



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



SAMORZĄD WOJEWÓDZTWA
WIELKOPOLSKIEGO
WOJEWÓDZKI URZĄD PRACY
W POZNANIU

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY

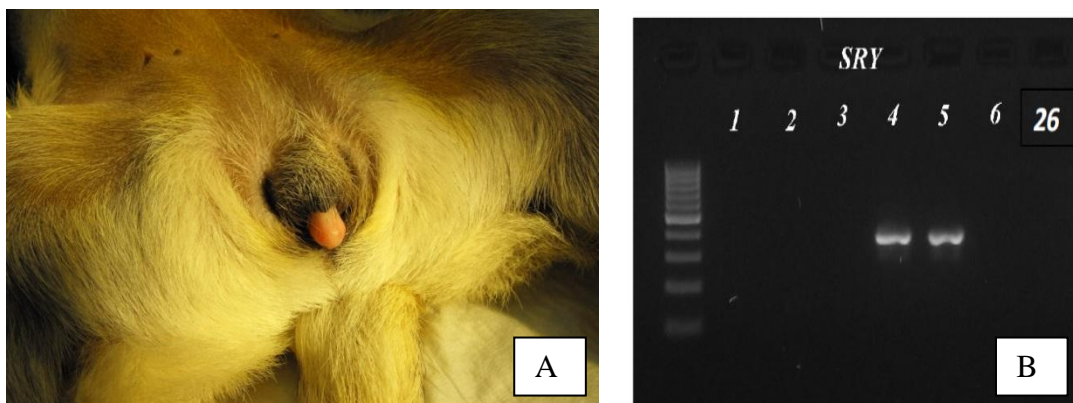


Sylwia Salamon
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt
Katedra Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt

Stypendystka projektu pt. „Wsparcie stypendialne dla doktorantów na kierunkach uznanych za strategiczne z punktu widzenia rozwoju Wielkopolski”, Poddziałanie 8.2.2 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

Genomiczna i epigenomiczna analiza genów kandydujących związanych z nieprawidłowym rozwojem płciowym psów z kariotypem żeńskim (78,XX) i brakiem genu *SRY*

Zaburzenia w rozwoju układu rozrodczego (DSD ang. *Disorders of sexual development*, obojnactwo) stanowią **poważny problem hodowlano – weterynaryjny**, gdyż prowadzą do bezpłodności, a w konsekwencji dochodzi do **obniżenia efektywności hodowli**. Zespół odwróconej płci zwierząt z kariotypem żeńskim (78,XX) oraz brakiem genu *SRY* jest najczęściej występującą formą obojnactwa psów. Zaburzenie to polega na niezgodności pomiędzy płcią chromosomową, a fenotypową. Zwierzęta obarczone takim zespołem cechują zmaskulinizowane zewnętrzne narządy płciowe (powiększona łechtaczka, w niektórych przypadkach zwiększona odległość pomiędzy sromem i odbytem), obecność macicy, nasieniowodów, jąder lub jajniko-jąder (*ovotestis*). Analiza molekularna ujawnia u takiego osobnika brak genu *SRY*, który uważany jest za inicjatora męskiej ścieżki determinacji płci. Nieprawidłowa budowa gonad tych zwierząt, to efekt **niepoznanej dotąd autosomalnej mutacji recesywnej**. Zwierzęta obarczone tą chorobową wadą rozwojową są więc potomstwem zdrowych nosicieli genu recesywnego. Świadczy to o **możliwości rozprzestrzeniania się tej wady rozwojowej**. Jak dotąd zespół odwróconej płci zidentyfikowano u 32 ras psów. Zdiagnozowano go ponadto u człowieka, kozy, konia, świni oraz jelenia. Zespół odwróconej płci psów jest następstwem konserwatywnej ewolucyjnie mutacji, o czym może świadczyć fakt, że zidentyfikowano ją u 31 ras tego gatunku. Jak dotąd nie udało się zidentyfikować mutacji sprawczej odpowiedzialnej za tę jednostkę chorobową u wspomnianego gatunku.



Fot. 1. Pies rasy mops obarczony zespołem odwróconej płci (78,XX; brak genu *SRY*)
 A) Powiększona łechtaczka z kością. B) Wynik elektroforezy DNA produktu łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) obejmującego fragment genu *SRY* o długości 369 par zasad (1,5% żelu agarozowy z dodatkiem bromku etydyny): 1 – kontrola bez DNA, 2 i 3 – kontrolne samice, 4 i 5 kontrolne samce, 6 – kontrolna samica, 26 – omawiany obojnak Autor zdjęć: S. Salamon

U człowieka opisywany fenotyp warunkuje duplikacja dużego regionu (74 kpb) przed genem *SOX9* (Xiao i wsp., 2013). Z kolei duplikację całego genu *SOX9* wraz z elementami 5' i 3' UTR zidentyfikowano u łani o obojnaczym fenotypie (Kropatsch i wsp., 2013). Podłoże genetyczne tej wady zostało poznane także u kóz, jest to delecja ok. 11700 nukleotydów położonych w pobliżu genów: *PISRT1* i *FOXL2* (Pailhoux i wsp., 2001). Analiza analogicznego regionu u psów nie ujawniła w tym rejonie mutacji sprawczej (Kothapalli i wsp., 2003). Z kolei Pujar i wsp. (2007) wskazali jako kandydujący region w chromosomie 29 pomiędzy markerami *CPH9* i *FH3003*, natomiast Świtoński i wsp. (2011) sugerowali, że rejon zawierający mutację sprawczą za znajduje się w chromosomie 23 psa.

Poszukiwana mutacja może być położona w regionie przycentromerowym chromosomu 23 psa (CFA23), na co wskazała identyfikacja translokacji robertsonowskiej między chromosomami 5 i 23 u berneńskiego psa pasterskiego, obciążonego zespołem odwróconej płci (Świtoński i wsp., 2011). W tym regionie analizy bioinformatyczne ujawniły obecność 3 genów: *CLASP2*, *UBP1*, *FBXL2*, które ze względu na swą lokalizację stały się genami kandydującymi dla opisywanej jednostki chorobowej. Ponadto, w chromosomie 23 psa zlokalizowane są także geny zaangażowane w żeńską ścieżkę determinacji płci, do których należą: *CTNNB1* oraz *FOXL2*. Produkt genu *CTNNB1* stanowią β -kateniny, które są ważnym elementem w podtrzymaniu różnicowania gonady żeńskiej poprzez hamowanie ekspresji genów męskiej ścieżki różnicowania płci (takich jak *SOX9* i *AMH*) i aktywację genów żeńskiej ścieżki (*FOXL2*, *BMP2*, *WNT4*, *FST*) (Maatouk i wsp., 2008 Nef i Vassali, 2009;). Wykazano istotną rolę produktu *FOXL2* w różnicowaniu się komórek granulocy, a także w podtrzymaniu rozwoju jajników. Ponadto jest on inhibitorem ekspresji genów męskiej

ścieżki determinacji płci i rozwoju gonad (Nef i Vassali, 2009). W świetle powyższych informacji zasadne jest sprawdzenie hipotezy Świtońskiego i wsp. (2011), czy wytypowane geny kandydujące z chromosomu 23 są związane z rozwojem badanego zaburzenia rozwojowego.

Metylacja DNA polega na kowalencyjnym wiązaniu się grupy metylowej do węgla w pozycji 5 pierścienia cytozyny. Reakcja ta katalizowana jest przez metylotransferazę DNA (DNMT) i dotyczy cytozyny wchodzącej w skład sekwencji 5'-CG-3' (rzadziej 5'-CA-3' lub 5'-CT-3'). Większe skupiska niezmetylowanych dinukleotydów 5'-CG-3', zlokalizowane w regionach o długości 500 – 5000 pz, o zwiększonej w porównaniu z całym genomem zawartości par GC (60%-70%), nazywane są wyspami CpG. Wyspy CpG położone są zazwyczaj w regionach regulatorowych ponad 50% wszystkich genów w genomie człowieka i myszy. Głównie są to geny ulegające ekspresji we wszystkich komórkach, czyli pełniące funkcję gospodarza komórki. Metylacja DNA nie ma wpływu na zdolność nici DNA do oddziaływań z nicią komplementarną, wywołuje natomiast zmiany w interakcji białko – DNA prowadząc do modyfikacji w strukturze chromatyny oraz zmianę powinowactwa DNA dla czynników i maszynerii transkrypcyjnej. A zatem metylacja DNA w obrębie sekwencji regulatorowej genu ma znaczenie dla jego ekspresji.

Ponadto zakłada się, że różnice profilu metylacji wysp CpG promotorów wybranych genów podlegających ekspresji w gonadach psów zdrowych oraz obarczonych zespołem odwróconej płci (78,XX; brak genu *SRY*), **mogą dostarczyć niepoznanych jak dotąd informacji o mechanizmach epigenetycznych zaangażowanych w rozwój i determinację płci ssaków.**

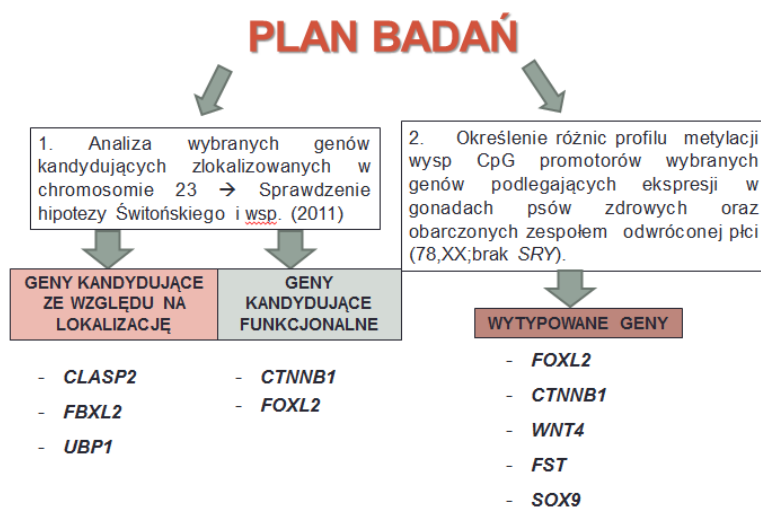
Celem badań jest:

- a) Analiza wybranych genów kandydujących zlokalizowanych w chromosomie 23 psa, u psów z zespołem odwróconej płci z karyotypem żeńskim, przy pomocy technik molekularnych, m.in.: sekwencjonowania z użyciem sekwenatora kapilarnego.
- b) Określenie różnic profilu metylacji wysp CpG promotorów wybranych genów podlegających ekspresji w gonadach psów zdrowych oraz obarczonych zespołem odwróconej płci (78,XX;brak genu *SRY*).

Materiał do badań stanowi krew obwodowa 48 psów należących do trzech grup:

(1) 19 psów, u których zdiagnozowano zespół odwróconej płci na podstawie oceny zewnętrznych narządów płciowych (powiększona łechtaczka), badań cytogenetycznych (karyotyp żeński 78,XX) oraz badań molekularnych (brak genu *SRY*) (w tym 10 osobników z pełnym opisem histologicznym wyciętych gonad), (2) 15 zdrowych samic reprezentujących te same rasy z których pochodziły osobniki obojnacze, (3) 14 zdrowych samic pochodzących z ras u których jak dotąd nie zidentyfikowano omawianej chorobowej wady rozwojowej.

Do analizy profilu metylacji DNA wykorzystane zostaną gonady psów ze zdiagnozowanym zespołem odwróconej płci (tkanki mrożone, zatopione w bloczkach parafinowych oraz zanurzone w formalinie), a także gonady od zdrowych samic pochodzące z zabiegów sterylizacji przeprowadzanych przez lekarza weterynarii.



Ryc.1. Plan badań przygotowywanej pracy doktorskiej z uwzględnieniem wytypowanych genów.

Do metody badawczych stosowanych podczas przygotowywania prezentowanej pracy doktorskiej zalicza się:

- Izolacja DNA z krwi, tkanek zamrożonych, tkanek zatopionych w bloczkach parafinowych oraz tkanek zanurzonych w formalinie.
- Amplifikacja fragmentów DNA z wykorzystaniem PCR (ang. *Polymerase Chain Reaction*). Startery do reakcji zaprojektowano z wykorzystaniem programu Primer3.
- Sekwencjonowanie konwencjonalne (z wykorzystaniem sekwenatora kapilarnego Genetic Analyzer 3130) wytypowanych *a priori* genów kandydujących w celu identyfikacji mutacji sprawczej.
- Ocena poziomu metylacji wysp CpG promotorów wybranych genów techniką sekwencjonowania po konwersji DNA wodorosiarczanem sodu (BS – bisulfite sequencing). Po izolacji DNA z gonad, przeprowadzona zostanie konwersja z wykorzystaniem zestawu EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit (Qiagen). Powielone produkty PCR zostaną wklonowane do wektora pGEM ®-T Easy Vectors (Promega) i wprowadzone do komórek bakterii *E. coli* Emax DH 10 b (Invitrogen). Po transformacji nastąpi amplifikacja badanych fragmentów bezpośrednio z uzyskanych klonów, a następnie sekwencjonowanie tak uzyskanych ampliconów z wykorzystaniem sekwenatora kapilarnego Genetic Analyzer 3130.

Grant OPUS: 2012/05/B/NZ9/00907

Literatura:

- Kothapalli KS, Kirkness E, Natale LJ, Meyers-Wallen VN. *Exclusion of PISRT1 as a candidate locus for canine Sry-negative XX sex reversal*. Anim Genet. 2003 Dec;34(6):467-9.
- Kropatsch R, Dekomien G, Akkad DA, Gerding WM, Petrasch-Parwez E, et al. (2013) SOX9 Duplication Linked to Intersex in Deer. PLoS ONE 8(9): e73734. doi:10.1371/journal.pone.0073734
- Maatouk DM, DiNapoli L, Alvers A, Parker KL, Taketo MM, Capel B. *Stabilization of beta-catenin in XY gonads causes male-to-female sex-reversal*. Hum Mol Genet. 2008 Oct 1;17(19):2949-55. doi: 10.1093/hmg/ddn193. Epub 2008 Jul 9.
- Nef S, Vassalli JD. *Complementary pathways in mammalian female sex determination*. J Biol. 2009 Sep 2;8(8):74. doi: 10.1186/jbiol173. Review.
- Pailhoux E, Vigier B, Chaffaux S, Servel N, Taourit S, Furet JP, Fellous M, Grosclaude F, Cribiu EP, Cotinot C, Vaiman D. *A 11.7-kb deletion triggers intersexuality and polledness in goats*. Nat Genet. 2001 Dec;29(4):453-8.
- Switonski M, Payan-Carreira R, Bartz M, Nowacka-Woszek J, Szczerbal I, Colaço B, Pires MA, Ochota M, Nizanski W. *Hypospadias in a male (78,XY; SRY-positive) dog and sex reversal female (78,XX; SRY-negative) dogs: clinical, histological and genetic studies*. Sex Dev. 2012;6(1-3):128-34.
- Xiao B¹, Ji X, Xing Y, Chen YW, Tao J. *A rare case of 46, XX SRY-negative male with approximately 74-kb duplication in a region upstream of SOX9*. Eur J Med Genet. 2013 Dec;56(12):695-8. doi: 10.1016/j.ejmg.2013.10.001. Epub 2013 Oct 18.