



## Povzetek projekta Po kreativni poti do znanja 2016/2017 za namen objave in predstavitve na spletni strani sklada

### 1. Polni naslov projekta: Znanje za zdravje družnih živali

- V katero področje na prvi klasifikacijski ravni **KLASIUS-P** se uvršča projekt glede na vsebinsko zasnovo (neustrezno področje izbršite):

6 - Kmetijstvo, gozdarstvo, ribištvo, veterinarstvo

### 2. V sodelovanju z: (navede se univerza oz. samostojni visokošolski zavod, ki je prijavil projekt in članica, ki je nosilka projekta ter partnerja – podjetja, ki je/sta vključena v projekt)

UL Veterinarska fakulteta, UL Biotehniška fakulteta, EVG, molekularna diagnostika d.o.o.

### 3. Besedilo:

- Opredelite problem, ki se je razreševal tekom izvajanja projekta

Variabilnost v genetskem zapisu vpliva na številne lastnosti in je lahko vzrok za različna bolezenska stanja. Za številne genetsko pogojene bolezni in lastnosti, ki bi bile po načinu dedovanja primerne za gensko diagnostiko, še nimamo razvitih testov, ki bi omogočali genotipizacijo živali za vzročne gene. Poznavanje genotipa živali na vzročnih lokusih omogoča načrtno odbiro plemenskih živali, ki niso genetsko obremenjene oziroma nosijo zapis za zelene lastnosti, in zgodnjo prepoznavo genetsko obremenjenih živali, ki jih lahko na podlagi poznavanja genotipa pravočasno in ustrezno oskrbimo ter na ta način omilimo ali celo preprečimo razvoj patološkega fenotipa. Z uporabo molekularnih testov lahko torej pomembno vplivamo na zdravstveno stanje in počutje živali ali omogočimo odbiro živali na določene lastnosti. V okviru projekta smo razvili genetske teste za določitev krvnih skupin pri mačkah, za prepoznavo paroksimalne diskinezije pri pšeničnih terierjih in defekt shranjevanja glikogena pri konjih ter pričeli z razvojem testa, ki bi omogočil prepoznavo genetskih vzrokov za agresijo pri psih.

- Opišite potek reševanja problema oz. kratek povzetek projekta

Študenti, ki so sodelovali v projektu so delovali v dveh delovnih skupinah; skupina študentov veterine je v kontaktu s Klinikom za male živali Veterinarske fakultete in lokalnimi veterinarskimi ambulantami opravila pregled bolezni za katere bi bilo smotno razviti genetski test, medtem ko je skupina študentov biotehnologije oblikovala protokole za razvoj novih molekularnih testov.

V začetnem delu projekta so študentje preučili obsežno literaturo s področja genetsko pogojenih bolezni pri psih, mačkah in konjih, ter izbrali tiste, ki bi bile primerne za genetska testiranja. Po diskusiji z mentorji se je izoblikoval predlog za razvoj genetskih testov za zgoraj omenjene bolezni oziroma lastnosti. S testom za krvne skupine pri mačkah smo poskusno določili krvne skupine za 25 živali, kjer smo uspešno ločili med krvnima skupinama A in B. Test za paroksimalno diskinezijo so študentje preverili na zdravih živalih, za dokončno potrditev validnosti testa pa bi potrebovali prenašalce bolezni ali prizadete živali, ki pa jih v času izvajanja projekta, glede na redkost te dedne bolezni, nismo uspeli pridobiti. Ideja

za zasnovu testa za PSSM (polisaharidna hrambna miopatija) pri slovenskih hladnokrvnih konjih, pri katerih ta bolezen do sedaj še ni bila raziskana, se je porodila ob pregledu konj v žrebetišču te slovenske avtohtone pasme, kjer smo pridobili tudi vzorce za analizo. Študentje so opravili genotipizacijo 21 konj slovenske hladnokrvne pasme in našli 6 živali, ki so nosilke tega genetskega defekta, kar pojasnjuje pogosto pojavljanje »nedeljske bolezni konj« pri tej pasmi. Ob koncu projekta smo organizirali še zbiranje vzorcev psov iz vzreje Slovenske vojske, ki jih bomo v nadaljevanju uporabili za postavitve genetskega testa za agresivno obnašanje.

Pri razvoju laboratorijskih testov so pedagoški mentorji in delovni mentor študentom pomagali pri optimizaciji laboratorijskih postopkov, od izolacije genetskega materiala do optimizacije pomnoževanja DNA, cepitve produktov z restrikcijskimi encimi in končni interpretaciji rezultatov.

- Navedite in opišite rezultate projekta ter njihov doprinos k družbeni koristnosti

V okviru projekta smo razvili tri nove genske teste, ki jih podjetje EVG do sedaj ni izvajalo. Na ta način smo pomagali razširiti ponudbo genskih testov, ki so sedaj na voljo vzrediteljem in lastnikom živali in tako posredno izboljšali skrb za zdravje domačih živali. Vzpostavili smo tudi neposreden stik med akademsko in podjetniško sfero in tako omogočili stalen pretok znanja, informacij in kadrov med obema tipoma inštitucij. Poleg konkretnega razvoja novih genskih testov je podjetje dobilo dostop do biološkega materiala na akademskih inštitucijah in možnost dolgoročnega sodelovanja na področju razvoja novih diagnostičnih produktov. S širitvijo svoje ponudbe si podjetje zagotavlja nove stranke in postaja regionalno pomemben dejavnik na področju genske diagnostike, kar je pomembno tudi z nacionalno-gospodarskega vidika.

Genska diagnostika je pomemben dejavnik v zagotavljanju genetskega zdravja populacij domačih živali, pomaga pa tudi pri izboljšanju splošnega zdravja in zdravstvene oskrbe domačih živali. To v družbi doprinaša k večjemu zavedanju in odgovornosti za zdravstveno oskrbo in dobro počutje domačih živali. Za splošno ozaveščanje o pomenu genetskega testiranja psov in mačk so študentje pripravili dve zgibanki, ki lastnikom psov in mačk predstavita pomen in koristnost genetskega testiranja, jih seznanita z načinom odvzema vzorcev in okvirno ceno genetskega testa. Na ta način želimo izboljšati učinkovitost genetskega presejevanja naših populacij psov in mačk in izboljšati njihovo zdravstveno stanje. Hkrati genska diagnostika pri živalih pogosto predstavlja primere dobre prakse, ki jih je moč prenesti tudi v humano medicino. Tudi finančni učinek genske diagnostike na nacionalno gospodarstvo ni zanemarljiv, saj pomeni možnost odpiranja novih delovnih mest in opravljanje storitev v nacionalnem prostoru, namesto v tujini.

Posebne pomena je razvoj genskega testa za PSSM pri pasmi slovenski hladnokrvni konj, ki je izključno odvisna od domače oskrbe in smo zanje v nacionalnem okviru tudi odgovorni. Z odkritjem visoke pojavnosti genetskega defekta, ki povzroča PSSM, se odpira možnost razvoja ustreznih rejskih ukrepov za zmanjšanje tega problema.

#### 4. Priloge:

- Slikovno gradivo: Priložite vsaj dve sliki npr. sliko končnega produkta, sliko študentov pri delu na projektu, sliko s sestankov ipd. Pri pošiljanju slik bodite pozorni, v kolikor

gre za končni produkt, da bo zadoščeno zahtevam glede informiranja in obveščanja (ustrezni logotipi itd.).

## DEVELOPMENT OF A GENETIC TEST FOR THE FELINE AB BLOOD GROUP SYSTEM

Anja Domadenik<sup>1</sup>, Nina Pirih<sup>1</sup>, Jerneja Štor<sup>1</sup>, Blaž Miklavc<sup>1</sup>, Petra Trobina<sup>1</sup>, Damijan Nipič<sup>3</sup>, Minja Zorc<sup>2</sup>, Jernej Ogorevc<sup>2</sup>, Peter Dovč<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Academic Study Programme in Biotechnology, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, Jamnikarjeva ulica 101, SI-1000 Ljubljana, Slovenia

<sup>2</sup>Department of Animal Science, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, Groblje 3, SI-1230 Domžale, Slovenia

<sup>3</sup>EVG, Molekularna Diagnostika, d.o.o., Taborska ulica 8, SI-2000 Maribor, Slovenia



### INTRODUCTION

Feline AB blood group system is primarily defined by two alleles, A and B, which are associated with the presence of N-glycolylneuraminic acid (Neu5Gc) or N-acetylneuraminic acid (Neu5Ac) antigen on the surface of red blood cells [2]. An enzyme, cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydrolase (*CMAH*), plays a crucial role in transformation of Neu5Ac to Neu5Gc [2]. Depending on the enzyme's functionality there are three blood types: A (functional *CMAH*), B (non-functional *CMAH*) and AB (partially functional *CMAH*) [1]. Feline blood typing is very important in order to avoid life-threatening haemolytic transfusion reactions, neonatal isoerythrolysis and for breeding purposes [1,2,3].

The insertion of 18 bp, located 53 bp upstream of exon 1 of *CMAH* gene, has been reported as a presumable cause of different feline blood types. It results in an open reading frame (ORF) shift leading to the lack of enzyme's functionality [1]. In the present study, we developed a test and genotyped the insertion within *CMAH* gene in 28 cats of different breeds.

### AIM

The aim of the present study is to develop a genetic test for feline blood typing based on insertion within *CMAH* gene.

### METHODS

Blood samples of 28 cats of various breeds were obtained; Exotic Shorthair (3), Scottish Fold (3), Persian (4), British Shorthair (1), Maine Coon (7) and Ragdoll (10).

PCR was performed to screen for 18 bp insertion in the *CMAH* gene: depending on the genotype, there were 2 possible lengths of PCR products; 195 bp for allele A (without the insertion) and 213 bp for allele B (18 bp insertion).

PCR product was digested using RE MwoI (R0573, New England Biolabs) to obtain fragments of 112 bp and 101 bp in case of the insertion (213 bp product) or uncut fragment in case of 195 bp allele.

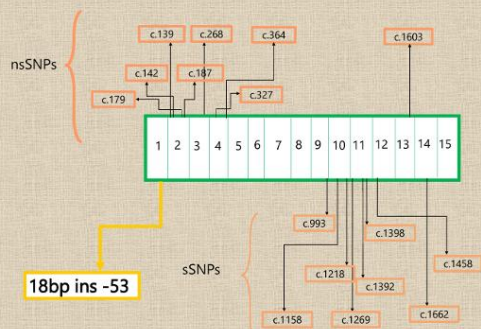


Figure 2: Candidate insertion and cSNPs in mRNA of *CMAH* gene for AB blood type phenotype

### CONCLUSION

Diversity in blood type distribution is important for characterization of cat breeds, especially in control of breeding and selection. Here we provide a step forward in this area, which can also contribute to resolve complications during transfusion and gestation.

<i>CMAH</i>	Functional	Semi-functional	Low or non-functional
BLOOD TYPE	A	AB	B
ANTIGEN	NeuGc	NeuAc, NeuGc	NeuAc
ALLOANTIBODY	Anti-B (low titre)	/	Anti-A (high titre)
GENOTYPE			
	A A	A b	b b

Table 1: Overall scheme of feline AB blood group system

### RESULTS

We identified 17 cats (60.7%) without the insertion, 8 cats (28.6%) with the insertion in one allele and 3 cats (10.7%) with the insertion in both alleles.

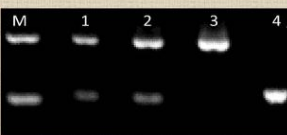


Figure 1: Example of PCR-RFLP fragments on agarose gel for the three different genotypes of *CMAH* locus (M: standard 100 bp marker; 1,2: heterozygote; 3: homozygote for A allele; 4: homozygote for B allele)

FELINE BREED	INSERTIONAL MUTATION	GENOTYPE	PREDICTED BLOOD TYPE	NUMBER OF OBSERVED ANIMALS
Maine coon	+/+	AA	A	5
	+/-	Ab	A	2
Ragdoll	+/+	AA	A	9
	-/-	bb	B	1
Persian	+/+	AA	A	3
	-/-	bb	B	1
Exotic	+/-	Ab	A	2
Shorthair	-/-	bb	B	1
Scottish Fold	+/-	Ab	A	3
British Shorthair	+/-	Ab	A	1
<b>Σ</b>				<b>28</b>

Table 1: Blood types of analysed cats. Insertional mutation: wild type (+/+), heterozygous (+/-), homozygous (-/-). Genotype: The "A" and "Ab" alleles are dominant over "b" allele. Cats with genotypes AA and Ab will be type A, homozygous bb will be type B. The type AB, occurs rarely, its heritability is not understood.

### REFERENCES

- Bighignoli, Barbara, Terri Niimi, Robert A. Grahn, Niels C. Pedersen, Lee V. Millon, Michele Poili, Maria Longeri, and Leslie A. Lyons. 2007. "Cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydrolase (*CMAH*) mutations associated with the domestic cat AB blood group." *BMC Genetics* 8 (1):27. doi: 10.1186/1471-2156-8-27.
- Gandolfi, B., R. A. Grahn, N. A. Gustafson, D. Proverbio, E. Spada, B. Adhikari, J. Cheng, G. Andrews, L. A. Lyons, and C. R. Helps. 2016. "A Novel Variant in *CMAH* Is Associated with Blood Type AB in Ragdoll Cats." *PLoS One* 11 (5):e0154973. doi: 10.1371/journal.pone.0154973.
- Omi, T., S. Nakazawa, C. Udagawa, N. Ieda, R. Echai, Y. H. Cheng, Y. Kato, H. Mitsui, A. Gira, H. Oida, D. Azakami, K. Tamura, T. Sako, T. Inagaki, A. Sakamoto, T. Tsuboi, M. Bonkobara, S. Tsuchida, and S. Ikemoto. 2016. "Molecular Characterization of the Cytidine Monophosphate-N-Acetylneuraminic Acid Hydrolase (*CMAH*) Gene Associated with the Feline AB Blood Group System." *PLoS One* 11 (10):e0165000. doi: 10.1371/journal.pone.0165000.

### ACKNOWLEDGEMENT

Nalozbo/projekt sofinancira Republika Slovenija in Evropska unija iz Evropskega socialnega sklada.



# IS *GYS1* GENE MUTATION CAUSATIVE FOR POLYSACCHARIDE STORAGE MYOPATHY (PSSM) IN SLOVENIAN COLD-BLOODED HORSE BREED?

Anja Domadenik<sup>1</sup>, Nina Pirih<sup>1</sup>, Jerneja Štor<sup>1</sup>, Blaž Miklavc<sup>1</sup>, Petra Trobina<sup>1</sup>, Minja Zorc<sup>2</sup>, Jernej Ogorevc<sup>2</sup>, Modest Vengušt<sup>3</sup>, Peter Dovč<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Academic Study Programme in Biotechnology, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, Jamnikarjeva ulica 101, SI-1000 Ljubljana, Slovenia

<sup>2</sup>Department of Animal Science, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, Groblje 3, SI-1230 Domžale, Slovenia

<sup>3</sup>Veterinary Faculty, University of Ljubljana, Gerbičeva ulica 60, SI-1000 Ljubljana, Slovenia



## INTRODUCTION

Polysaccharide storage myopathy (PSSM) is a glycogen storage disorder that occurs in several horse breeds [1,2,3]. The most common clinical signs related to PSSM in quarter horses include firm painful muscles, stiffness, weakness, sweating and reluctance to move [2,3]. A nonsynonymous mutation causing single nucleotide polymorphism (SNP) (chr10:18940324 (G>A), EquCab2.0) that changes arginine (CGT) to histidine (CAT) was identified within a highly conserved region of the skeletal muscle glycogen synthase gene (*GYS1*) and associated with PSSM in several horse breeds [2]. The gain-of-function mutation results in abnormal glycogen accumulation in skeletal muscles and muscle damage with exertion [1]. In the present study, we genotyped a SNP within *GYS1* gene in a symptomatic Slovenian cold-blooded horse, using PCR-RFLP method.

## AIM

The aim of our study was the development of the genetic test based on PCR-RFLP analysis that verifies the presence of the dominant PSSM mutation in *GYS1* gene in Slovenian cold-blooded horse breed.



Figure 1: Slovenian cold-blooded horse (<http://konji.com>)

## MATERIAL AND METHODS

- Blood sample of one PSSM symptomatic horse from Slovenian cold-blooded horse breed was obtained. DNA isolation was performed using classical organic extraction method.
- PCR was performed to screen for SNP (chr10:18940324 (G>A), EquCab2.0) that changes arginine (CGT) to histidine (CAT) in the *GYS1* gene, predicted amplicon length was 229 bp.
- PCR product was digested using RE *HpyCHAV* (R0620, New England Biolabs) to obtain fragments of 97, 78 and 54 bp in case of homozygous PSSM genotype or 151 and 78 bp in case of recessive wt genotype.

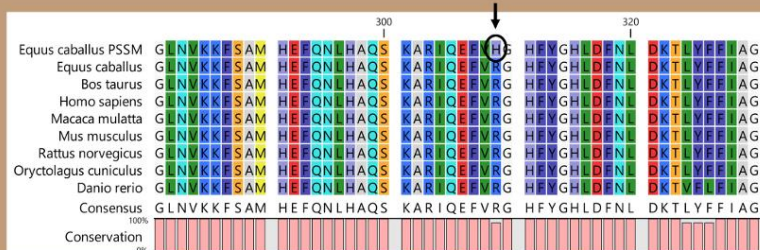


Figure 2: Sequence alignment of PSSM causing gene *GYS1* adjacent to target SNP (chr10:18940324 (G>A))

## RESULTS AND DISCUSSION

With PCR-RFLP analysis, we genotyped a symptomatic Slovenian cold-blooded horse and identified the mutation in a homozygous form within the *GYS1* gene.

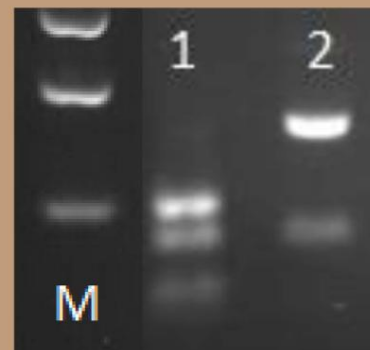


Figure 3: Example of PCR-RFLP fragments on agarose gel for two different genotypes of *GYS1* locus (M: standard 100 bp marker; 1: PSSM homozygote, 2: wild type homozygote)

## CONCLUSION

We have successfully genotyped a Slovenian cold-blooded horse for a target SNP in *GYS1* gene and therefore confirmed the occurrence of PSSM in this breed for the first time. More information on the distribution of *GYS1* mutation in this breed is needed for selective breeding against the defect and appropriate management of the affected animals.

## REFERENCES

1. Mickelson, J. R. & Valberg, S. J. The genetics of skeletal muscle disorders in horses. *Annu Rev Anim Biosci* 3, 197-217, doi:10.1146/annurev-animal.022114-110653 (2015).
2. McCue, M. E. et al. Glycogen synthase (*GYS1*) mutation causes a novel skeletal muscle glycogenosis. *Genomics* 91, 458-466, doi:10.1016/j.ygeno.2008.01.011 (2008).
3. McCue, M. E., Valberg, S. J., Lucio, M. & Mickelson, J. R. Glycogen synthase 1 (*GYS1*) mutation in diverse breeds with polysaccharide storage myopathy. *J Vet Intern Med* 22, 1228-1233, doi:10.1111/j.1939-1676.2008.0167.x (2008).

## ACKNOWLEDGEMENT

Naložbo/projekt financira Republika Slovenija in Evropska unija iz Evropskega socialnega sklada.



## Povzetek projekta Po kreativni poti do znanja 2016/2017 za namen objave in predstavitve na spletni strani sklada

### 1. Polni naslov projekta: Publikacija o preventivni veterini in spremljanju zdravstvenega stanja populacije psov in mačk za lastnike

- V katero področje na prvi klasifikacijski ravni KLASIUS-P se uvršča projekt glede na vsebinsko zasnovu (neustrezno področje izbrišite):

### 6 - Kmetijstvo, gozdarstvo, ribištvo, veterinarstvo

2. V sodelovanju z: (navede se univerza oz. samostojni visokošolski zavod, ki je prijavil projekt in članica, ki je nosilka projekta ter partnerja – podjetja, ki je/sta vključena v projekt)

### Veterinarska fakulteta Univerze v Ljubljani - nosilec projekta

Veterinarstvo Trstenjak-Zajc d.o.o., Ulica padlih borcev 23, 1000 Ljubljana – partner 1

### 3. Besedilo:

- Opredelite problem, ki se je razreševal tekom izvajanja projekta

Preventivno skrb za zdravje psov in mačk izvajajo lastniki živali s pomočjo veterinarjev. Prenos kvalitetnih informacij je žal pomanjkljiv, saj so veterinarji časovno omejeni, med enim obiskom celotnega obsežnega področja preventivnih ukrepov ni mogoče obrazložiti, hkrati pa se dane ustne informacije hitro pozabijo oziroma niso razumljene pravilno. Lastniki zato sami iščejo informacije (npr. na internetu) in pogosto naletijo na nestrokovne in potencialno škodljive nasvete, zaradi česar je oskrba njihovih živali pomanjkljiva ali celo slaba.

- Opišite potek reševanja problema oz. kratek povzetek projekta

Študentke veterine so tekom projekta napisale poglavja iz določenega področja preventivne veterinarske medicine. Naučile so se različnih tipov citiranja literature in naredile pregled stanja boleznih in drugih navedenih problematik v Sloveniji s pomočjo veterinarskih inštitutov in laboratorijev. Prisostvovala so pri kliničnem delu pedagoških in delovne mentorice in pri tem spoznale preventivne programe, ki se rutinsko izvajajo v Sloveniji in osnove komunikacije s strankami.

Študent elektrotehnike in pedagoški mentor 2 sta sledilnik aktivnosti priredila za uporabo na psih ter napravo s pomočjo študentk Veterinarstva tudi preizkusila na skupini zdravih psov.

Študenti so ob strokovnih popravkih pedagoških mentorjev in delovne mentorice pripravili poglavja publikacije, ki jih je študentka grafične in medijske tehnike ustrezno oblikovala za tisk in internetno objavo.

- Navedite in opišite rezultate projekta ter njihov doprinos k družbeni koristnosti

Tekom interdisciplinarnega projekta smo želeli lastnike psov in mačk opremiti z ustreznimi smernicami v preventivni veterinarski medicini malih živali. V ta namen smo pripravili obsežno, oblikovno dodelano publikacijo (priročnik), ki je v e-obliki preko domače strani Veterinarske fakultete in Partnerja 1 na voljo vsej zainteresirani javnosti (veterinarjem, lastnikom malih živali in študentom). Veterinarji bodo lahko namesto zamudnega podajanja vedno istih informacij stranko/lastnika napotili v branje publikacije, sami pa sproščeni čas namenili drugim dejavnostim, hkrati pa bodo lahko tudi sami osvežili svoje znanje na hitro razvijajočem se področju veterinarske preventivne medicine.

Knjižica je na voljo za ogled na povezavi:

<https://www.kkmz.si/sl/blog/10-novice/346-novoleto-darilo-zdrav-kot-pes-in-macka>

Po koncu projekta smo poskrbeli še za sponzorja za lektoriranje (Veterinarska fakulteta) in sponzorja za tisk (Krka, tovarna zdravil, d.d. Novo mesto), da bo priročnik tudi v tiskani obliki na voljo za uporabo pri veterinarjih.

### 4. Priloge:

- Slikovno gradivo: Priložite vsaj dve sliki npr. sliko končnega produkta, sliko študentov pri delu na projektu, sliko s sestankov ipd. Pri pošiljanju slik bodite pozorni, v kolikor gre za končni produkt, da bo zadoščeno zahtevam glede informiranja in obveščanja (ustrezni logotipi itd.).

Uredili: doc. dr. Tanja Plavec in doc. dr. Darja Pavlin

# Zdrav kot ~~riba~~ pes in mačka



Informativni priročnik za lastnike živali  
in študijsko gradivo za študente veterinarstva



Projekt sofinancirata Republika Slovenija in Evropska unija iz Evropskega socialnega sklada.  
Prvo naklado je omogočila Krka, tovarna zdravil, d. d., Novo mesto.

Slika naslovnice priročnika (zgoraj) in slike z enega zadnjih sestankov ter ob tiskanju prve verzije priročnika (spodaj):

