

## ANALIZA FREKWENCJI MUTACJI ARG309HIS W GENIE *GYS1* W POPULACJI KONI ZIMNOKRWISTYCH I HUCULSKICH

Monika Komorowska<sup>1</sup>, Jakub Zipper<sup>2</sup>, Adrianna Musiał<sup>3</sup>, Bogusława Długosz<sup>4</sup>,  
Katarzyna Olczak<sup>5</sup>, Aleksandra Błaszczak<sup>4</sup>, Monika Stefaniuk-Szmukier<sup>6</sup>,  
Katarzyna Ropka-Molik<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, Wydział Biologii i Biotechnologii, ul. M. Oczapowskiego 1A, 10-719 Olsztyn

<sup>2</sup>Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja, Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt, Al. Mickiewicza 21, 31-120 Kraków

<sup>3,6,7</sup>Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy, Zakład Biologii Molekularnej, 32-083 Balice k. Krakowa

<sup>4</sup>Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja, Katedra Rozrodu, Anatomii i Genomiki Zwierząt, Al. Mickiewicza 21, 31-120 Kraków

<sup>5</sup>Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy, Zakład Hodowli Koni, 32-083 Balice k. Krakowa

Badania sfinansowane z działalności statutowej Państwowego Instytutu Badawczego Zootechniki, (nr 01-18-08-11).

### Abstrakt

*Występowanie chorób o podłożu genetycznym stanowi istotny problem hodowlany pociągający za sobą straty ekonomiczne związane z kosztami krycia i utrzymania żrebnej klaczy, leczenia i upadkami obciążonego nimi potomstwa. Miopatia ze spichrzaniem polisacharydów jest chorobą o podłożu genetycznym dziedziczną w sposób autosomalny dominujący, której przyczyną jest mutacja w genie *GYS1*. Celem pracy było oszacowanie częstości występowania mutacji Arg309His w genie *GYS1* dla populacji koni zimnokrwistych i huculskich. Materiał badawczy stanowiły cebulki włosów pobrane od 99 koni huculskich oraz 121 koni zimnokrwistych. Genotypowanie przeprowadzono metodą PCR-RFLP oraz sekwencjonowaniem Sangera. Wyniki wykazały obecność mutacji u koni zimnokrwistych, jak i huculskich zarówno w układzie heterozygotycznym, jak i homozygotycznym pod względem niekorzystnego allelu.*

*Słowa kluczowe: koń, PCR-RFLP, PSSM1, polysaccharide storage myopathy, przewlekły mięśniochwat porażenny, miopatia ze spichrzaniem polisacharydów*

### Wstęp

Postęp cywilizacyjny związany był z domestykacją zwierząt i wykorzystywaniem ich do różnych celów. Użytkowanie koniowatych zwiększyło mobilność oraz usprawniło działania wojenne, a dodatkowo pozyskane surowce były źródłem pożywienia dla ówczesnej ludności. Ostatnie doniesienia wskazują, że współczesne konie wywodzą się z populacji pochodzącej z regionu dolnej Wołgi i Donu, rozprzestrzenionej w Eurazji około 2000 lat przed naszą erą wraz z ekspansją kultury Sintashta (Librado i in., 2021). Udomowienie koni rozpoczęło również precyzyjną ukierunkowaną selekcję, w celu utworzenia różnych wyspecjalizowanych i różnorodnych fenotypowo populacji koni, dostosowanych do określonego typu użytkowania. Praktyki hodowlane związane z użyciem nielicznej grupy ogierów znacząco zmniejszyły różnorodność

genetyczną koni. Począwszy od XVII wieku stosowane praktyki selekcyjne spowodowały wzrost odsetka mutacji determinujących występowanie chorób genetycznych do około 4% w skali genomu (Orlando i Librado, 2019). Rozwój technologii sekwencjonowania następnej generacji umożliwił poszukiwanie dokładnych lokalizacji w genomie związanych z chorobami dziedzicznymi istotnymi z punktu widzenia hodowli (Finno i in., 2009; Wade i in., 2009). Należy do nich m. in. miopatia ze spichrzaniem polisacharydów (PSSM – ang. *polysaccharide storage myopathy*), po raz pierwszy opisana w 1992 roku przez dr Stephanie Valberg (Valberg i in., 1992). Obserwowana przy tym zespole chorobowym rabdomioliza wysiłkowa obejmuje szereg objawów związanych z uszkodzeniem mięśni poprzecznie prążkowanych, na co wpływają zaburzenia metabolizmu i gromadzenia glikogenu. Pierwszy opis PSSM w podgrupie zwierząt dotkniętych rabdomiolizą wysiłkową dotyczył koni pociagowych. Objawy choroby rozwinęły się u nich po powrocie do pracy, co poprzedzało kilka dni odpoczynku (McCue i in., 2008b). Dlatego też PSSM określano mianem choroby poniedziałkowej czy też świątecznej, ponieważ objawy pojawiały się po dłuższym okresie odpoczynku, w czasie którego stosowano dietę bogatą w zboża (Valberg i in., 2011).

PSSM typu I dziedziczy się w sposób autosomalny dominujący. Choroba ta spowodowana jest mutacją c.926G>A (Arg309His), w eksonie 6 genu *GYS1* i polega na zamianie argininy (CGT) na histydynę (CAT). Gen *GYS1* koduje syntazę glikogenu, umożliwiającą syntezę glikogenu z cząsteczek glukozy. Mutacja ta przyczynia się do magazynowania glikogenu odpornego na amylazę w mięśniach poprzecznie prążkowanych. Jego struktura charakteryzuje się znacznie mniejszym rozgałęzieniem niż prawidłowo zbudowana cząsteczka i przez to staje się on niedostępny dla organizmu (McCue i in., 2008b). PSSM najsilniej dotyka mięśni okolic pośladkowych, brzucha, pleców oraz kończyn przednich (Valberg i in., 2011). Wyróżnia się również II typ PSSM, który nie jest związany z mutacją genu *GYS1*, jednak jego genetyczne uwarunkowanie nie zostało dotychczas poznane (Valberg i in., 2021; Valberg i in., 2023).

Objawy miopatii ze spichrzaniem polisacharydów charakteryzują się: sztywnością mięśni, skurczami, nadmiernym poceniem się, zwiększeniem częstotliwości oddechów oraz trudnościami w poruszaniu się. Zdiagnozowano także podwyższoną aktywność kinazy keratynowej w surowicy oraz przy dużym wysiłku także mioglobiniurię (Parzyszek i Gruszczyńska, 2018). Stwierdzono również przypadki PSSM zachodzące bezobjawowo. Większość cech choroby ujawnia się u osobników w wieku około 6 lat. Zazwyczaj napad następuje po ok. 20 min po wysiłku (Valberg i in., 2011).

Diagnostyka choroby opiera się na przeprowadzeniu oceny molekularnej pod kątem mutacji w genie *GYS1* oraz na podstawie biopsji mięśni i prowadzonych na nich badań histologicznych, które umożliwiają wykrycie obecności glikogenu odpornego na amylazę wewnątrz włókien mięśni szkieletowych. Niemniej jednak badania molekularne są mniej inwazyjne, nie wymagają bioptatów i w sposób jednoznaczny wskazują na możliwy przebieg mięśniochwatu związany z układem alleli (Naylor i in., 2012; McCue i in., 2008b). Mimo że PSSM należy do chorób dziedziczonych w sposób autosomalny dominujący, na wystąpienie objawów chorobowych duży wpływ mają czynniki zewnętrzne, takie jak odpowiednia dieta czy ćwiczenia (Valberg, 2018).

Do tej pory brakuje danych literaturowych dotyczących częstości występowania mutacji genu *GYS1* u koni huculskich. Natomiast dane dotyczące częstości występowania mutacji u koni zimnokrwistych umożliwią poszerzenie wiedzy na temat PSSM1. Dlatego celem prezentowanych badań jest oszacowanie frekwencji zmutowanego allelu genu *GYS1* w populacji koni zimnokrwistych i huculskich.

## **Material i metody**

### **Material doświadczalny i izolacja DNA**

Material do badań pochodził od cebulek włosowych koni, które zebrane zostały w banku materiału biologicznego Instytutu Zootechniki w Zakładzie Biologii Molekularnej Zwierząt w Balicach. Material pozyskano od koni rasy huculskiej pochodzących z 4 stadnin oraz rasy polski koń zimnokrwisty (pkz) ze stadniny państwowej jak i od hodowców prywatnych z rejonu Podkarpacia i Małopolski. Izolację DNA przeprowadzono z cebulek włosowych, od 99 koni huculskich oraz 121 polskich koni zimnokrwistych, przy użyciu komercyjnego zestawu do ekstrakcji DNA Sherlock AX (A&ABiotechnology). Próbki DNA przechowywano w temperaturze + 4°C do czasu przeprowadzenia bieżących analiz.

### **Genotypowanie mutacji w genie GYS1**

Wyizolowane DNA wykorzystano do genotypowania mutacji rs1150416011 przy użyciu metody PCR-RFLP (ang. *polymerase chain reaction – restriction fragments length polymorphism*). Startery dla badanego fragmentu genu *GYS1* (F: 5' AGTGAAACATGGGACCTTCTCC, R: 5' CTAAACGGGGATCTCCTGCA) zostały dobrane przy użyciu ogólnodostępnego programu Primer3Plus (3.3.0) (Untergasser i in., 2012).

Procedurę PCR przeprowadzono zgodnie z protokołem przy pomocy AmpliTaq Gold™ 360 Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Zastosowano temperaturę annealingu 57°C.

Endonukleazę dobrano przy użyciu programu NebCutter. W amplifikowanym fragmencie HpyCH4V rozpoznaje fragment TGCA i powoduje przecięcie sekwencji, co prowadzi do uzyskania dwóch wzorów prążkowych: G – 202 i 80 pz oraz A – 148, 80, 54, i 19 pz. Przeprowadzono trawienie przez 8 h w temperaturze 37°C. Następnie strawione przy użyciu endonukleazy uzyskane fragmenty materiału genetycznego rozdzielono elektroforetycznie w 5% żelu agarozowym (Bioshop Canada Ltd.).

W celu potwierdzenia występowania mutacji c.926G>A amplikony pochodzące od 72 losowo wybranych osobników zostały poddane sekwencjonowaniu Sangera przy użyciu BigDye™ Terminator v3.1 Cycle (Thermo Fisher Scientific) i sekwenatora kapilarnego 3500XL (Applied Biosystems, Foster, CA, USA; Thermo Fisher Scientific). Następnie obliczono procentowy udział występowania poszczególnych alleli genu *GYS1* dla analizowanej populacji koni przy użyciu programu Excel (Microsoft Office).

## **Wyniki**

Sekwencjonowanie Sangera przeprowadzone dla 72 losowo wybranych osobników potwierdziło obecność mutacji c.926G>A. Genotypowano łącznie 220 osobników koni huculskich i koni zimnokrwistych. Wyniki badań wykazały obecność zmutowanego allelu A w obu analizowanych populacjach koni. Frekwencja występowania koni homozygotycznych AA w obu populacjach wynosi 0,07, homozygot GG 0,56, natomiast heterozygot AG 0,37. Liczba heterozygot stanowi 36,82% obu populacji, homozygot AA 6,82%, a homozygot GG 56,36% (tab. 1). Frekwencja występowania allelu A wynosi 0,25, natomiast allelu G 0,75 (tab. 2).

Dla koni huculskich (n=99) wykazano 36 heterozygot, co stanowi 36,36% wszystkich koni tej rasy, 55 osobników o genotypie GG, co stanowi 56,56% badanej populacji oraz 8 osobników posiadających genotyp AA, co stanowi odpowiednio 8,08% badanej populacji (tab. 1). Natomiast frekwencja występowania homozygot AA wynosi 0,08, homozygot recesywnych 0,57, a heterozygot 0,36. Frekwencja allelu A wynosi 0,26, natomiast allelu G równa jest 0,74 (tab. 2).

Przeprowadzone analizy wykazały również obecność zmutowanego allelu A w populacji koni zimnokrwistych ( $n=121$ ). Liczba zidentyfikowanych heterozygot wynosiła 45, co stanowiło 37,2% wszystkich badanych koni tej rasy. Co ciekawe, 5,8% koni posiadało genotyp AA wykazujący obecność obu alleli związanych z PSSM1. W populacji koni zimnokrwistych wystąpiło 69 osobników o genotypie GG, co stanowi 57% badanej populacji (tab. 1). W sumie frekwencja allelu A wyniosła 0,24, natomiast allelu G 0,76 (tab. 2). Wyniki badań potwierdziły zgodność uzyskanych danych z równowagą Hardy'ego-Weinberga zarówno dla populacji koni huculskich ( $0,07+0,38+0,55=1$ ), zimnokrwistych ( $0,06+ 0,36+ 0,58=1$ ), jak i łącznie obu analizowanych populacji ( $0,06+0,38+0,56=1$ ) (tab. 2).

Tabela 1. Frekwencje genotypów w badanych populacji koni huculskich i zimnokrwistych  
Table 1. Genotype frequencies in the studied populations of Hucul and cold-blooded horses

Genotyp Genotype	Konie huculskie Hucul horses		Konie zimnokrwiste Cold-blooded horses		Łącznie konie huculskie i zimnokrwiste Total Hucul and cold-blooded horses	
	n	%	n	%	n	%
homozygoty dominujące dominant homozygotes	8	8,08	7	5,8	15	6,82
heterozygoty heterozygotes	36	36,36	45	37,2	81	36,82
homozygoty recesywne recessive homozygotes	55	56,56	69	57	124	56,36

Tabela 2. Frekwencje genów w badanych populacji koni huculskich i zimnokrwistych  
Table 2. Gene frequencies in the studied populations of Hucul and cold-blooded horses

Gen Gene	Konie huculskie Hucul horses	Konie zimnokrwiste Cold-blooded horses	Łącznie konie huculskie i zimnokrwiste Total Hucul and cold-blooded horses
Frekwencja allelu A Allele A frequency	0,26	0,24	0,25
Frekwencja allelu G Allele G frequency	0,74	0,76	0,75
Równowaga Hardy'ego- Weinberga Hardy- Weinberg equilibrium	$0,07+0,38+0,55=1$	$0,06+ 0,36+ 0,58=1$	$0,06+0,38+0,56=1$

## Omówienie wyników

Miopatia ze spichrzaniem polisacharydów należy do chorób dziedzicznych w sposób autosomalny dominujący, zaś jej główną przyczyną jest występowanie mutacji Arg309His w genie *GYS1*. Celem prezentowanej pracy było określenie częstotliwości występowania mutacji w populacji polskich koni zimnokrwistych i huculskich. Poznanie częstości występowania mutacji dla tych populacji jest cenną informacją dla hodowców w zakresie monitorowania zdrowia i użyteczności koni.

Mutacja w genie *GYS1* odpowiadająca za wystąpienie PSSM1 została jak dotąd opisana u 30 ras koni i charakteryzowała się różną częstotliwością występowania. Dla populacji koni belgijskich, należących do grupy koni zimnokrwistych, frekwencja występowania allelu A wynosiła 0,242 dla 149 przebadanych osobników (McCue i in., 2010). Wysoką frekwencję zmutowanego allelu A genu *GYS1* wynoszącą 0,346 stwierdzono również u północnoamerykańskich zimnokrwistych koni perszeron (McCue i in., 2010). Frekwencja występowania allelu A dla zimnokrwistych koni belgijskich jest wartością odpowiadającą wynikom uzyskanym w badaniach własnych, gdzie frekwencja występowania allelu A dla

koni zimnokrwistych wynosi 0,24. Natomiast frekwencja zmutowanego allelu A koni perszeron jest wyższa w porównaniu do frekwencji uzyskanej dla koni zimnokrwistych przedstawionych w prezentowanej pracy i wynoszącej 0,24.

Frekwencja występowania zmutowanego allelu A genu *GYS1* oraz homozygotyczność pod względem tej mutacji jest powszechna u północnoamerykańskich koni pociągowych oraz niemieckich koni zimnokrwistych, co jest zbieżne z wynikami uzyskanymi w prezentowanej pracy, które wskazują na występowanie frekwencji wynoszącej 0,24 zmutowanego allelu u polskich koni zimnokrwistych. Mutacji *GYS1* nie stwierdzono natomiast u koni pełnej krwi angielskiej, kuców walijskich oraz u norweskich fiordów (McCue i in., 2010).

W innej pracy stwierdzono obecność 11% osobników homozygotycznych pod względem mutacji *GYS1* dotkniętych PSSM u koni rasy perszeron oraz koni belgijskich (McCue i in., 2008a). Zaobserwowano również udział europejskich koni w typie pociągowym posiadających mutację w genie *GYS1*, który wynosił 62% dla 403 zgenotypowanych koni (Baird i in., 2010). W prezentowanej pracy dla badanej populacji koni huculskich (n=99) stwierdzono obecność: 36,36% heterozygot oraz 8,08% homozygot dominujących, natomiast dla koni zimnokrwistych (n=121): 37,2% heterozygot oraz 5,8% homozygot dominujących.

Szacuje się, że mutacja allelu genu *GYS1* Arg309His powstała około 1200–1500 lat temu. Sugeruje to, że dawniej była ona preferowana podczas doboru naturalnego oraz korzystna dla zwierząt odżywiających się nieregularnie i żyjących w trudnych warunkach (McCue i in., 2008b). Uważa się, że stare rasy pociągowe posiadają wysoki odsetek mutacji w genie *GYS1*. Może to wynikać z selekcji prowadzonej przez hodowców po drugiej wojnie światowej. Mutacja ta była korzystna u osobników ciężko pracujących i spożywających pokarmy ubogie w cukry. Dlatego też w wyniku tzw. zjawiska wąskiego gardła mutacja *GYS1* występuje z wysoką frekwencją u tych koni (McCue i in., 2008a).

W prezentowanej pracy po raz pierwszy podjęto się analizy mutacji genu *GYS1* u koni huculskich. Częstość występowania zmutowanego allelu A u koni tej rasy wynosi 26%, co stanowi wyższą wartość w porównaniu do polskich koni zimnokrwistych, którą oszacowano na 24%. Konie huculskie wywodzą się z Huculszczyzny i są potomkami wielu ras koni, m.in. tatarskich czy tureckich. Bytowały one w surowych mroźnych warunkach ubogich w pożywienie. Wraz ze zwiększeniem zainteresowania tą rasą w połowie XIX wieku pojawiła się ich ukierunkowana hodowla (Bordzoł i Jackowski, 2008). Zwierzęta miały stały dostęp do pożywienia oraz żyły w stabilnych warunkach. Prawdopodobnie mogła wówczas nastąpić niekorzystna zmiana sprzyjająca wystąpieniu objawów chorobowych PSSM, które dawniej pomagały im przodkom przetrwać. Stwierdzono, że stosowanie diety wysokotłuszczowej o niskiej zawartości skrobi u koni heterozygotycznych pod względem mutacji genu *GYS1* przyczynia się do zwiększenia tolerancji koni na wysiłek fizyczny i zmniejszenie objawów chorobowych PSSM (Ribeiro i in., 2004). W porównaniu do polskich koni zimnokrwistych, u których występuje 37,2% nosicieli mutacji, u koni huculskich ich frekwencja wynosi 36,36%. Są to zbliżone wartości, które mogą wskazywać na podobieństwo w występowaniu u tych ras liczby osobników heterozygotycznych.

Inne badania wykazały obecność 22,8% heterozygot oraz 1,2% homozygot dominujących na 167 genotypowanych koni rasy quarter horse (McCue i in., 2008a). Uważa się, że ok 6–12% koni rasy quarter horse żyjących w Stanach Zjednoczonych jest dotkniętych zespołem PSSM (McCue i Valberg, 2007). Prowadzono również badania na koniach rasy norman cob, które były potomkami 10 ogierów założycieli i nie przekroczyły siódmego pokolenia. Stwierdzono, że na 52 badanych osobników wystąpiło 19 koni dotkniętych PSSM. Autorzy wskazują na prawdopodobieństwo wystąpienia mutacji *GYS1* u ogierów założycieli, którzy przekazali ją potomstwu (Herszberg i in., 2009). Ukierunkowana i niezwykle intensywna hodowla zarówno koni quarter horse, jak i norman cob sprzyjała wystąpieniu choroby. Może być to zjawisko podobne do tego, które zaszło u koni huculskich. Intensywnie prowadzona hodowla

mogła przyczynić się do powielenia niepożądanego mutacji wywołującej PSSM1. Ponadto w badaniach przedstawionych w pracy McCoy i in. (2014) z zastosowaniem analizy rozszerzonej homozygotyczności haplotypów (ang. *Extended Haplotype Homozygosity*, EHH) wykazano, że allel G typu dzikiego posiada otaczające go haplotypy o większej różnorodności niż allel A posiadający znacznie wydłużony haplotyp podstawowy. Rdzenie haplotypów o wysokiej wartości EHH i wysokiej częstości w populacji wskazują mutacje, których częstość w populacjach wzrasta szybciej pod wpływem selekcji. Oznacza to, że zmiany w haplotypach nie wynikają wyłącznie z procesów demograficznych, lecz wpływ na nie ma również sposób prowadzenia selekcji w hodowlach koni belgijskich i quarter horse (McCoy i in., 2014).

Na podstawie badań prowadzonych na koniach quarter horse wykazano, że nasilenie objawów PSSM ma również wpływ mutacja w obrębie receptora ryanodyny *RYR1* Arg2454 w eksonie 46. Zaś obecność w genomie mutacji zarówno w genie *GYS1*, jak i *RYR1* przyczynia się do wystąpienia cięższych objawów klinicznych PSSM (McCue i in., 2009). Inne badania wykazały, że wpływ na częstość występowania mutacji *GYS1* mają również takie czynniki jak strategie kojarzenia koni, czy chów wsobny, polegający na dopuszczaniu do rozrodu osobników spokrewnionych. Natomiast na podstawie badań przeprowadzonych na koniach austriackich stwierdzono, że największy procent osobników posiadających dwa warianty mutacji w genie *GYS1* występował u koni maści kasztanowej, który stanowił 54% u klaczy i 62% u ogierów (Druml i in., 2017). Przytoczone badania wskazują na występowanie wielu czynników determinujących mutację genu *GYS1* oraz wystąpienie objawów chorobowych PSSM. Dlatego też należy brać pod uwagę wiele czynników mogących mieć wpływ na wystąpienie wysokiej frekwencji zmutowanego genu *GYS1* w przedstawionych populacjach koni zimnokrwistych i huculskich.

Co ciekawe, badania wykazały, że występują istotne różnice w nasileniu objawów PSSM pomiędzy heterozygotami i homozygotami pod względem mutacji genu *GYS1*. Stwierdzono, że u homozygot dominujących występuje wyższy stopień podskórnej wakuolizacji i wyższa zawartość polisacharydów odpornych na amylazę w mięśniach szkieletowych, w porównaniu z osobnikami heterozygotycznymi. Wskazuje to na istotność prowadzenia badań genetycznych chorych osobników w celu dobrania odpowiedniej terapii (Naylor i in., 2012).

Wyniki uzyskane w prezentowanej pracy wskazują na wysoki odsetek osobników posiadających zmutowany allel genu *GYS1* zarówno u polskich koni zimnokrwistych, jak i huculskich. Przytoczone prace sygnalizują znaczący wpływ intensywnie prowadzonej hodowli, chowu wsobnego na wystąpienie mutacji genu *GYS1* oraz sposobu odżywiania, jak i czynników środowiskowych na stopień występowania objawów chorobowych PSSM u koni. Badania genetyczne są bardzo ważnym elementem umożliwiającym podjęcie odpowiedniej terapii i umożliwiającą monitorowanie zmian zachodzących w obrębie ras.

### Piśmiennictwo

- Baird J.D., Valberg S.J., Anderson S.M., McCue M.E., Mickelson J.R. (2010). Presence of the glycogen synthase 1 (*GYS1*) mutation causing type 1 polysaccharide storage myopathy in continental European draught horse breeds. *Vet Rec.*, 167 (20): 781–784.
- Bordzoł A., Jackowski M. (2008). Struktura genealogiczna populacji koni huculskich w Bieszczadzkiem Parku Narodowym. *Roczniki Bieszcz.*, 16: 389–408.
- Druml T., Grilz-Seger G., Neuditschko M., Brem G. (2017). Association between population structure and allele frequencies of the glycogen synthase 1 mutation in the Austrian Noriker draft horse. *Anim. Genet.*, 48 (1): 108–112.

- Finno C.J., Spier S.J., Valberg S.J. (2009). Equine diseases caused by known genetic mutations. *Vet J.*, 179 (3): 336–347.
- Herszberg B., McCue M.E., Larcher T., Mata X., Vaiman A., Chaffaux S., Cherel Y., Valberg S.J., Mickelson J.R., Guerin G. (2009). A *GYS1* gene mutation is highly associated with polysaccharide storage myopathy in Cob Normand draught horses. *Anim. Genet.*, 40 (1): 94–96.
- Librado P., Khan N., Fages A., Kusliy M.A., Suchan T., et al. (2021). The origins and spread of domestic horses from the Western Eurasian steppes. *Nature*, 598 (7882): 634–640.
- McCoy A.M., Schaefer R., Petersen J.L., Morrell P.L., Slamka M.A., Mickelson J.R., Valberg S.J., McCue M.E. (2014). Evidence of positive selection for a glycogen synthase (*GYS1*) mutation in domestic horse populations. *J. Hered.*, 105 (2): 163–172.
- McCue M.E., Valberg S.J. (2007). Estimated prevalence of polysaccharide storage myopathy among overtly healthy Quarter Horses in the United States. *J Am Vet Med Assoc.*, 1;231 (5): 746–750.
- McCue M.E., Valberg S.J., Lucio M., Mickelson J.R. (2008a). Glycogen synthase 1 (*GYS1*) mutation in diverse breeds with polysaccharide storage myopathy. *J. Vet. Intern. Med.*, 22 (5): 1228–1233.
- McCue M.E., Valberg S.J., Miller M.B., Wade C., DiMauro S., Akman H.O., Mickelson J.R. (2008b). Glycogen synthase (*GYS1*) mutation causes a novel skeletal muscle glycogenesis. *Genomics*. 91 (5): 458–466.
- McCue M.E. Valberg S.J., Jackson M., Borgia L., Lucio M., Mickelson J.R. (2009). Polysaccharide storage myopathy phenotype in quarter horse-related breeds is modified by the presence of an *RYR1* mutation.. *NMD.*, 19 (1): 37–43.
- McCue M.E., Anderson S.M., Valberg S.J., Piercy R.J., Barakzai S.Z., Binns M.M., Distl O., Penedo M.C., Wagner M.L., Mickelson J.R. (2010). Estimated prevalence of the Type 1 Polysaccharide Storage Myopathy mutation in selected North American and European breeds. *Anim Genet.*, 41, Suppl 2: 145–149.
- Naylor R.J., Livesey L., Schumacher J., Henke N., Massey C., Brock K.V., Fernandez-Fuente M., Piercy R.J. (2012). Allele copy number and underlying pathology are associated with subclinical severity in equine type 1 polysaccharide storage myopathy (PSSM1). *PloS One*, 7 (7), e42317.
- Orlando L., Librado P. (2019). Origin and evolution of deleterious mutations in horses. *Genes (Basel)*, 28;10 (9): 649.
- Parzyszek P., Gruszczyńska J. (2018). Miopatia ze spichrzaniem polisacharydów (PSSM) u konia domowego, *Rocz. Nauk. PTZ*, 4:10–14.
- Ribeiro W.P., Valberg S.J., Pagan J.D., Essen Gustavsson B. (2004). The effect of varying dietary starch and fat content on serum creatine kinase activity and substrate availability in equine polysaccharide storage myopathy. *J. Vet. Intern. Med.*, 18: 887–894.
- Untergasser A., Cutcutache I., Koressaar T., Ye J., Faircloth B.C., Remm M., Rozen S.G. (2012). Primer3 – new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.*, 40 (15): e115.
- Valberg S.J. (2018). Muscle conditions affecting sport horses. *Vet. Clin. North Am*: 34 (2): 253–276.
- Valberg S.J., Cardinet G.H.3rd, Carlson G.P., DiMauro S. (1992). Polysaccharide storage myopathy associated with recurrent exertional rhabdomyolysis in horses. *Neuromuscul Disord.*, 2 (5-6): 351–359.
- Valberg S.J., McCue M.E., Mickelson J.R. (2011). The interplay of genetics, exercise, and nutrition in polysaccharide storage myopathy. *JEVs.*, 31 (5-6): 205–210.
- Valberg S.J., Finno C.J., Henry M.L., Schott M., Velez-Irizarry D., Peng S., McKenzie E. C., Petersen J. L. (2021). Commercial genetic testing for type 2 polysaccharide storage my-

opathy and myofibrillar myopathy does not correspond to a histopathological diagnosis. *Equine Vet J.*, 53 (4): 690–700.

Valberg S.J., Williams Z.J., Finno C. J., Schultz A., Velez-Irizarry D., Henry M. L., Gardner K., Petersen J.L. (2023). Type 2 polysaccharide storage myopathy in Quarter Horses is a novel glycogen storage disease causing exertional rhabdomyolysis. *Equine Vet. J.*, 55 (4): 618–631.

Wade C.M., Giulotto E., Sigurdsson S., Zoli M., Gnerre S., Imsland F. et al. (2009). Genome sequence, comparative analysis, and population genetics of the domestic horse. *Science* 6; 326 (5954): 865–867.

Zatwierdzono do druku: 8 IV 2024

## **FREQUENCY ANALYSIS OF ARG309HIS MUTATION IN THE *GYS1* GENE IN COLD-BLOODED AND HUCUL HORSE POPULATIONS**

**Monika Komorowska, Jakub Zipper, Adrianna Musiał, Bogusława Długosz,  
Katarzyna Olczak, Aleksandra Błaszczak, Monika Stefaniuk-Szmukier,  
Katarzyna Ropka-Molik**

### **SUMMARY**

The incidence of genetically based diseases is a major breeding problem involving economic losses due to the costs of mating and keeping in-foal mares, the treatment and the mortality of the offspring affected. Polysaccharide storage myopathy is a hereditary (autosomal dominant) disease caused by a mutation in the *GYS1* gene. The aim of this study was to estimate the prevalence of the Arg309His mutation in the *GYS1* gene for cold-blooded and Hucul horse populations. The study material consisted of hair roots collected from 99 Hucul horses and 121 cold-blooded horses. Genotyping was performed by PCR-RFLP and Sanger sequencing. The results showed the presence of mutations in both cold-blooded and Hucul horses, both heterozygous and homozygous for the unfavourable allele.

Keywords: horse, PCR-RFLP, PSSM1, polysaccharide storage myopathy