

Dziedziczny zespół odwróconej płci (78,XX; brak genu SRY) u szczeniąt owczarka niemieckiego

MAREK ŚWITOŃSKI, JOANNA NOWACKA, ANNA SKORCZYK,
AGATA CHMURZYŃSKA, WOJCIECH NIŻAŃSKI*

Katedra Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt Wydziału Hodowli i Biologii Zwierząt AR, ul. Wołyńska 33, 60-637 Poznań

*Katedra i Klinika Rozrodu Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Grunwaldzka 49, 50-366 Wrocław

Świtoński M., Nowacka J., Skorczyk A., Chmurzyńska A., Niżański W.

Hereditary sex-reversal syndrome (78,XX; SRY-negative) in German shepherd puppies

Summary

Two German shepherd puppies originating from the same litter were subjected to cytogenetic and molecular genetic analysis due to ambiguous external genitalia (enlarged clitoris). Evaluation of the Giemsa stained chromosome preparations revealed that both puppies had normal female karyotype – 78,XX. PCR amplification of the Y-linked genes, namely SRY and ZFY, showed a lack of these genes in their genotypes. Taking into consideration the above observations it was concluded that the puppies demonstrated hereditary sex-reversal syndrome, caused by an unknown autosomal recessive gene. These puppies are the first cases of this syndrome diagnosed in dogs bred in Poland.

Keywords: dog, sex reversal syndrome, intersexuality

Determinacja i różnicowanie płci jest złożonym procesem, w który zaangażowanych jest szereg genów (2, 12). Wśród genów pełniących kluczową rolę w ukierunkowaniu rozwoju gonady płodowej w kierunku jądra należy wymienić przynajmniej dwa geny: SRY i SOX9. Zaburzenie przebiegu tego procesu prowadzi do powstania wrodzonych wad rozwojowych układu rozrodczego, czego skutkiem jest niepłodność, niejed-



Ryc. 1. Przerośnięta lechtaczka u szczenięcia owczarka niemieckiego (strzałka)

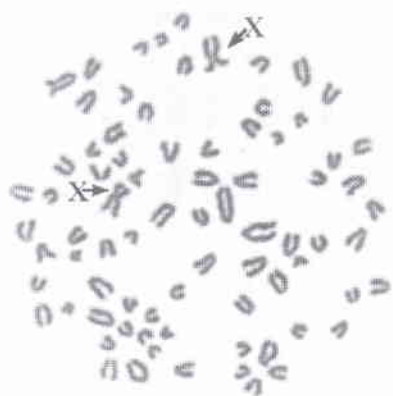
nokrotnie połączona z objawami obojnactwa. Do głównych przyczyn wywołujących powstanie takich wad u psów zalicza się nieprawidłowości chromosomowe – głównie aneuploidie chromosomów płci (15) oraz zespół odwróconej płci u zwierząt z kariotypem żeńskim (8). Zwierzęta obarczone zespołem odwróconej płci posiadają w różnym stopniu zmaskulinizowane zewnętrzne narządy płciowe (zazwyczaj jest to przerost lechtaczki) oraz pozbawione aktywności spermatogenetycznej jądra lub jajnikojądra. Analiza molekularna nie wykazuje obecności genu SRY, a rozwój gonady płodowej w kierunku jądra jest efektem działania nieznaną dotąd mutacji genu autosomalnego. Najnowsze badania Meyers-Wallen (6) wskazują, że w przypadku psów nieprawidłowość ta może być spowodowana zaburzeniem kontroli ekspresji genu SOX9.

Poniżej opisano po raz pierwszy w Polsce przypadki zespołu odwróconej płci (78,XX; brak genu SRY) psów, które stwierdzono u dwóch szczeniąt owczarka niemieckiego, pochodzących z tego samego miotu.

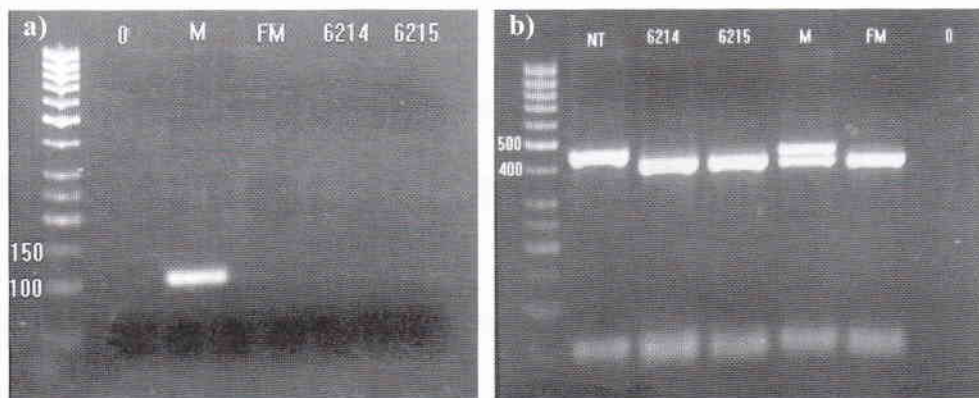
Materiał i metody

Dwa fenotypowo normalne szczenięcia owczarka niemieckiego zostały skierowane na badania genetyczne w związku ze zmaskulinizowaniem zewnętrznych narządów płciowych, wyrażającym się przerostem lechtaczki (ryc. 1).

W celu wykonania badań cytogenetycznych i molekularnych od zwierząt pobrano krew do probówek z heparyną (badania cytogenetyczne) i EDTA (badania molekular-



Ryc. 2. Płytki metafazowa pochodząca od szczenięcia z odwróconą płcią (barwienie odczynnikiem Giemsy) – 78,XX



Ryc. 3. a) Rozdział elektroforetyczny amplifikowanego techniką PCR fragmentu genu SRY; b) Rozdział elektroforetyczny amplifikowanego techniką PCR fragmentu genu ZFX oraz ZFY po trawieniu enzymem restrykcyjnym HaeIII

Oznaczenia: NT – próba nie trawiona; M – referencyjny samiec; 78,XY; FM – referencyjna samic; 78,XX; 0 – kontrola (bez matrycy DNA); 6214 i 6215 – badane osobniki

ne). Preparaty chromosomowe uzyskano z hodowanych *in vitro* limfocytów krwi. Obserwacji mikroskopowej poddano po 100 metafaz barwionych konwencjonalnie odczynnikiem Giemsy. Do oceny cytogenetycznej zastosowano międzynarodowy wzorzec kariotypu psa (14).

Analiza molekularna dotyczyła stwierdzenia obecności genu SRY. W tym celu wyizolowano z komórek krwi DNA z zastosowaniem zestawu Blood DNA Prep Plus (A&A Biotechnology, Poland). Fragment genu SRY amplifikowano przy pomocy następujących starterów (8): F: 5'-CTCGC-GATCAAAGGCGCAAGAT oraz R: 5'-TCCGGCTTCTG-TAAGCATTTTC.

Zastosowano następujący protokół amplifikacji: denaturacja wstępna w 94°C przez 10 min., denaturacja w 94°C przez 30 sek., wiązanie starterów w 64°C przez 40 sek., synteza w 72°C przez 1 min. (35 cykli), synteza końcowa w 72°C przez 10 min. Uzyskano produkt długości 104 pz. Elektroforezę produktów PCR prowadzono w 1,5% żelu agarozowym, pod napięciem 100 V.

Analizie poddano również gen ZFX/ZXY z zastosowaniem starterów (11): F: 5'-ATAATCACAAATGGAGGCCA-CAAAGCT oraz R: 5'-GCACTTCTTTTGGTATCTGA-GAAAGT.

Zastosowano następujący protokół amplifikacji: denaturacja wstępna w 94°C przez 10 min., denaturacja w 94°C przez 30 sek., wiązanie starterów w 53°C przez 40 sek., synteza w 72°C przez 1 min. (35 cykli), synteza końcowa w 72°C przez 10 min. Uzyskano produkt długości 448 pz. Następnie przeprowadzono trawienie enzymem restrykcyjnym HaeIII w 37°C przez 3,5 godziny. Uzyskano fragmenty długości 448, 443 i 45 pz charakterystyczne dla płci męskiej oraz 403 i 45 pz charakterystyczne dla płci żeńskiej. Zarówno elektroforezę produktów PCR, jak i fragmentów po trawieniu enzymem restrykcyjnym prowadzono w 1,5% żelu agarozowym pod napięciem 100 V.

Wyniki i omówienie

Zestaw chromosomów psa charakteryzuje się tym, że dwuramiennie chromosomy płci są bardzo łatwe do odróżnienia od akrocentrycznych autosomów. Wykonane analizy wykazały, że oba szczenięcia miały prawidłowy kariotyp żeński – 78,XX (ryc. 2). Chromoso-

my X miały typową dla tego gatunku morfologię i wielkość. Analizy molekularne nie ujawniły obecności genów położonych w chromosomie Y: SRY oraz ZFY w genotypie badanych szceniąt (ryc. 3a i 3b). W świetle powyższych wyników uznano, że oba szczenięcia są obarczone dziedzicznym zespołem odwróconej płci – 78,XX, powiązany z brakiem genu SRY. Opisane przypadki rodzinnego wystąpienia zespołu odwróconej płci u psów są pierwszymi doniesieniami o obecności takiej wady u psów hodowanych w Polsce. Należy jednak zaznaczyć, że przypadki tego typu opisano już kilkakrotnie w literaturze światowej (5, 7, 8). Zmiany kliniczne u zwierząt obarczonych tą wadą były bardzo podobne: przerost łechtaczki oraz obecność w jamie brzusznej niedorozwiniętych jąder lub jajnikojąder. Zwierzęta takie były zawsze nieplodne.

Podłoże molekularne zidentyfikowanego zespołu odwróconej płci nie jest poznane. Podkreślić należy, że podobne dziedziczne formy odwróconej płci opisano u szeregu gatunków ssaków domowych: koń (1), świnia (9, 13), a także kóz, u których ta wada jest znana pod nazwą obojnactwo bezrożnych kóz. Niedawno ustalono, że odwrócona płć bezrożnych kóz spowodowana jest delecją ponad 11 tysięcy par nukleotydów w chromosomie 1. Mutacja ta upośledza ekspresję genów PISRT1 i FOXL2 (10). W przypadku pozostałych gatunków na razie brak jest danych, które wskazywałyby, jaka mutacja odpowiada za powstanie tej wady. Ostatnio wykazano, że za wystąpienie tej wady u psów nie jest odpowiedzialna mutacja wym. genu PISRT1 (4). Natomiast w świetle dotychczasowych obserwacji można stwierdzić, że wada ta warunkowana jest przez autosomalną mutację recesywną. Oznacza to, że występuje ona jedynie u samic, które posiadają prawidłowy układ chromosomów płci oraz genotyp homozygoty recesywnej w nieznanym jeszcze *locus* autosomalnym. Zwierzęta takie mogą się pojawić jedynie w potomstwie nosicieli genu recesywnego – Aa (tab. 1). Wskazuje to na możliwość rozprzestrzeniania się tej wady.

Tab. 1. Dziedziczenie recesywnej mutacji odpowiedzialnej za powstanie zespołu odwróconej płci u samic

Gamety produkowane przez samicę	Gamety produkowane przez samca			
	XA	Xa	YA	Ya
XA	XXAA	XXAa	XYAA	XYAa
Xa	XXAa	XXaa obojnak	XYAa	XYaa

Objaśnienia: X oraz Y – chromosomy płci, A oraz a – gen prawidłowy i gen zmutowany odpowiedzialny za powstanie wady

Tab. 2. Rasy psów, u których stwierdzono występowanie zespołu odwróconej płci (78,XX; SRY-negatywny) oraz jego objawy kliniczne

Rasa	Zaburzenia w układzie rozrodczym	Referencja
Cocker spaniel amerykański		
Beagle		
Soft-coated wheaten terrier	Jądra lub jajnikojądra; powiększona łechtaczka	8
Walker hound		
Doberman		
Wyżeł krótkowłosey	Jajnikojądra; powiększona łechtaczka z elementami kości	7
Elkhound	Jajnikojądra; powiększona łechtaczka	5
Basset	Powiększona łechtaczka; skrócona pochwa	3
Beagle	Jądra; obojnacze zewnętrzne narządy płciowe	16
Owczarek niemiecki	Zmaskulinizowanie zewnętrzne narządy płciowe; przerośnięta łechtaczka	niniejsze badania

Zespół odwróconej płci opisano w kilku rasach psów, co świadczy o tym, że nie jest to problem dotyczący tylko jednej rasy (tab. 2). Dlatego precyzyjne diagnozowanie podłoża zaburzeń rozwojowych układu rozrodczego ma istotne znaczenie dla zapobiegania rozprzestrzeniania się opisywanej wady. Wystąpienie przerostu łechtaczki powinno być jednoznacznym wskazaniem do wykonania badań cytogenetycznych i molekularnych. Jeśli wykażą one obecność kariotypu żeńskiego (78,XX) oraz brak genu SRY i innych genów położonych w chromosomie Y, to można wyciągnąć z tego wniosek, że rodzice badanego zwierzęcia są nosicielami recesywnego genu odpowiadającego za powstanie zespołu odwróconej płci. Diagnoza taka powinna mieć swoje konsekwencje hodowlane, polegające na rezygnacji z wykorzystania zwierząt nosicieli niepożądanego genu w reprodukcji po to, aby nie dochodziło do jego rozprzestrzeniania się.

Piśmiennictwo

- Buoen L. C., Zhang T. Q., Weber A. F., Ruth G. R.: SRY-negative, XX intersex horses: the need for pedigree studies to examine the mode of inheritance of the condition. *Equine Vet. J.* 2000, 32, 78-81.
- Cotinot C., Pailhoux E., Jaubert F., Fellous M.: Molecular genetics of sex determination. *Semin. Reprod. Med.* 2002, 20, 157-167.
- Hubler M., Hauser B., Meyers-Wallen V. N., Arnold S.: Sry-negative XX true hermaphrodite in a Basset hound. *Theriogenology* 1999, 51, 1391-1403.

- Kothapalli K. S. D., Kirkness E., Natale L. J., Meyers-Wallen V. N.: Exclusion of PISRT1 as a candidate locus for canine Sry-negative XX sex reversal. *Anim. Genet.* 2003, 34, 467-468.
- Melniczek J. R., Dambach D., Prociuk U., Język P. F., Henthorn P. S., Patterson D. F., Giger U.: Sry-negative XX sex reversal in a family of Norwegian Elkhounds. *J. Vet. Intern. Med.* 1999, 13, 564-569.
- Meyers-Wallen V. N.: Sry and Sox9 expression during canine gonadal sex determination assayed by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. *Mol. Reprod. Dev.* 2003, 65, 373-81.
- Meyers-Wallen V. N., Bowman L., Acland G. M., Palmer V. L., Schlafer D., Fajt V.: Sry-negative XX sex reversal in the German shorthaired pointer dog. *J. Hered.* 1995, 86, 369-374.
- Meyers-Wallen V. N., Schlafer D., Barr I., Lovell-Badge R., Keyzner A.: Sry-negative XX sex reversal in purebred dogs. *Mol. Reprod. Dev.* 1999, 53, 266-273.
- Pailhoux E., Popescu C. P., Parma P., Boscher J., Legault C., Molteni L., Fellous M., Cotinot C.: Genetic analysis of 38,XX males with genital ambiguities and true hermaphrodites in pigs. *Anim. Genet.* 1994, 25, 299-305.
- Pailhoux E., Vigier B., Chaffaux S., Servel N., Taourit S., Furet J. P., Fellous M., Grosclaude F., Criblu E. P., Cotinot C., Vaiman D.: A 11.7-kb deletion triggers intersexuality and polledness in goats. *Nat. Genet.* 2001, 29, 453-458.
- Senese C., Penedo M. C. T., Shiue Y-L., Bowling A. T., Millon L. V.: A HaeIII PCR-RFLP in the ZFY/ZFX genes of horses. *Anim. Genet.* 1999, 30, 390-391.
- Szatkowska I., Zych S., Kulig H.: Determinacja płci u ssaków. *Medycyna Wet.* 2003, 59, 847-852.
- Świtoński M., Jackowiak H., Godynicki S., Klukowska J., Borsiak K., Urbaniak K.: Familial occurrence of pig intersexes (38,XX; SRY-negative) on a commercial fattening farm. *Anim. Reprod. Sci.* 2002, 69, 117-124.
- Świtoński M., Reimann N., Bosma A. A., Long S., Bartnizke S., Pienkowska A.: Report on the progress of standardization of the G-banded canine (*Canis familiaris*) karyotype. Committee for the Standardized Karyotype of the Dog (*Canis familiaris*). *Chromosome Res.* 1996, 4, 306-309.
- Świtoński M., Szczerbal I., Grewling J., Antosik P., Niżański W., Yang F.: Two cases of infertile bitches with 78,XX/77,X mosaic karyotype: a need for cytogenetic evaluation of dogs with reproductive disorders. *J. Hered.* 2003, 94, 65-68.
- Williams J., Partington B. P., Smith B., Hedlund C. S., Law A. M.: Pyovagina and stump pyometra in a neutered XX sex-reversed beagle: a case report. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 1997, 33, 83-90.

Adres autora: prof. dr hab. Marek Świtoński, Katedra Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt AR, ul. Wołyńska 33, 60-637 Poznań; e-mail: switonsk@jay.au.poznan.pl

MALORNY B., SCHROETER A., GUERRA B., HELMUTH R.: Występowanie oporności na chinolony szczepów *Salmonella* izolowanych od drobiu, bydła i świń w Niemczech w latach 1998-2001. (Incidence of quinolone resistance in strains of *Salmonella* isolated from poultry, cattle and pigs in Germany between 1998-2001). *Vet. Rec.* 153, 643-648, 2002 (21)

Oznaczono wrażliwość na kwas nalidyksowy i cyprofloksacynę 14 514 szczepów *Salmonella* izolowanych od bydła, świń i drobiu w Niemczech w okresie 1998-2001. Przyjęto dla szczepów wrażliwych na kwas nalidyksowy wartość MIC poniżej 16 µg/ml, a dla cyprofloksacyny poniżej 4 µg/ml. Wartość MIC dla cyprofloksacyny dla szczepów o obniżonej wrażliwości wynosiła 0,125-2,0 µg/ml. Szczepy salmonelli odporne na kwas nalidyksowy izolowano najczęściej od drobiu. Od 35% do 74% szczepów *S. Paratyphi B*, *S. Hadar* i *S. Wirchow* izolowanych od drobiu było opornych na kwas nalidyksowy. Szczepy odporne na kwas nalidyksowy cechowała obniżona wrażliwość na cyprofloksacynę. Porównanie wartości MIC dla cyprofloksacyny dla *S. Paratyphi B*, *S. Hadar*, *S. Wirchow* i *S. Enteritidis* wyizolowanych w 1998/1999 i 2000/2001 wykazało wzrost wartości MIC dla cyprofloksacyny do 2,0 µg/ml. Sekwencjonowano gen *gyrA* odpowiedzialny za oporność na chinolony. W genie *gyrA* szczepów opornych w pozycji 83 i 87 występowały zmiany w składzie aminokwasów.