

---

ANNALS  
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA  
LUBLIN – POLONIA

VOL. XXXIII (1)

SECTIO EE

2015

---

<sup>1</sup> Katedra Biotechnologii Zwierząt, Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja  
w Krakowie, 30-278 Kraków, ul. Rędzina 1b, e-mail: rzkaczor@cyf-kr.edu.pl

<sup>2</sup> Katedra Genetyki i Ogólnej Hodowli Zwierząt, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego  
w Warszawie, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa

<sup>3</sup> Dział Ochrony Zasobów Genetycznych Zwierząt, Instytut Zootechniki –  
Państwowy Instytut Badawczy, Balice k. Krakowa

URSZULA KACZOR<sup>1</sup>, MIROSŁAW KUCHARSKI<sup>1</sup>,  
ELŻBIETA MARTYNIUK<sup>2</sup>, JĘDRZEJ KRUPIŃSKI<sup>3</sup>

### **Analiza polimorfizmu w genie *FGFR3* u owiec rasy suffolk**

Polymorphism analysis of *FGFR3* gene in Suffolk sheep

**Streszczenie.** Zespół pajęczy (ang. Spider Lamb Syndrome, SLS) to dziedziczna chondrodysplazja, związana z nieprawidłowym rozwojem układu mięśniowo-szkieletowego owiec. Jest to schorzenie monogeniczne, spowodowane obecnością autosomalnego, recesywnego allelu w genie receptora czynnika wzrostu fibroblastów 3 (*FGFR3*). Celem pracy było określenie obecności substytucji g.1719T>A w genie *FGFR3*, która w układzie homozygotycznym powoduje chondrodysplazję owiec, m.in. rasy suffolk, hampshire, shropshire, oxford. Doświadczeniem objęto 240 maciorek rasy suffolk z trzech stad zarodowych zlokalizowanych w Polsce południowej, środkowej i północno-zachodniej w latach 2011–2012. Wyniki badań, którymi objęto 240 owiec rasy suffolk, wskazują na brak allelu odpowiadającego za wystąpienie zespołu SLS. Biorąc pod uwagę wielkość przebadanej populacji, należy stwierdzić, że prawdopodobieństwo występowania nosicieli recesywnego allelu *FGFR3*<sup>SLS/</sup> w krajowej populacji suffolk jest bardzo niskie.

**Słowa kluczowe:** *FGFR3*, polimorfizm, owce, syndrom pajęczy

#### WSTĘP

Syndrom pajęczy (ang. SLS, Spider Lamb Syndrome) to dziedziczna chondrodysplazja owiec objawiająca się nieprawidłowym rozwojem układu mięśniowo-szkieletowego [Rook i in. 1988, Vanek i in. 1989]. Po raz pierwszy zespół ten opisano u jagniąt w latach 70. XX w. [Saperstein i in. 1975]. Późniejsze doniesienia wskazywały, iż jest on charakterystyczny dla czarnogłowych ras owiec utrzymywanych w Stanach Zjednoczonych i Kanadzie, przede wszystkim u ras suffolk i hampshire [Rook i in. 1988, Keegan i in. 1991].

Dziedziczna chondrodysplazja owiec związana jest z nieprawidłowym rozwojem tkanki kostnej i chrzęstnej. Zwierzę cierpiące na SLS charakteryzuje się nienormalnie

długimi, zdeformowanymi kończynami, nieprawidłowym umięśnieniem, a także skrzywieniami kręgosłupa, odkształceniami żeber oraz deformacjami głowy, m.in. tzw. rzymskim nosem [Rook i in. 1988, Vanek i in. 1989]. Przeprowadzenie szeregu badań radiologicznych i histologicznych pozwoliło stwierdzić szereg nieprawidłowości w tkankach owiec dotkniętych chorobą, takich jak erozja tkanki chrzęstnej i obecność tkanki chrzęstnej w gąbczastej tkance kostnej (chondrodysplazja) [Rook i in. 1986, Vanek i in. 1986, Vanek i in. 1989, Nakano i in. 1994].

SLS jest schorzeniem monogenicznym, spowodowanym obecnością autosomalnego, recesywnego genu dziedziczonego według praw Mendla [Hanneman 1985, Toydemir i in. 2006]. Nieprawidłowości związane z tym syndromem ujawniają się u homozygot recesywnych z pełną ekspresją w fenotypie, obserwowaną już pod koniec drugiego trymestru ciąży [Berg i in. 1987, Oberbauer i in. 1995]. Wykazano, że transwersja tyminy w adeninę w pozycji 1719 nukleotydu (egzon 17) genu receptora czynnika wzrostu fibroblastów 3 (*FGFR3*, ang. fibroblast growth factor receptor 3) jest odpowiedzialna za podstawienie aminokwasów w łańcuchu białka (V700E) i wystąpienie syndromu pajączego [Beever i in. 1998, Cockett i in. 1999, Beever i in. 2006]. Locus genu *FGFR3* znajduje się u owiec na chromosomie 6. Zidentyfikowano w nim 2 mutacje – oprócz badanej 1719T>A mutację cichą w pozycji 955 nukleotydu (955G>C, egzon 11). Receptor czynnika wzrostu fibroblastów 3 należy do rodziny białek receptorów kinaz tyrozynowych. W swej budowie *FGFR3* zawiera trzy domeny insulinopodobne, parę domen kinaz tyrozynowych znajdujących się w cytoplazmie oraz jedną domenę transmembranową. Białko to chroni przed nadmiernym rozrostem kości długich poprzez kontrolę proliferacji [Peters i in. 1993, Keegan i in. 1991]. Myszy pozbawione genu *FGFR3* cechują się przerostem tkanki kostnej spowodowanym nieograniczoną proliferacją chondrocytów [Colvin i in. 1996, Deng i in. 1996]. Nadekspresja tego genu skutkuje zmniejszoną proliferacją i ograniczeniem powierzchni płytek wzrostu kości u myszy [Naski i in. 1998]. U ludzi zidentyfikowano szereg chorób związanych z występowaniem mutacji w genie *FGFR3*, takich jak achondroplazja, hipochondroplazja, dysplazja tanatoforyczna typu I i II, ciężka achondroplazja z opóźnieniem rozwojowym i rogowacieniem ciemnym (SADDAN), kraniosynostoza (zespół Crouzona) i zespół nadpobudliwości ruchowej LADD [Troyer i in. 1988, Cohen 2002].

Na przestrzeni ostatnich lat hodowcy owiec rasy suffolk importowali do naszego kraju materiał hodowlany m.in. z Niemiec, gdzie w populacji owiec tej rasy zidentyfikowano recesywny allel 1719T>A, odpowiedzialny za pojawianie się chondrodysplazji [Drögemuller i in. 2005]. Dlatego celem podjętych badań była identyfikacja polimorfizmu w genie *FGFR3* w wybranych stadach owiec rasy suffolk.

#### MATERIAŁ I METODY

Doświadczeniem objęto 240 macierek rasy suffolk z trzech stad zarodowych zlokalizowanych w Polsce południowej, środkowej i północno-zachodniej w latach 2011–2012. W monitorowanych stadach badaniami objęto wszystkie matki. Przeprowadzono wywiad środowiskowy, który nie wykazał anomalii kostnych u potomstwa. Zgromadzony materiał biologiczny pochodził od około 40% całej krajowej populacji macierek rasy suffolk, wpisanych do ksiąg zwierząt zarodowych w latach 2011–2012 [PZO 2012, 2013].

Od zwierząt pobrano jednorazowo krew z żyły szyjnej zewnętrznej do próbek z  $K_3EDTA$  (Sarstead, Polska). Izolację DNA genomowego przeprowadzono przy pomocy kitu Wizard (Promega, Niemcy). Identyfikację polimorfizmu 1719T>A w *locus* genu *FGFR3* wykonano metodą PCR-RFLP [Cockett i in. 1999], wykorzystując startery: FGFR3F: 5'-GACGTACCCTGGCATCCTCG-3' oraz FGFR3R: 5'-TCAGCGCCCGCCCTCGAGACT-3'. Reakcję PCR przeprowadzono w objętości 20  $\mu$ l roztworu, stosując profil termiczno-czasowy: 94°C – 7 min; 94°C – 45", 62°C – 45", 72°C – 45" (35 cykli); 72°C – 10 min. Zastosowano następujący skład mieszaniny reakcyjnej PCR: 3,0 mM  $MgCl_2$ , 0,25 mM dNTP, 0,1 pmol każdego ze starterów, 1 U *Taq* polimerazy (Thermo Scientific, Litwa), 200 ng DNA. Otrzymany produkt PCR trawiono enzymem restrykcyjnym *XhoI* (Thermo Scientific, Litwa) przez 3 godz. w temperaturze 37°C, a następnie produkty reakcji rozdzielano w 3% żelu agarozowym (Agarose for routine use, Sigma-Aldrich) przez 1,5 godz. i wizualizowano w G:BOX Chemi XR5 (Syngene, UK).

#### WYNIKI

Zastosowanie metody PCR-RFLP u krajowych owiec rasy suffolk pozwoliło na uzyskanie produktu PCR obejmującego fragment badanego genu o wielkości 147 pz. W materiale biologicznym nie stwierdzono obecności miejsca cięcia dla enzymu restrykcyjnego *XhoI*, co upoważnia do stwierdzenia, że przebadana populacja owiec jest monoalliczna i nie występuje u niej mutacja decydująca o występowaniu syndromu pajęczego. Wykazano występowanie jedynie osobników o genotypie TT. Otrzymany w reakcji PCR produkt poddano sekwencjonowaniu i porównano jego sekwencję z sekwencją znajdującą się w bazie danych NCBI (AY737275), co potwierdziło homologię z owczym genem *FGFR3*, a także umożliwiło wykazanie, iż zwierzęta znajdujące się w analizowanej populacji są homozygotami dominującymi, z genotypem dzikim *FGFR3*<sup>+/+</sup>.

#### DYSKUSJA

Mutacja warunkująca niekorzystne deformacje kostne określana jako SLS obecna jest w stadach owiec od lat 60. XX w. i rozprzestrzeniła się w wyniku krzyżowania międzyrasowego u amerykańskich owiec suffolk, hampshire, shropshire, oxford, a następnie w stadach suffolka w Australii i Nowej Zelandii. Stosunkowo znaczny udział owiec będących nosicielami SLS przyczynił się do wzmożonej selekcji zwierząt pod kątem ewentualnego nosicielstwa metodami tradycyjnymi, które zastąpiono opracowanym w 1997 r. testem opartym na reakcji PCR [Beever i in. 1998, Beever i Cockett 2006].

Spadający odsetek zachorowań na SLS notuje się systematycznie od czasu wprowadzenia testu opartego na polimorfizmie pojedynczego nukleotydu opisanego, a następnie opatentowanego przez zespół Beevera [Beever i in. 1998, Beever i Cockett 2006]. Jolly i in. po przebadaniu około 2500 owiec rasy suffolk wskazali na istotny spadek liczebności heterozygotycznych osobników utrzymywanych w stadach na terenie Nowej Zelandii [Jolly i in. 2004]. Podobne wyniki uzyskano w Stanach Zjednoczonych, wykazując, iż 1,4% jagniąt cierpiących na zespół pajęczy stanowią heterozygoty AT w pozycji 1719 nukleotydu, co może sugerować prawdopodobieństwo występowania innego polimorfi-

zmu powiązanego z występowaniem u owiec SLS [Beever i in. 2006]. Badania przeprowadzone na 256 owcach rasy suffolk i hampshire down należących do stad brazylijskich wykazały, że 4% suffolków i 6% owiec rasy hampshire down jest nosicielami mutacji [Passos i in. 2009]. Natomiast wyniki badań przeprowadzonych w 2008 r. na 200 trykach irańskich owiec rasy baluchi i karakuł nie wykazały obecności nosicieli polimorfizmu *FGFR3* w badanej populacji [Nassir i in. 2008]. Zespół Drögemüllera, badając częstość występowania mutacji w genie *FGFR3* u niemieckich suffolków, wykazał jego obecność u 4% zwierząt. Autorzy wskazali jako źródło mutacji materiał hodowlany importowany do Niemiec z Nowej Zelandii i Australii [Drögemüller i in. 2005]. Smith i in. [2006] postawili hipotezę, że heterozygoty *FGFR3*<sup>SLS/+</sup> wykazujące zwiększony wzrost kości długich i większą ramę ciała mogą charakteryzować się lepszą użytkowością mięsną. Stwierdzili, że rzeczywiście jagnięta o genotypie *FGFR3*<sup>SLS/+</sup> vs *FGFR3*<sup>+/+</sup> miały większe rozmiary ciała, większą wysokość w kłębie, większą długość kości palca III śródreżca. Nie wykazano natomiast różnic w przyrostach dobowych masy ciała i powierzchni mięśnia najdłuższego grzbietu, ale jagnięta *FGFR3*<sup>SLS/+</sup> miały mniejsze otłuszczenie ciała [Smith i in. 2006].

Podsumowując wyniki badań i biorąc pod uwagę wielkość przebadanej populacji owiec rasy suffolk, należy stwierdzić, że prawdopodobieństwo występowania nosicieli recesywnego allelu *FGFR3*<sup>SLS/</sup> w krajowej populacji suffolków jest bardzo niskie. Dlatego też sugeruje się kontynuowanie podobnych badań jedynie w stadach, do których wprowadza się zwierzęta importowane.

#### PIŚMIENNICTWO

- Berg P.T., Alstad A.D., Moore B.L., Vanek J.A., Berg I.E., Misk C.A., 1987. The mode of inheritance of the "spider" lamb syndrome in Suffolk Sheep. *SID Res. Digest*. 4, 1–3.
- Beever J.E., Meyers S.N., Shay T.L., Stephens A., Cockett N.E., 1998. Spider lamb syndrome is caused by a point mutation in ovine fibroblast growth factor receptor 3. *Proceedings of the XXVI International Conference on Animal Genetics, International Society for Animal Genetics*, 81.
- Beever J.E., Cockett N.E., 2006. Screening for the molecular defect causing spider lamb syndrome in sheep. *US Patent No. 6, 306–591 B1*.
- Beever J.E., Smit M.A., Meyers S.N., Hadfield T.S., Bottema C., Albretsen J., Cockett N.E., 2006. A single-base change in the tyrosine kinase II domain of ovine *FGFR3* causes hereditary chondrodysplasia in sheep. *Anim. Genet.* 37, 66–71.
- Cockett N.E., Shay T.L., Beever J.E., Nielsen D., Albertsen J., Georges M., Peterson K., Stephens A., Vernon W., Timofeevskaia O., South S., Mork J., Maciulis A., Bunch T.D., 1999. Localization of the locus causing Spider Lamb Syndrome to the distal end of ovine chromosome 6. *Mamm. Genome*. 10, 35–38.
- Cohen Jr. M., 2002. Some chondrodysplasias with short limbs: Molecular perspectives. *Am. J. Med. Genet.* 112, 304–313.
- Colvin J.S., Bohne B.A., Harding G.W., McEwen D.G., Ornitz D.M., 1996. Skeletal overgrowth and deafness in mice lacking fibroblast growth factor receptor 3. *Nature Genet.* 12, 390–397.
- Deng C., Wynshaw-Boris A., Zhou F., Kuo A., Leder P., 1996. Fibroblast growth factor receptor 3 is a negative regulator of bone growth. *Cell* 84, 911–921.
- Drögemüller C., Wöhlke A., Distl O., 2005. Spider Lamb Syndrome (SLS) mutation frequency in German Suffolk sheep. *Anim. Genet.* 36, 539–540.
- Hanneman H.A., 1985. Letter to the editor. *Suffolk Banner*. 8, 30, 32–33.
- Jolly R.D., Blair H.T., Johnstone A.C., 2004. Genetic disorders of sheep in New Zealand: A review and perspective. *N. Z. Vet. J.* 52 (2), 52–64.

- Keegan K., Johnson D.E., Williams L.T., Hayman M.J., 1991. Isolation of an additional member of the fibroblast growth factor receptor family, FGFR-3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88, 1095–1099.
- Nakano T., Walker B., Young B. A., 1994. Analysis of tissues from normal lambs and those with spider syndrome. *Can. J. Anim. Sci.* 74, 583–585.
- Naski M.C., Colvin J.S., Coffin J.D., Ornitz D.M., 1998. Repression of hedgehog signaling and BMP4 expression in growth plate cartilage by fibroblast growth factor receptor 3. *Development* 125, 4977–4988.
- Nassiry M.R., Eftekhari Shahroudi F., Rezaee A.R., Tahmoorespour M., 2008. Non-carrier identification of Spider Lamb Syndrome in Iranian Baluchi and Karakul sheep by PCR-RFLP. *Biotechnology* 7, (3), 586–588.
- Oberbauer A.M., East N.E., Pool R., Rowe J.D., BonDurant R.H., 1995. Developmental progression of the Spider Lamb Syndrome. *Small Rumin. Res.* 18, 179–184.
- Passos D.T., Rodrigues E.E., Rodrigues N.C., Ribeiro L.A.O., Weimer T.A., 2009. Allele frequency of the spider lamb syndrome in Brazilian Hampshire Down and Suffolk flocks. *Small Rumin. Res.* 83, 79–91.
- Peters K., Ornitz D., Werner S., Williams W., 1993. Unique expression pattern of the FGF receptor 3 gene during mouse organogenesis. *Dev. Biol.* 155, 423–430.
- Polski Związek Owczarski (PZO), 2012. Hodowla owiec i kóz w Polsce w roku 2011. Warszawa.
- Polski Związek Owczarski (PZO), 2013. Hodowla owiec i kóz w Polsce w roku 2012. Warszawa.
- Rook J.S., Kopcha M., Spaulding K., Coe P., Benson M., Krehbiel J., Trapp A.L., 1986. A report on one purebred flock. *Compendium on Continuing Education* 8, 402–405.
- Rook J.S., Trapp A.L., Krehbiel J., Yamini B., Benson M., 1988. Diagnosis of hereditary chondrodysplasia (spider lamb syndrome) in sheep. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 193, 713–718.
- Saperstein G., Leipold H.W., Dennis S. M., 1975. Congenital defects of sheep. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 167, 314–322.
- Smith L.B., Dally M.R., Sainz R.D., Rodrigue K.L., Oberbauer A.M., 2006. Enhanced skeletal growth of sheep heterozygous for an inactivated fibroblast growth factor receptor 3. *J. Anim. Sci.* 84, 2942–2949.
- Toydemir R.M., Brassington A.E., Bayrak-Toydemir P., Krakowiak P.A., Jorde L.B., Whitby F.G., Longo N., Viskochil D.H., Carey J.C., Bamshad M.J., 2006. A novel mutation in *FGFR3* causes camptodactyly, tall stature, and hearing loss (CATSHL) syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 79, 935–941.
- Troyer D.L., Thomas D.L., Stein L.E., 1988. A morphologic and biochemical evaluation of the spider syndrome in Suffolk sheep. *Anat. Histol. Embryol.* 17, 289–300.
- Vanek J.A., Alstad A.D., Berg I.E., Misk A.R., Moore B.L., Limesand W., 1986. Spider syndrome in lambs: a clinical and postmortem analysis. *Vet. Med. (US)* 81, 663–668.
- Vanek J.A., Walter P.A., Alstad A.D., 1989. Radiographic diagnosis of hereditary chondrodysplasia in newborn lambs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 194, 244–248.

**Summary.** Spider lamb syndrome (SLS) or hereditary chondrodysplasia is associated with abnormal development of the musculoskeletal system in sheep. This monogenic disease is caused by an autosomal recessive allele in the fibroblast growth factor receptor 3 (*FGFR3*) gene. The aim of the study was to determine the presence of g.1719T>A substitution in the *FGFR3* gene, which in the homozygous configuration causes chondrodysplasia in Suffolk, Hampshire, Shropshire and Oxford sheep. The results of the study with 240 Suffolk sheep show that no allele is responsible for SLS. Considering the size of the analysed population, it is concluded that the probability of animals carrying the *FGFR3*<sup>SLS</sup> recessive allele in the national Suffolk population is very low.

**Key words:** *FGFR3*, polymorphism, sheep, Spider Lamb Syndrome