

Częstość występowania mutacji c.1473+1G>A w genie *ADAMTS17* u psów ras predysponowanych do wystąpienia pierwotnego zwichnięcia soczewki w polskich hodowlach

Karolina Lisiak-Teodorczyk¹, Mariusz Maćkowski², Grzegorz Cholewiński², Jacek Wojciechowicz¹, Paweł Antosik³

z Centrum Badań DNA Sp. z o.o. w Poznaniu¹, Zakładu Hodowli Koni Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu² oraz Centrum Weterynarii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu³

Pierwotne zwichnięcie soczewki u psów (primary lens luxation – PLL) jest dziedziczną chorobą oczu, która została opisana już ponad 85 lat temu (1). Choroba występuje u psów różnych ras (2, 3, 4), jednak najczęściej zdarza się wśród terierów: bulterierów miniaturowych, jack russell terierów, terierów tybetańskich, lancashire heelerów, parson russell terierów, patterdale terierów, rat terierów, sealyham terierów, szpiców włoskich, toy foksterierów, terierów walijskich, foksterierów szorstkowłosych, yorkshire terierów i niemieckich terierów myśliwskich. Najwięcej nosicieli defektu

i chorych osobników obserwuje się wśród bulterierów miniaturowych (3, 4, 5). Znacznie rzadziej opisywane są przypadki zachorowań wśród shar pei, grzywaczy chińskich, border collie czy australijskich psów pasterskich (2, 6).

Pierwotne zwichnięcie soczewki w większości przypadków zostaje zdiagnozowane dopiero po wystąpieniu widocznych objawów, czyli przesunięciu soczewki, do którego dochodzi zwykle w późniejszym wieku życia psa. Ze względu na ten fakt defekt rozprzestrzenił się wśród wielu ras. Wysoka częstość zachorowań skłania

The incidence of c.1473+1G>A mutation in the *ADAMTS17* gene in canine breeds predisposed for primary lens luxation (PLL) in Polish kennels

Lisiak-Teodorczyk K.¹, Maćkowski M.², Cholewiński G.², Wojciechowicz J.¹, Antosik P.³, DNA Research Center Ltd., Poznań¹, Division of Horse Breeding, Poznań University of Life Sciences² and Veterinary Center, Nicolaus Copernicus University in Toruń³

This article aims at the presentation of genetic background of an important ocular disorder in dogs. Primary lens luxation (PLL) is an inherited and painful eye disease in dogs. In most cases, it is diagnosed only at the period of visible symptoms – the shift of the lens, which usually occurs in older dogs. The incidence of PLL among dogs in Polish kennels has not been described so far, nor the percentage of carriers of this genetic disorder. In our study, we showed a high incidence of c.1473+1G>A mutation in the *ADAMTS17* gene in the examined dog breeds (46.22%). Frequent occurrence of this mutation in miniature bull terriers (57.53%), has been observed. Out of 73 tested dogs, 41 were carriers of the mutation, which makes 56.16%. One individual was characterized as a homozygous. The aim of our study was to determine the incidence of c.1473+1G>A mutation in the *ADAMTS17* gene, associated with the occurrence of PLL, in the group of different canine breeds from Polish kennels.

Keywords: primary lens luxation, genetics, dogs breeds, Polish kennels.

do poszukiwania metod diagnostycznych, które pozwoliłyby ograniczyć występowanie choroby.

Rozwój metod biologii molekularnej umożliwił zidentyfikowanie molekularnego podłoża tego defektu. W 2007 r. Sargan i wsp. (3), badając chore psy ras bulterier miniaturowy oraz lancashire heeler i analizując allele markerów mikrosatelitarnych, wykazali silną nierównowagę sprzężeń i asocjację choroby z odcinkiem 6.3 Mbp w centralnym regionie chromosomu 3. Z kolei w 2009 r. zespół naukowców z Uniwersytetu Missouri (USA) prowadzony przez Dr G. Johnson i E. Giuliano, we współpracy z zespołami D. Sargan (Uniwersytet w Cambridge, UK), D. Gould (Davies Veterinary Specialist, UK) i C. Mellersh (Animal Health Trust, UK) zidentyfikowali w chromosomie 3. mutację c.1473+1G>A w genie *ADAMTS17*, jako odpowiedzialną za występowanie pierwotnego zwichnięcia soczewki (7). Substytucja ta powoduje powstanie donorowego miejsca splicingu w części 5' intronu 10, co skutkuje powstaniem skróconej formy białka *ADAMTS17*, metaloproteinazy z motywem trombospondyny typu pierwszego. Mutację tę zidentyfikowano również u innych ras, głównie terierów, a także u australijskich psów pasterskich (2).

W następstwie defektu dochodzi do uszkodzenia struktury włókienek więzadła rzęskowego, które łączy soczewkę z ciałem rzęskowym. Postępujące zrywanie włókienek skutkuje zwiększoną chybotliwością soczewki, a następnie dochodzi do zerwania wszystkich włókienek i przemieszczenia soczewki do przedniej komory oka lub do ciała szklistego, co określa termin zwichnięcie. Towarzyszy temu nagły ból, zaczerwienienie, wzrost ciśnienia w oku, deformacja tęczęwki oraz uszkodzenie siatkówki. Deformacja źrenicy i utrudniony odpływ cieczy wodnistej z tylnej komory oka często prowadzi do wystąpienia jaskry, a czasami ślepoty. Pierwsze objawy kliniczne pojawiają się u zwierząt w wieku 2–6 lat (3). Finalnie zwichnięcie

soczewki jest zawsze obustronne, przy czym do przesunięcia soczewki w drugim oku dochodzi zwykle kilka tygodni później niż w pierwszym (3).

W przypadku przemieszczenia soczewki do przedniej komory oka leczenie polega na chirurgicznym jej usunięciu, dzięki czemu likwiduje się objawy jaskry. Wynik leczenia uzależniony jest w dużej mierze od wczesnej diagnozy oraz czasu interwencji. W wyniku usunięcia soczewki zwierzę odzyskuje możliwość widzenia, lecz staje się ono mało ostre. W przypadku przemieszczenia soczewki do ciała szklistego rzadko dochodzi do poważniejszych komplikacji, stąd też nie jest wymagany zabieg chirurgiczny, a jedynie leczenie farmakologiczne, którego celem jest zwężenie źrenicy zapobiegające przemieszczaniu się zwichniętej soczewki do przedniej komory oka.

Odpowiedzialna za wystąpienie pierwotnego zwichnięcia soczewki mutacja w genie *ADAMTS17* ma charakter substytucji G>A w miejscu pierwszego nukleotydu intronu 10 (c.1473+1G>A). Powoduje ona alternatywne składanie mRNA, gdzie ekson 10 zostaje pominięty i dochodzi do przesunięcia ramki odczytu oraz powstania przedwczesnego kodonu STOP. Skutkuje to powstaniem skróconego produktu białkowego (2, 7).

Pierwotne zwichnięcie soczewki dziedziczone jest w sposób autosomalnie recesywny, co oznacza, że aby wystąpiła choroba, niezbędna jest obecność dwóch wadliwych kopii genu. Istnieją jednak doniesienia na temat przypadków psów z objawami zwichnięcia soczewki, będących heterozygotami c.1473+1G>A. Dla większości ras ryzyko zachorowania dla nosicieli pojedynczej kopii zmutowanego genu *ADAMTS17* jest niskie, natomiast w przypadku bulterierów miniaturowych oszacowano je na 2–20% (7). Stąd można podłoże molekularne i aktualny model dziedziczenia nie są do końca jasne. Z badań przeprowadzonych przez Gharahkhani i wsp. (6) wynika, że u osobników heterozygotycznych choroba rozwija się później niż u homozygotycznych. Dane wskazują także na to, że ryzyko pojawienia się zwichnięcia soczewki wzrasta wraz z wiekiem, chociaż obserwuje się wyjątki, gdzie choroba rozwija się już u psów bardzo młodych. Sugeruje to istnienie innych czynników ryzyka, jak warianty sekwencji DNA bądź czynniki środowiskowe, które mogą wpływać na ostateczny obraz kliniczny choroby.

Diagnostyka pierwotnego zwichnięcia soczewki jest trudna, ponieważ pierwsze objawy choroby zwykle pojawiają się dopiero u dorosłych osobników w wieku 2–6 lat (3). Utrudnieniem jest również obecność bezobjawowych nosicieli. Zwierzęta takie znajdują się w grupie niskiego ryzyka zachorowania, ale mogą przekazywać mutację potomstwu. Brak możliwości łatwego wykrycia nosicieli i dopuszczanie do rozrodu osobników bardzo młodych jest przyczyną pojawienia się w hodowlach zwiększonego odsetka psów obciążonych tą wadą.

Rozpoznanie polega na przeprowadzeniu badań okulistycznych, które wskażą ewentualne wady i zaburzenia narządu wzroku. U nosicieli zaleca się okulistyczne badanie oczu co 6–12 miesięcy, poczynając od 2. roku życia (5). U homozygot z mutacją, u których z dużym prawdopodobieństwem rozwinię się choroba, zaleca się badanie oczu co 6 miesięcy, zaczynając od 18. miesiąca życia, żeby możliwie jak najszybciej wykryć objawy (5).

Dzięki zidentyfikowaniu mutacji odpowiedzialnej za wystąpienie choroby możliwe było zastosowanie metod molekularnych do jej wykrywania i opracowanie testu opartego na badaniach DNA w kierunku predyspozycji genetycznych. Dzięki wykonaniu takiego badania hodowcy mogą prowadzić hodowlę w sposób kontrolowany, dobierając do rozrodu osobniki wolne od mutacji.

Cel pracy

Celem pracy była próba określenia częstości występowania mutacji c.1473+1G>A w genie *ADAMTS17* związanej z występowaniem pierwotnego zwichnięcia soczewki, w grupie psów różnych ras pochodzących z polskich hodowli.

Materiały i metody

Grupę badaną stanowiło 106 psów następujących ras: bulterier miniaturowy, grzywacz chiński, jack russell terier, parson russell terier, yorkshire terier, foksterier i australijski pies pasterski. Wszystkie psy pochodziły z polskich hodowli. Materiałem do badań były izolaty DNA uzyskane z wymazów lub próbek krwi pobranych od badanych zwierząt. DNA był izolowany metodą kolumnkową za pomocą zestawów NucleoSpin (Marcherey Nagel) według zaleceń producenta. Badania przeprowadzono metodą PCR z użyciem starterów: F 5' CTTCTTGCCTTCTCTTGACTGACAGA i R-5'CGACA-GAAGCCAGATGCTCCT (3) amplifikujących fragment genu *ADAMTS17* o długości 285 pz. Reakcje PCR przeprowadzono w objętości 25 µl, zawierającej: po 0,4 µM każdego ze starterów, 12,5 µl Go Taq® Green Master Mix 2X (Promega), 8 µl H₂O oraz 2,5 µl DNA. Reakcje PCR przeprowadzono według następującego programu: denaturacja wstępna 95°C przez 5 min, następnie 35 cykli: 95°C przez 5 min, 60°C przez 45 s, 72°C

przez 1 min, a końcowe wydłużanie prowadzono przez 5 min 72°C (Bio-Rad T100™ Thermal Cycler). Uzyskane produkty PCR poddawano sekwencjonowaniu metodą Sanger (ABI 3730 DNA Analyzer).

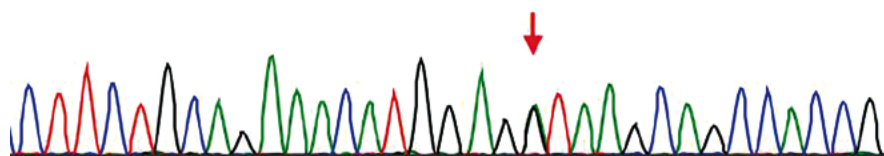
Wyniki i omówienie

Pierwotne zwichnięcie soczewki jest istotnym problemem w hodowli psów, głównie terierowatych. Obecność w populacji hodowlanej bezobjawowych nosicieli mutacji predysponującej do wystąpienia tego zaburzenia, w połączeniu z faktem, że choroba klinicznie ujawnia się u zwierząt dojrzałych, w wielu przypadkach już po okresie rozrodu, powoduje jej utrzymanie i rozprzestrzenienie w populacji. Doniesienia naukowe (2, 3) wskazują, że częstość występowania mutacji w niektórych rasach jest szczególnie wysoka.

Aby ograniczyć rozprzestrzenianie się choroby, należałoby wyłączyć osobniki zarówno homozygotyczne, jak i heterozygotyczne z rozrodu. Taka strategia z jednej strony przyniosłaby szybką eliminację defektu odpowiedzialnego za pierwotne zwichnięcie soczewki z puli genowej, z drugiej strony jednak doprowadziłaby do drastycznej redukcji różnorodności genetycznej. Wraz z eliminacją wadliwego genu możliwe jest utracenie innych, pożądanych cech fenotypowych. Dodatkowo istnieje ryzyko pojawienia się w tak ograniczonych hodowlach innych, nowych niepożądanych zjawisk, w tym chorób dziedzicznych.

Częstość występowania pierwotnego zwichnięcia soczewki wśród psów w polskich hodowlach nie została dotychczas opisana, podobnie jak odsetek nosicieli defektu. W przeprowadzonym badaniu wykazaliśmy wysoką częstość występowania mutacji c.1473+1G>A w genie *ADAMTS17* u badanych ras psów (46,22%) (ryc. 1, 2). Szczególnie częste występowanie mutacji zaobserwowaliśmy u bulterierów miniaturowych (57,53%), które

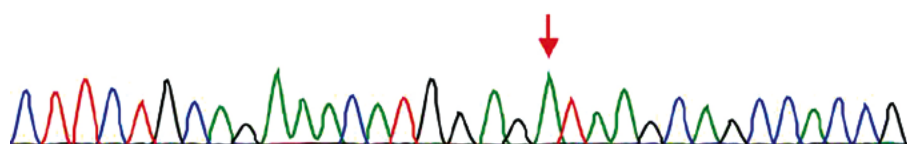
C T T C T G C A G A A A C A T G G A G **R** T A A G C A G C C A C C G



Ryc. 1.

Przykład wyniku sekwencjonowania metodą Sanger, przedstawienie identyfikacji mutacji c.1473+1G>A w genie *ADAMTS17* w układzie heterozygotycznym

C T T C T G C A G A A A C A T G G A G **A** T A A G C A G C C A C C G



Ryc. 2.

Przykład wyniku sekwencjonowania metodą Sanger fragmentu genu *ADAMTS17*. Zidentyfikowano homozygotę z mutacją c.1473+1G>A

Tabela 1. Częstość występowania mutacji c.1473+1G>A w genie *ADAMTS17* wśród psów w polskich hodowlach

| Rasa | Liczba przebadanych psów | Genotypy | | |
|-----------------------------|--------------------------|----------|----|----|
| | | GG | GA | AA |
| Bulterier miniaturowy | 73 | 31 | 41 | 1 |
| Grzywacz chiński | 7 | 3 | 4 | 0 |
| Jack russell terier | 10 | 8 | 1 | 1 |
| Parson russell terier | 1 | 1 | 0 | 0 |
| Yorkshire terier | 11 | 11 | 0 | 0 |
| Australijski pies pasterski | 2 | 1 | 1 | 0 |
| Foksterier | 2 | 2 | 0 | 0 |
| RAZEM | 106 | 57 | 47 | 2 |

Obserwowane genotypy: GG – homozygota bez mutacji; GA – heterozygota, nosiciel mutacji; AA – homozygota z mutacją

stanowiły najliczniejszą grupę wśród badanych ras. Na 73 przebadane psy aż 41 było nosicielami mutacji, co stanowi 56,16%, a jeden osobnik był homozygotą (tab. 1). Podobnie w innych doniesieniach naukowych rasa bulterierów miniaturowych również jest wskazywana jako najbardziej obciążona pierwotnym zwichnięciem soczewki (3, 4, 5). W badaniach Goulda i wsp. (2) można znaleźć dane podsumowujące badania genetyczne w kierunku zwichnięcia soczewki wśród psów różnych ras z dwóch populacji: brytyjskiej, przeprowadzane przez Animal Health Trust (AHT) i północnoamerykańskiej, przeprowadzane przez Orthopedic Foundation for Animals (OFA). Według tych autorów najwyższy odsetek psów z mutacją dotyczył również bulterierów miniaturowych. Według danych AHT wśród bulterierów miniaturowych na 158 badanych psów 74 posiadały wadliwy gen, co stanowiło 46,84% populacji. Według danych OFA na 1086 przebadanych psów 550 było nosicielami mutacji, co stanowiło 50,64% grupy badanej. Nasze badanie wykazało podobną częstość występowania mutacji c.1473+1G>A w genie *ADAMTS17* u psów rasy bulterier miniaturowy w hodowlach polskich.

Odsetek psów z mutacją jest duży, stąd wyłączenie wszystkich obciążonych psów z rozrodu byłoby problematyczne. Dlatego obecnie Animal Health Trust zaleca

hodowcom rozważenie udziału w rozrodzie wszystkich psów, niezależnie od ich genotypu. Jednak homozygoty z mutacją i nosiciele mutacji powinni być kojarzeni tylko z osobnikami, u których w badaniu genetycznym wykluczono mutację w genie *ADAMTS17*. Ponadto u wszystkich szceniąt, których choć jeden z rodziców był nosicielem tego defektu, zaleca się wykonanie badania pod kątem mutacji, dzięki czemu możliwa jest identyfikacja kolejnych nosicieli, a tym samym na wczesnym etapie hodowli hodowca będzie mógł zdecydować o sposobie jej prowadzenia. Wyniki badań wskazują, że hodowcy stosują się do zaleceń Animal Health Trust, ponieważ pomimo dużej liczby osobników heterozygotycznych stosunkowo mało jest osobników homozygotycznych. Hodowcy, znając genotypy swoich reproduktorów, nie kojarzą pomiędzy sobą osobników z mutacją.

Projekt współfinansowany ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego oraz Budżetu Państwa w ramach działania 1.4 Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka.

Piśmiennictwo

- Gray H.: Some medical and surgical conditions in the dog. *Vet. Rec.* 1932, **12**, 1–10.
- Gould D., Pettitt L., McLaughlin B., Holmes N., Forman O., Thomas A., Ahonen S., Lohi H., O'Leary C., Sargan D., Mellersh C.: *ADAMTS17* mutation associated with primary lens luxation is widespread among breeds. *Vet. Ophthalmol.* 2011, **14**, 378–384.
- Sargan D., Withers D., Pettitt L., Squire M., Gould D., Mellersh C.: Mapping the mutation causing lens luxation in several terrier breeds. *J. Hered.* 2007, **98**, 534–538.
- Curtis R., Barnett K.C., Startup E.G.: Primary lens luxation in Miniature bull terrier. *Vet. Rec.* 1983, **112**, 328–330.
- Animal Health Trust http://www.aht.org.uk/cms-display/genetics_p11.html.
- Gharahkhani P., O'Leary C., Duffy D., Bernays M., Kyaw-Tanner M.: Primary lens luxation in australian terrierfield and miniature bull terriers is due to an old *ADAMTS17* mutation and is an additive trait. *The Open Genomics Journal* 2012, **5**, 7–13.
- Farias F., Johnson G., Taylor J., Giuliano E., Katz M., Sanders D., Schnabel R., McKay S., Khan S., Gharahkhani P., O'Leary C., Pettitt L., Forman O., Bourshnell M., McLaughlin, Ahonen S., Lohi H., Hernandez-Martino E., Gould D., Sargan D., Mellersh C.: An *ADAMTS17* splice donor site mutation in dogs with primary lens luxation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2010, **51**, 4716–4721.