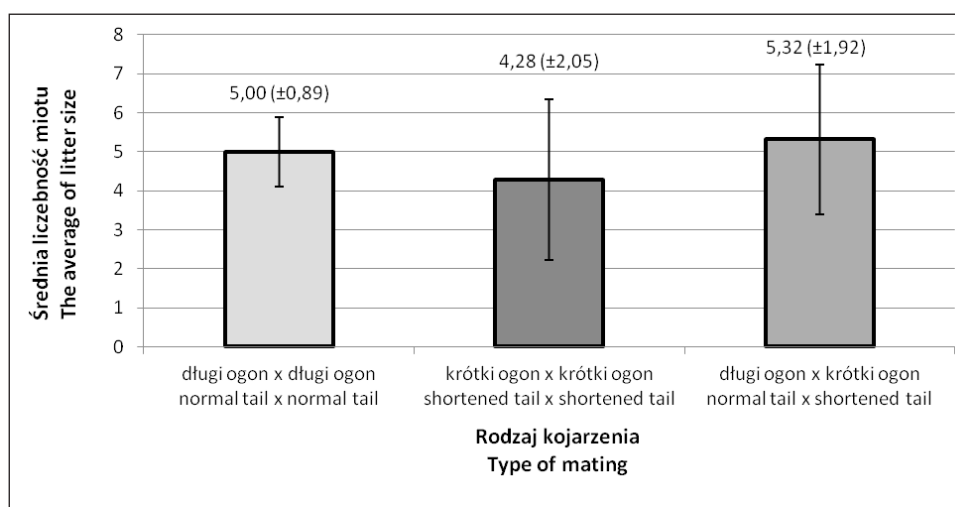
Rys. 2. Rozdział elektroforetyczny produktów trawienia enzymem *BstEII* w natywnym 12% żelu poliakrylamidowym. M – standard wielkości pUC Mix Marker 8; A – homozygota recesywna (widoczne fragmenty restrykcyjne o długości 511 pz i 191 pz); B – heterozygota (widoczne są fragmenty restrykcyjne o długości 511 pz, 191 pz, 160 pz, fragment restrykcyjny o długości 31 pz nie jest widoczny); PCR – produkt reakcji amplifikacji o długości 702 pz

Fig. 2. Electrophoresis of the products of digestion with enzyme *BstEII* in 12% native polyacrylamide gel. M – standard size pUC Mix Marker 8; A – recessive homozygote (visible restrictive fragments of the length of 511 bp and 191 bp); B – heterozygote (restrictive fragments of the length of 511 bp, 191 bp, 160 bp are visible, restrictive fragment of 31 bp is not visible); PCR – amplification product with a length of 702 bp

była zróżnicowana zależnie od liczby kręgów ogonowych. Na podstawie wyników testu wykazano, że 6 osobników, u których stwierdzono fenotypowo ogon krótki, genetycznie były osobnikami o ogonie długim. Wszystkie homozygoty recesywne urodziły się z długimi ogonami, jednakże u 4 osobników przeprowadzono zabieg kopiowania ogona, co

potwierdziły wyniki przeprowadzonych testów genetycznych. Wszystkie psy pochodzące z kojarzenia rodziców o ogonie normalnej długości również posiadały ogon normalnej długości i były homozygotami recesywnymi. Żadna heterozygota nie pochodziła z kojarzenia osobników o ogonie normalnej długości. W przypadku kojarzeń, w których oba osobniki miały skrócony ogon lub jeden z nich posiadał ogon skrócony, a drugi miał ogon normalnej długości, w miotach pojawiały się osobniki zarówno heterozygotyczne (ogon skrócony lub brak ogona), jak i homozygoty recesywne (ogon normalnej długości).

Po przeanalizowaniu średniej liczebności miotu w zależności od rodzaju kojarzenia, stwierdzono spadek średniej liczby szceniąt w miocie pochodzącym z kojarzenia dwóch osobników o krótkim ogonie, w porównaniu do średniej liczebności miotu pochodzącego z kojarzenia dwóch osobników o długim ogonie lub kojarzenia osobnika o długim ogonie z osobnikiem o ogonie krótkim (rys. 3). Różnice te nie były jednak istotne statystycznie. Zaobserwowana redukcja liczebności miotu po heterozygotycznych rodzicach była podobna jak w badaniach Hytönen i wsp. [5]. Autorzy ci stwierdzili wysoko istotny, 29% spadek liczebności miotu pochodzącego z kojarzenia psów o krótkim ogonie rasy szwedzki vallhund. U tej rasy za skrócenie lub brak ogona również odpowiada mutacja C295G genu *T*. Wyniki te były zgodne z oczekiwanym 25% spadkiem liczebności miotu po heterozygotycznych rodzicach, ze względu na śmiertelność, w trakcie rozwoju embrionalnego, zarodków będących homozygotami dominującymi. Czynnikiem potwierdzającym letalność mutacji w układzie homozygotycznym podczas rozwoju embrionalnego jest fakt, że w badaniu nie stwierdzono żadnej homozygoty dominującej. Podobne wyniki uzyskali Haworth i wsp. [3] oraz Hytönen i wsp. [5]. Jedynie Indrebø i wsp. [6] odnotowali przy-



Rys. 3. Średnia liczebność miotu (wraz z odchyleniem standardowym) w zależności od rodzaju kojarzenia w badanej populacji psów rasy polski owczarek nizinny

Fig. 3. The average litter size (along with standard deviation) depending on the type of mating in the population of Polish Lowland Sheepdog breed

padek urodzenia się dwóch szczeniąt będących homozygotami dominującymi. Szczenięta te, oprócz braku ogona i atrezji odbytu, wykazywały wiele innych wad rozwojowych niepozwalających na przeżycie. Jak dotąd, nie pojawiły się inne doniesienia o urodzeniu się szczeniąt będących homozygotami dominującymi. Także u innych gatunków stwierdzono, że mutacje homologów genu *T* w układzie homozygotycznym są letalne. Myszy będące homozygotami dominującymi wykazują wiele nieprawidłowości w budowie i zamierają w 10. dniu rozwoju embrionalnego [14]. Podobne nieprawidłowości odnotowano u danio pręgowanego [11].

Fakt, iż wszystkie psy o fenotypie typu bob-tail były heterozygotami oraz wszystkie psy z ogonami o normalnej długości nie były nosicielami mutacji C295G, wskazuje na pełną penetrację genu. U psów będących heterozygotami, poza skróceniem lub brakiem ogona, nie stwierdzono żadnych innych nieprawidłowości w budowie anatomicznej [6]. Podobnie jest w przypadku danio pręgowanego, u nosicieli mutacji jedynym jej efektem jest skrócenie ogona [11]. W przeciwieństwie do psów i danio pręgowanych, heterozygotyczne myszy, oprócz skróconego ogona, wykazują też inne nieprawidłowości budowy szkieletu [4]. Fakt, że badania nie wykazały innych defektów anatomicznych, poza skróceniem ogona, u żadnej z heterozygot sugeruje, że jedynym efektem mutacji C295G genu *T* u heterozygot jest skrócenie ogona. Kojarzenie osobników heterozygotycznych z homozygotami recesywnymi daje możliwość uzyskania około 50% potomstwa o skróconym ogonie i 50% o ogonie normalnej długości. Kojarzenie dwóch heterozygot również daje możliwość uzyskania około 50% potomstwa o skróconym ogonie, jednakże tylko około 25% będzie miało ogon długi. Pozostałe 25% zarodków będą stanowiły homozygoty dominujące, które zamierają w trakcie rozwoju embrionalnego. Ponieważ jak dotąd tylko raz opisano przypadek żywych urodzeń dwóch szczeniąt będących homozygotami dominującymi, prawdopodobieństwo uzyskania szczeniąt z wadami wynikającymi z tego rodzaju kojarzenia powinno być uznane za niezwykle niskie. Hodowla psów o genotypach, które mogą stanowić podstawę występowania wad, nie powinna mieć miejsca. Jeśli przyszłe badania wykażą, że przypadki narodzin szczeniąt obarczonych wadami, będących homozygotami dominującymi, nie są wyjątkiem, to kojarzenie ze sobą osobników heterozygotycznych nie powinno być zalecane [6].

Jak dotąd, wpływ mutacji C295G w eksonie 1 genu *T* u psów na skrócenie ogona stwierdzono u 18 ras [3, 5]. Mutacja ta występuje u owczarków i psów pasterskich, co sugeruje jej pochodzenie od wspólnego przodka [5]. Hytönen i wsp. [5] przebadali pod kątem mutacji C295G 23 rasy psów, u których występuje skrócenie lub brak ogona. Stwierdzili, że u 6 ras nie występuje ta, ani żadna inna mutacja w obrębie genu *T*. Wskazuje to, że oprócz genu *T*, muszą istnieć inne czynniki genetyczne wpływające na długość ogona u psów. W celu ich zidentyfikowania oraz określenia modelu dziedziczenia, potrzebne są dalsze badania. Ponadto w rasach, w których występuje mutacja C295G istnieje naturalne zróżnicowanie długości ogona u heterozygot. Może to być spowodowane różnorodnością alleli genów bezpośrednio oddziałujących z genem *T* lub istnieniem bardziej złożonych interakcji pomiędzy genami z rodziny T-box [6, 8].

Od właścicieli psów o fenotypie typu bob-tail wymagane jest zaświadczenie, potwierdzające naturalne (genetyczne) pochodzenie krótkiego ogona. W przypadku ras, u których stwierdzono, iż za skrócenie ogona odpowiedzialna jest mutacja C295G genu *T*, subiek-

tywna ocena weterynaryjna może zostać zastąpiona prostym, obiektywnym testem molekularnym, jednoznacznie wskazującym źródło krótkoogoniastości. Przedstawiony test molekularny może służyć jako obiektywne narzędzie do diagnozowania mutacji C295G genu *T* u psów rasy polski owczarek nizinny, w celu wydania dokumentów potwierdzających genetyczną genezę krótkoogoniastości lub bezogoniastości psa.

Składamy serdeczne podziękowanie Hodowcom i Właścicielom psów za pomoc w kolekcji materiału biologicznego do badań.

PIŚMIENNICTWO

1. CZAPLA A., GRUSZCZYŃSKA J., SYSA P., 2011 – Charakterystyka genów z motywem T odpowiedzialnych za krótkoogoniastość i bezogoniastość oraz ich rola u wybranych gatunków zwierząt. *Życie Weterynaryjne* 86 (11), 850-856.
2. GRUSZCZYŃSKA J., CZAPLA A., 2011 – A molecular test for the detection of the C295G mutation in the T gene responsible for shortened tail and taillessness in the Pembroke Welsh Corgi. *Annals of Warsaw University of Life Sciences – SGGW, Animal Science* 49, 35-43.
3. HAWORTH K., PUTT W., CATTANACH B., BREEN M., BINNS M., LINGAAS F., EDWARDS Y.H., 2001 – Canine homolog of the T-box transcription factor T; failure of the protein to bind to its DNA target leads to a short-tail phenotype. *Mammalian Genome* 12, 212-218.
4. HERRMANN B.G., 1995 – The mouse *Brachyury* (*T*) gene. *Seminars in Developmental Biology* 6, 385-394.
5. HYTÖNEN M.K., GRALL A., HÉDAN B., DRÉANO S., SEGUIN S.J., DELATTRE D., THOMAS A., GALIBERT F., PAULIN L., LOHI H., SAINIO K., ANDRÉ C., 2009 – Ancestral T-box mutation is present in many, but not all, short-tailed dog breeds. *Journal of Heredity* 100, 236-240.
6. INDREBØ A., LANGELAND M., JUUL H.M., SKOGMO H.K., RENGMARK A.H., LINGAAS F., 2008 – A study of inherited short tail and taillessness in Pembroke Welsh corgi. *Journal of Small Animal Practice* 49, 220-224.
7. LEŚNIAK-MAŁECKA B., 2005 – Polski owczarek nizinny – historia wzorca rasy. http://www.dziech.pnet.pl/oponie_historia_wzorca.html, 10.07.2012.
8. PACKHAM E.A., BROOK J.D., 2003 – T-box genes in human disorders. *Human Molecular Genetics* 12 (1), 37-44.
9. REDLICKI M., 1996 – PON Polski owczarek nizinny. Egros, Warszawa.
10. REDLICKI M., 2004 – Polski owczarek nizinny. MAKO PRESS, Warszawa.
11. SCHULTE-MERKER S., VAN EDEN F.J.K., HALPERN M.E., KIMMEL C.B., NÜSSEIN-VOLHARD C., 1994 – No tail (*ntl*) is the zebrafish homologue of the mouse *T* (*Brachyury*) gene. *Development* 120, 1009-1015.
12. SMYCZYŃSKI L., 1957 – Psy – rasy i wychowanie. PWRiL, Warszawa.
13. Ustawa z dnia 16 września 2011 r. o zmianie ustawy o ochronie zwierząt oraz ustawy o utrzymaniu czystości i porządku w gminach. Dz. U. 2011, nr 230, poz. 1373.
14. WILSON V., MANSON L., SKARNES W. C., BEDDINGTON R.S., 1995 – The T gene is necessary for normal mesodermal morphogenetic cell movements during gastrulation. *Development* 121, 877-886.

Joanna Gruszczyńska, Aleksandra Haska, Beata Grzegorzółka

Detection of C295G mutation *T* gene in Polish Lowland Sheepdog

Summary

The aim of the study was to identify C295G mutation in *T* gene in the Polish population of Polish Lowland Sheepdog and to analyze the consequences of matchmaking the carriers of the mentioned mutation of *T* gene conditioning shortened tail and taillessness. The samples were collected from 61 Polish Lowland Sheepdogs. Polymerase chain reaction was performed using the same primers such Indrebø et al. [6] had used. To identify mutations in exon 1 C295G *T* gene, there was used *Bst*EII restriction enzyme which cuts the sequence with a length of 702 bp at nucleotide position 191. The mutation created an additional restriction site at position 160. Among the 61 tested dogs there were 18 recessive homozygotes and 43 heterozygotes identified. There was no dominant homozygote, because, as the authors of other studies indicate, mutation of the gene C295G *T* is lethal in that system and causes embryos' mortality at an early stage of embryonic development. We observed decreasing litter size with short-tail x short-tail crosses, compared with the litter size of long-tail x long tail crosses, which confirms a major role of *T* gene during embryogenesis. However, the recorded differences were not statistically significant. The results of these studies show that the presented molecular test is an excellent tool for a clear statement of the Polish Lowland Sheepdog breed test: whether a short tail is genetically determined, or it is the result of a surgical procedure.

KEY WORDS: C295G mutation / *T* gene / Polish Lowland Sheepdog