

Umaszczenie merle psów – podłoże molekularne i konsekwencje zdrowotne

IWONA SZATKOWSKA¹, MARTYNA OTRĘBA¹, JAN KORBECKI¹,
EWA CZERNIAWSKA-PIĄTKOWSKA², JERZY WÓJCİK²,
WILHELM GRZESIAK³, DANIEL ZABORSKI³

¹Pracownia Biologii Molekularnej, Katedra Nauk o Zwierzętach Przeżuwających,
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie, ul. Klemensa Janickiego 29, 71-270 Szczecin

²Katedra Nauk o Zwierzętach Przeżuwających, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie,
ul. Klemensa Janickiego 29, 71-270 Szczecin

³Pracownia Biostatystyki, Katedra Nauk o Zwierzętach Przeżuwających,
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie, ul. Klemensa Janickiego 29, 71-270 Szczecin

Otrzymano 18.10.2022

Zaakceptowano 18.02.2023

Szatkowska I., Otręba M., Korbecki J., Czerniawska-Piątkowska E., Wójcik J., Grzesiak W., Zaborski D.
Molecular background of the merle coat color in dogs and its health consequences

Summary

Coat colour in dogs is influenced by many genes and their polymorphic forms. The main coat colour pattern depends on pigment type, i.e. eumelanin or pheomelanin, whose synthesis is regulated by tyrosinase encoded by the *TYRP1* gene. However, other genes also contribute to the ultimate phenotype. One of them is *PMEL* responsible for the merle coat colour. This review focuses on the role of melanocytes in the phenotypic expression of coat colour, the merle phenotype and genotype, phenotypic diversity of the *M* allele carriers, health consequences for the carriers of the allele responsible for the merle coat colour and problems with the identification of the *M* allele carriers based on phenotype and dog breeds with the merle coat colour accepted by the FCI.

Keywords: oligogenic trait, polymorphism, eumelanin, pheomelanin, *TYRP1*, *PMEL*, melanocyte, *M* allele

Umaszczenie psów jest cechą oligogenową, związaną z oddziaływaniem szeregu genów, takich jak: *MC1R* (locus *E*), *CBD103* (locus *K*), *ASIP* (locus *A*), *TYRP1* (locus *B*), *MLPH* (locus *D*), *MITF* (locus *S*) czy *SILV* (locus *M*) (6, 20).

Zasadnicze umaszczenie zależne jest od rodzaju pigmentu, czyli eu- bądź feomelaniny, warunkowane genem *TYRP1*, kodującym tyrozinazę regulującą syntezę obu tych barwników. Niski poziom jej aktywności w melanocytach prowadzi do syntezy feomelaniny, czerwonego barwnika występującego wyłącznie w sierści psa, natomiast wyższy skutkuje stymulacją czarno-brązowej eumelaniny, zidentyfikowanej nie tylko w sierści, ale również w tęczówkach oczu i śluzówce nosa (38). Gen *ASIP*, kodujący białko sygnałowe aguti (14), odpowiedzialny jest za najbardziej prymitywne umaszczenie, charakteryzujące się sferowym rozmieszczeniem pigmentu. W locus tym zidentyfikowano 6 alleli determinujących: dominujące umaszczenie czarne (*A^S*), płowe (*A^P*), wilczaste (*a^w*), podpalane (*a^t*), czaprakowe (*a^{sa}*) i recesywne czarne (*a*). Kolejny gen, *CBD103*, koduje β-defensynę 103, mającą zdolność

inhibicji ekspresji *ASIP*, w wyniku czego dochodzi do zahamowania syntezy feomelaniny, przy jednoczesnej, prawidłowej syntezie eumelaniny (26). W 2007 r. zidentyfikowano w tym genie trzynukleotydową delecję kodonu 23 w drugim eksonie, wskazując jej kluczową rolę w determinacji czarnego umaszczenia u psów (7). Najbardziej zmienny sekwencyjnie jest gen *MC1R*, kodujący białko receptorowe składające się z siedmiu domen transbłonowych, którego ligandem jest hormon stymulujący melanocyty α. W genie tym zidentyfikowano ponad 30 substytucji, korelujących z różnymi wariantami pigmentacji psów (29).

Różnorodność fenotypowa umaszczeń psów dotyczy nie tylko zasadniczej pigmentacji i jej odcieni, ale również różnego rodzaju pręgowań, cętkowań, znaczeń i łaciateści. W tym kontekście istotnych jest kilka genów, przy czym nie wszystkie z nich zostały poznane na poziomie molekularnym (6, 20). Pierwszy z nich, *MITF*, krytyczny w rozwoju grzebienia nerwowego i melanocytów, pośrednio może zwiększać poziom ekspresji tyrozinazy (18). Chociaż jego pełne działanie nie zostało dokładnie poznane, to na poziomie molekularnym

larnym zidentyfikowano 4 allele, których efekt fenotypowy może być dodatkowo zmieniony przez liczne, nieznane modyfikatory. Są to następujące warianty, determinujące: pełen kolor (S), umaszczenie irlandzkie (s^i), srokatość (s^p) i skrajną łaciatość (s^w) (15). Geny odpowiedzialne za cętkowanie i dereszowatość u psów zmapowano w chromosomie 38, w tym allele odpowiedzialny za cętkowanie typowe dla dalmatyńczyków (8). Ostatnim w tej grupie czynnikiem genetycznym jest gen *SILV* z *locus M*, odpowiedzialny między innymi za umaszczenie merle, któremu poświęcone jest niniejsze opracowanie.

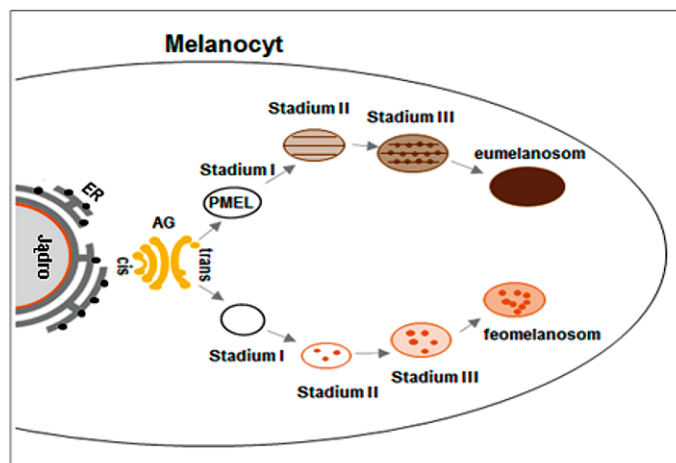
Bez względu na typ umaszczenia i sposób jego dziedziczenia, najistotniejsze dla ekspresji fenotypowej barwy sierści są komórki barwnikowe, w których zachodzi melanogeneza, czyli melanocyty.

Melanocyty, melanosomy i rola białka PMEL17 w syntezie eumelaniny

Melanocyty powstają z populacji komórek grzebienia nerwowego, a konkretnie z prekursorowej linii melanoblastów. Lokują się one głównie w warstwie podstawnej naskórka i mieszkach włosowych (w proksymalnej części cebulki włosowej), a także w innych obszarach organizmu, takich jak ucho wewnętrzne czy błona naczyniowa oka. Zasadniczą rolą komórek barwnikowych u kręgowców jest synteza i gromadzenie melanin, procesy zachodzące w cytoplazmatycznych organellach zwanych melanosomami (25). Syntetyzowane są dwa główne typy melanin, mianowicie feomelanina i eumelanina, przy czym o rodzaju wytwarzanych pigmentów decydują dostępność substratów i aktywność enzymów zaangażowanych w proces melanogenezy (17). Do inicjacji tego procesu niezbędna jest ekspresja tyrozinazy, kluczowego enzymu dla syntezy pigmentu oraz białek z nią związanych, takich jak TYRP1 i TYRP2. W pierwszym etapie zachodzi konwersja L-tyrozyny do L-3,4-dihydroksyfenyloalaniny (DOPA), która jest szybko utleniana do L-DOPAchinu (13). Po tym etapie szlaki syntezy barwników przebiegają inaczej. W obecności cysteiny L-DOPAchinon jest przekształcany w 3-cysteinyloDOPA, a następnie utleniany do żółtej lub czerwonej feomelaniny. Przy braku tioli, takich jak cysteina czy glutation, L-DOPAchinon ulega spontanicznej cyklizacji do DOPAchromu, który szybko utlenia się i polimeryzuje, tworząc ciemnobrązową lub czarną eumelaninę (17).

Melanosomy syntetyzujące eumelaninę lub feomelaninę mają odrębną morfologię (ryc. 1), przy czym w dalszej części niniejszego opracowania główna uwaga będzie skupiona na eumelanosomach, które w przypadku umaszczenia merle odgrywają szczególną rolę.

Eumelanosomy, podobnie jak feomelanosomy, powstają w czteroetapowym procesie. Premelanosomy (stadium I) mają formę okrągłych, małych pęcherzyków z amorficzną macierzą, wywodzących się z obsza-



Ryc. 1. Formowanie i dojrzewanie melanosomów w czasie syntezy melanin w melanocytach. Opracowanie własne według Kushimoto i wsp. (19)

Objaśnienia: AG – aparat Golgiego, ER – retikulum endoplazmatyczne

ru trans aparatu Golgiego. W II stadium w ich świetle gromadzi się sieć włóknkowa, zwana też matrycą melanosomów, która powstaje w wyniku potranslacyjnych modyfikacji białka premelanosomalnego (PMEL), zwanego również PMEL17, GP100 lub *SILV* (9, 17). Białko to jest glikoproteiną transbłonową typu I, złożoną z krótkiego peptydu sygnałowego, długiej domeny N-końcowej, pojedynczej domeny transbłonowej i krótkiej cytoplazmatycznej domeny C-końcowej. Po jego syntezie w retikulum endoplazmatycznym następuje usunięcie peptydu sygnałowego, N-glikozylacja i tworzenie wiązań dwusiarczkowych (5). Niedojrzała cząsteczka PMEL jest eksportowana do premelanosomów, gdzie następują jej dalsze modyfikacje, głównie proteoliza wymagana do prawidłowego tworzenia włókienek. Na tym etapie, choć tyrozinaza jest obecna, nie odnotowuje się syntezy eumelaniny. Początek jej syntezy obserwuje się w III stadium, w którym enzymy zaangażowane w proces syntezy melanin zaczynają być aktywne. Eumelanina w formie cząsteczek barwnikowych osadza się na włóknach, polimeryzuje, powodując ich pogrubienie i czernienie (stadium III), aż do całkowitego wypełnienia światła melanosomu (stadium IV). Te włókniste, elipsoidalne organelle w miarę dojrzewania przemieszczają się od okołojądrowych do dystalnych obszarów komórki. W pełni zmelanizowanych melanosomach tyrozinaza traci aktywność enzymatyczną (12, 19).

Podczas melanogenezy jako produkty pośrednie syntetyzowane są cząsteczki toksyczne, takie jak chinony czy nadutlenek wodoru. Jedną z funkcji włókienek PMEL jest tworzenie rusztowania dla tych wysoce reaktywnych związków pośrednich, które przy braku tej wyspecjalizowanej struktury mogłyby swobodnie dyfundować w obrębie melanosomów i potencjalnie niszczyć ich integralność (19). Włókna PMEL chronią więc melanocyty przed toksycznością związaną z syntezą melaniny, optymalizują polimeryzację, kon-

densację i przechowywanie melaniny (39), aczkolwiek tworzenie włókienek PMEL i synteza melaniny to dwa niezależne procesy.

Fenotyp merle

Umaszczenie merle, określane także jako marmurkowe bądź nakrapiane, to unikatowy wzór barwy szaty psa domowego, mający dwie zasadnicze cechy: jasny, rozcieńczony kolor bazowy i losowe łaty w pełni pigmentowanej okrywy włosowej (ryc. 2). Mogą one mieć dowolny kształt i rozmiar i występować na całym ciele. Krawędzie łat są nieregularne, często odbierane przez obserwatora jako poszarpane lub podarte. Nie zaobserwowano reguły, definiującej powstawanie znaczeń, dlatego też każdy nosiciel genu merle ma niepowtarzalny i indywidualny wzór maści. U psów z merlingiem, będących heterozygotami pod względem nosicielstwa allelu *M*, często występuje heterochromia oczu: mogą być one jednolicie brązowe, jednolicie niebieskie lub różnokolorowe – z jednym okiem niebieskim, a drugim brązowym lub połączeniem obu kolorów w jednym oku. Ponadto obserwuje się na nosie i łapach odbarwienia w formie różowych plam. Należy jednak podkreślić, że allel *M*, warunkujący umaszczenie merle, wpływa jedynie na eumelanogenezę, ale nie na feomelanogenezę, toteż psy nosiciele allelu *M* o czerwono-brązowej bądź rudej barwie okrywy włosowej nie będą wykazywać typowych dla merle śladów odbarwień (17).

W kolorze bazowym u psów z merlingiem mogą występować znaczne rozbieżności. Rozcieńczone części różnicują się od bardzo bladego, pudrowego błękitu do ciemnoszarego koloru. Zdarza się, że na siwej bazie występują drobne czarne łatki. W takim przypadku umaszczenie nazywane jest brudnym lub błotnistym merle.

Genotyp merle

Sposób dziedziczenia umaszczenia merle, które od dawna fascynowało kynologów, opisano już w 1935 r. jako autosomalne o niepełnej dominacji (24) i wprowadzono nazewnictwo dla allelu typu dzikiego (*m*) i merle (*M*). Tezę tę potwierdził Little (za Langevin i wsp.) (20). W 2006 r. Hedani i wsp. (16) wykorzystując analizę sprzężeń genetycznych, podjęli próbę identyfikacji genu odpowiedzialnego za merling, skupiając się na trzech genach kandydujących, odpowiedzialnych za kolor sierści: *MITF*, *PAX3* i *SOX10*. Wprawdzie nie udało się potwierdzić udziału tych genów w ekspresji fenotypu merle, ale udało się zawęzić obszar poszukiwań *locus M*. Ostateczna identyfikacja genu *M* w chromosomie 10 została ogłoszona w tym samym roku przez Clark i wsp. (11). Gen ten, określany

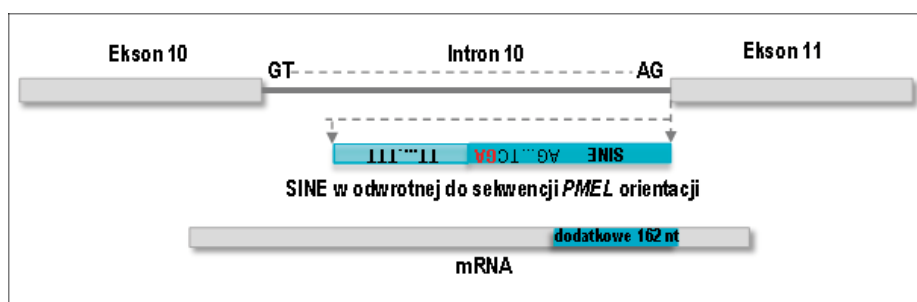


Ryc. 2. Umaszczenie merle (fot. L. Gralewicz)

jako *PMEL* lub *SILV*, ulega ekspresji głównie w melanocytach (35), a jego zmutowana forma *M* zawiera insercję elementu SINE (krótki rozproszony element jądrowy SINE-Cf, short interspersed nuclear element – *Canis familiaris*). Elementy te są unikalne dla rodziny psowatych (23).

W przypadku prawidłowej sekwencji genu *PMEL* psa składanie pre-mRNA przebiega w sposób typowy – do prawidłowego wycinania intronów niezbędna jest obecność w ich strukturze sekwencji donorowej GU na końcu 5', miejsca akceptorowego AG na końcu 3' oraz tzw. miejsce rozgałęzienia. Przy tak zachowanej strukturze pre-mRNA, wymienione miejsca są rozpoznawane przez wchodzące w skład spliceosomu małe jądrowe RNA (snRNA), umożliwiające samo wycinanie intronów tak, aby powstała cząsteczka mRNA zawierająca tylko sekwencje eksonowe (21).

Insercja elementu SINE-Cf na granicy intronu 10 i 11 eksonu genu składa się z głowy i korpusu oraz krótkich powtórzeń dinukleotydowych (GA)_n, dzięki którym powstaje dodatkowe miejsce akceptorowe dla składowania pre-mRNA. Końcową sekwencją tego elementu stanowi ogon poli(dT) o zmiennej długości (ryc. 3). Cała wstawka ma orientację antysensowną w stosunku do sekwencji *PMEL* (11, 36). U psów o umaszczeniu merle w molekularnym mechanizmie składania wy-



Ryc. 3. Struktura insertu SINE w sekwencji genu *PMEL* (opis w tekście). Opracowanie własne według Varga i wsp. (36)

korzystywane jest właśnie to alternatywne miejsce akceptorowe (ryc. 3, kolor czerwony). Następstwem jest wbudowanie dodatkowej sekwencji długości 162 nukleotydów między eksonami 10 i 11 w dojrzałym transkrypcie mRNA. Zjawisko to nosi miano eksonizacji (31). Tak powstała matryca RNA (ryc. 3, kolor seledynowy), czyli otwarta ramka odczytu (ORF) dla translacji skutkuje syntezą białka PMEL wydłużonego o 52 aminokwasy (2, 25). Białko takie traci swoją biologiczną aktywność, tworząc w eumelanosomach nieregularną, gęstą sieć włókienkową i ostatecznie nie tylko wpływa ujemnie na syntezę i polimeryzację eumelaniny w melanosomach, ale również, z powodu toksyczności związków pośrednich w tej syntezie, na znaczące obniżenie żywotności melanocytów (39).

Opisane wyżej konsekwencje insercji SINE-Cf dotyczą heterozygotycznych osobników *m/M* z klasycznym wzorem merle, niemniej jednak długość tej wstawki różnicuje fenotypowo nosicieli allelu *M*, co zostanie zaprezentowane w kolejnym rozdziale niniejszego opracowania.

Zróżnicowanie fenotypowe nosicieli allelu *M*

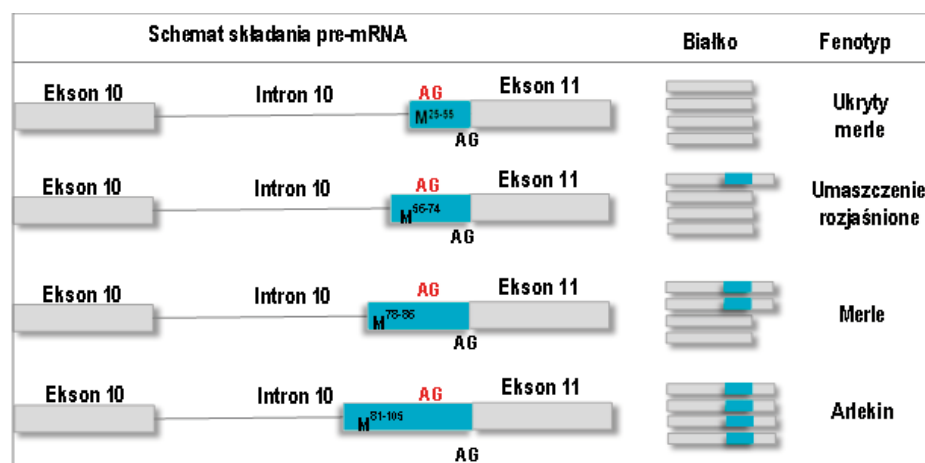
W zależności od długości insertu SINE, a w zasadzie od długości ogona poli (dT), proponowano kilka systemów fenotypowych nosicieli allelu *M*. Pierwszy z nich, opisany przez Murphy i wsp. (25), identyfikuje cztery typy umaszczenia (ryc. 4) w zależności od długości ogona poli (dT). Z czego to wynika? Otóż intronowe miejsce rozgałęzienia, mało konserwatywne u ssaków, znajduje się zazwyczaj w odległości 20-50 pz od miejsca akceptorowego. Jeśli jednak zostanie ona rozciągnięta poza określoną długość poprzez wstawkę poli (dT), w mechanizmie składania wykorzystywane są alternatywne miejsca akceptorowe, stąd zróżnicowanie fenotypowe nosicieli allelu *M* o różnej długości sekwencji poli (dT) w insercie SINE (36).

U osobników określanych mianem „ukryty merle” (cryptic merle) z umaszczeniem o pełnej pigmentacji i brakiem wzoru merle, wstawka poli (dT) jest o 30-40%

krótsza aniżeli u osobników standardowych pod względem merle. Zredukowany ogon poli (dT) u nosicieli tego allelu *M* prawdopodobnie jest zbyt krótki, aby w mechanizmie składania mogło być wykorzystane alternatywne miejsce akceptorowe, toteż wykorzystywane jest miejsce pierwotne AG. Powstaje więc prawidłowa matryca RNA, typowa dla osobników posiadających gen *PMEL* bez mutacji, a to przekłada się na prawidłową strukturę pierwszorzędową białka PMEL. U psów o umaszczeniu rozjaśnionym występuje, ale w śladowych ilościach, wzór merle, przy czym dla tej barwy okrywy włosowej ustalono próg długości ogona poli (dT) na 66 pz. Dla psów merle o pełnej ekspresji fenotypowej określona długość wstawki poli (dT) umożliwia wykorzystanie alternatywnego miejsca do składania pre-mRNA (ryc. 4), co skutkuje syntezą białka PMEL o nieprawidłowej strukturze z pełnymi tego konsekwencjami, opisanymi wyżej. Najdłuższy odcinek poli (dT) identyfikowano u psów z umaszczeniem arlekinowym, u których ekspresja zmutowanego allelu *M* prowadzi do syntezy białka PMEL prawie wyłącznie z insercją 52 aminokwasów, a tym samym występowania pierwotnej pigmentacji w formie rozproszonych, ciemnych plam na białym tle (25). Należy podkreślić, że nazewnictwo „arlekin” jest terminem zaczerpniętym z języka francuskiego i w żaden sposób nie jest powiązane z oryginalnym wzornictwem arlekinów, jakie obserwowane jest wyłącznie u dogów niemieckich.

Podobne wzory fenotypowe, w zależności od długości całych insertów SINE zaprezentowali Ballif i wsp. (3), co sumarycznie zestawiono w tabeli 1. Należy jednak zaznaczyć, że autorzy opisywanego doświadczenia, pomimo jasnych korelacji między długością insertu a umaszczeniem, identyfikowali osobniki, które pomimo takich samych wstawek SINE okazywały się fenotypowo niereprezentatywne dla grupy.

Nieco bardziej zróżnicowane typy umaszczenia u heterozygotycznych nosicieli allelu *M* zaproponowali Langevin i wsp. (20), skupiając się, podobnie jak Ballif



Ryc. 4. Schemat przebiegu procesu składania pre-mRNA PMEL (z insercją SINE-Cf) i zróżnicowanie fenotypowe u nosicieli różnych wariantów allelu *M* (opracowanie własne według Murphy i wsp. (25))

i wsp. (3), na całkowitej długości insercji SINE w strukturze genu *PMEL* z zastrzeżeniem, że u różnych ras mogą występować niewielkie różnice w wielkości wzorów marmurkowych. Korelacje, o których mowa, zestawiono w tabeli 1.

Z czego wynikają różnice w liczbie definiowanych wyżej typów fenotypowych merle? Istnieje ku temu kilka przesłanek. Pierwsza z nich, bodaj najbardziej istotna, wynika z zastosowanych technik molekularnych, nie zawsze umożliwiających precyzyjną identyfikację długości insertu czy to ograniczonego do wielkości ogona poli

Tab. 1. Typy umaszczenia merle w zależności od długości insertu SINE w genie *SILV* u psa domowego wg Ballif i wsp. (3)

Grupa fenotypowa	Długość insertu	Cechy fenotypowe
Typ dziki		intensywna pigmentacja, brak wzoru marmurkowego
Ukryty merle	200-246 pz	brak umaszczenia merle, ale w rzadkich przypadkach mogą pojawić się niewielkie łaty merle lub subtelne anomalie kolorystyczne
Nietypowy merle	247-264 pz	znaczne odejście od prawidłowego koloru sierści, z rozrzedzonym kolorem i nietypowym merle
Merle	265-268 pz	klasyczne umaszczenie merle, w rzadkich przypadkach minimalna marmurkowość
Arlekin merle	269-280 pz	widoczne plamy w wielu odcieniach tego samego lub różnych kolorów bez bieli (tweed) lub z białym tłem (arlekin)
<i>m</i> : allel dziki	171 pz	non merle, intensywna pigmentacja, brak wzoru marmurkowego, żaden pigment nie jest zredukowany do białego
<i>Mc</i> : cryptic merle	200-230 pz	intensywna pigmentacja, brak wzoru marmurkowego, alternatywnie może dojść do nieznacznej zmiany koloru sierści, kiedy pigment może być postrzegany jako lekko wyblakły lub odbarwiony, brak zmiany koloru oczu, żaden pigment nie jest zredukowany do białego
<i>Mc+</i> : cryptic merle+	231-246 pz	intensywna pigmentacja, brak wzoru marmurkowego, alternatywnie może dojść do nieznacznej zmiany koloru sierści, kiedy pigment może być postrzegany jako lekko wyblakły lub odbarwiony, brak zmiany koloru oczu, żaden pigment nie jest zredukowany do białego
<i>Ma</i> : atypical merle	247-254 pz	pigment jest rozjaśniony do szarego lub brązowego głównie na uszach, szyi i w okolicy ogona, brak wzoru marmurkowego, mogą wystąpić niebieskie oczy, żaden pigment nie jest zredukowany do białego
<i>Ma+</i> : atypical merle+	255-264 pz	pigment jest rozjaśniony do szarego lub brązowego i mało intensywny, niezdefiniowany, wzór merle może wydawać się przytłumiony, mogą wystąpić niebieskie oczy, żaden pigment nie jest zredukowany do białego
<i>M</i> : merle	265-268 pz	klasyczne umaszczenie marmurkowe, występuje rozjaśnienie przypadkowych obszarów okrywy włosowej do jaśniejszego koloru, występują niebieskie oczy, żaden pigment nie jest zredukowany do białego
<i>Mh</i> : Harlequin merle	269-280 pz	przeważa duża ilość bieli, niewielkie plamy pokryte umaszczeniem marmurkowym, dochodzi do rozcieńczenia łat do koloru białego, mogą wystąpić niebieskie oczy

(dT), czy też całej wstawki SINE. Kolejna kwestia dotyczy materiału badawczego, na którym opierano wnioskowanie o korelacjach między genotypem a fenotypem merle. Langevin i wsp. (20) przeprowadzili badania na grupie 181 osobników należących do 14 ras, Murphy i wsp. (25) pobrali próby od 259 psów należących do 7 ras, a Ballif i wsp. (3) weryfikowali swoje tezy w oparciu o grupę 175 osobników będących przedstawicielami trzech ras. Tak liczne grupy doświadczalne pozwoliły na molekularne zdefiniowanie wielkości poszczególnych alleli *M*, natomiast ich powiązanie z konkretnym fenotypem mogło być, zwłaszcza w rozbudowanym klasyfikatorze Langevin i wsp. (20), problematyczne z uwagi na subiektywność dokonywanych ocen umaszczenia przez hodowców, niejednorodną ekspresję umaszczenia merle u różnych ras psów, co generalnie utrudnia ujednolicenie wzorca poszczególnych fenotypów w powiązaniu z konkretnym genotypem (38).

Pomimo przedstawionych wyżej problemów, ustalenie genetycznej podstawy i molekularnego mechanizmu determinującego różne typy umaszczenia merle okazało się niewątpliwym sukcesem, zarówno z hodowlanego, jaki i weterynaryjnego punktu widzenia.

Konsekwencje zdrowotne nosicieli allelu odpowiedzialnego za umaszczenie merle

Funkcjonalne defekty melanosomów mogą mieć wpływ nie tylko na typ umaszczenia, ale także na dysfunkcje, pozornie niezwiązane z pigmentacją okrywy włosowej. U nosicieli allelu *M* może pojawić się wiele chorób, głównie związanych z narządami słuchu i wzroku, a także nadwrażliwość na promienie

słoneczne, co w konsekwencji zwiększa predyspozycje do rozwoju nowotworów skóry. Na wymienione wyżej dysfunkcje narażone są zwłaszcza osobniki homozygotyczne pod względem allelu *M*, określane jako double merle lub podwójne merle, u których merling jest albo bardzo słabo zaznaczony, albo wręcz niemożliwy do zaobserwowania. Są to zwierzęta o białym umaszczeniu z delikatnymi małymi cętkami występującymi na czubku głowy, grzbiecie oraz na końcówce ogona (10).

U osobników homozygotycznych pod względem allelu *M* najczęściej występuje zespół mnogich defektów oka, określany terminem MOD (merle ocular-dysgenesis), spowodowany pierwotnym zaburzeniem rozwoju pigmentowanego nabłonka siatkówki, co z kolei przekłada się na powstawanie licznych ubytków leżącej pod spodem naczyniówki oraz twardówki oka (1, 22). Konsekwencją tych zmian jest występowanie mikroftalmii (małooocza) ze zróżnicowanym obrazem klinicznym, która może przybierać postać jedno- lub obustronną. W łagodniejszych stanach obserwuje się niewielkie zmniejszenie gałki ocznej, które w formie obustronnej może być niezauważalne. W ciężkich przypadkach, którym towarzyszy zaćma, może występować zapalenie błony naczyniowej, przekrwienie spojówek, obrzęk rogówki, zwężenie źrenic oraz światłowstręt. Ponadto obserwuje się brak błony odblaskowej oraz ubytki brodawki nerwu wzrokowego. Dysgeneza wywołana allelem merle występuje najczęściej u owczarków australijskich, dogów niemieckich, border collie i jamników, w tym mieszańców (4). Rokowania dla MOD zależą od nasilenia wymienionych wyżej objawów.

Wśród nieprawidłowości ocznych związanych z umaszczeniem merle wymienia się także anomalie oczne u collie (collie eye anomaly, CEA), występujące głównie u border collie, owczarków szetlandzkich i owczarków australijskich, a także u psów rasy whippet długowłose, nova scotia duck tolling retriever, owczarek szetlandzki i australian sheep dog. Jest to wrodzona, dziedziczna choroba, obejmująca siatkówkę i naczyniówkę oka, o niejednoznacznym obrazie klinicznym, przy czym molekularne podłoże tego schorzenia nie ma bezpośredniego związku z allelem *M*, ale u osobników z merlingiem, posiadających niebieskie tęczówki i albinotyczne dno oka, diagnozowanie hipoplazji siatkówki typowej dla CEA jest utrudnione (30). Wynika to z faktu, iż u dorastających szczeniąt merle niedorozwój tęczówki zostaje zamaskowany rozwijającym się nabłonkiem barwnikowym, pokrywającym niżej położone zmiany chorobowe i pomimo ich istnienia dno oka wygląda prawidłowo (1). U takich osobników CEA pozostaje niezdiagnozowane.

Kolejnym bardzo poważnym zaburzeniem mogącym występować u osobników z umaszczeniem marmurkowym jest wrodzona głuchota (27), która zwykle rozwija się w ciągu pierwszych kilku tygodni po urodzeniu, gdy przewód słuchowy jest jeszcze zamknięty. Choroba spowodowana jest niedostateczną liczbą funkcjonalnych melanocytów w prążkowiu naczyniowym ślimaka, które są niezbędne do wytwarzania potencjału wewnątrz ślimakowego w uchu wewnętrznym, który umożliwia komórkom rzęskowym przekształcenie wibracji dźwiękowych w potencjał czynnościowy (40). Częstość występowania tego schorzenia u psów-nosicieli allelu *M* (genotyp heterozygotyczny 305 *M/+*) szacuje się na 3,5%, a u homozygot (*M/M*) na 25%. Biorąc pod uwagę częstość występowania głuchoty jednostronnej bądź obustronnej wskazuje się, że psy heterozygotyczne są zdecydowanie częściej tylko jednostronnie głuche, natomiast psy homozygotyczne wykazują tendencję odwrotną – obustronny defekt jest powszechniejszy niż jednostronny (32). Ponadto sugerowane są różnice rasowe – uznano, że w rasach collie (collie, sheltie i border collie) omawiane schorzenie występuje częściej niż np. w catahoula leopard dog (13, 34).

Problemy z identyfikacją nosicieli allelu *M* w oparciu o fenotyp

W niniejszym opracowaniu wiele uwagi poświęcono korelacji między genotypem i fenotypem merle nie bez

powodu. Jak wynika z obserwacji opisanych wyżej, kojarzenie heterozygotycznych psów z merlingiem zgodnie z prawami Mendla skutkuje pojawieniem się w miocie ok. 25% homozygotycznych szczeniąt *MM*, u których problemy ze wzrokiem i słuchem są wysoce prawdopodobne, dlatego też fenotypowe określenie potencjalnego nosiciela allelu merle jest bardzo istotne, zwłaszcza że dostęp do komercyjnych testów molekularnych umożliwiających jego identyfikację jest ograniczony (obecnie badania takie można zlecić: <https://www.laboklin.co.uk/laboklin/showGeneticTest.jsp?testID=8188>). Problem ten dotyczy zwłaszcza psów z genotypem merle, ale niewykazujących fenotypu merle. Poza osobnikami z ukrytym merle bądź z allelem *M* warunkującym umaszczenie rozcieńczone należy podkreślić, że nawet nosiciele allelu *M* o wymaganej długości dla alternatywnego składania pre-mRNA PMEL warunkującego omawiany fenotyp, mogą pozostawać nierozpoznane (38). Wynika to z faktu, iż miejsca alternatywnego składania, utworzone przez insercję SINE są mniej wydajne, toteż u takich osobników zarówno transkrypty typu dzikiego, jak i alternatywne trafiają do melanosomów w różnej proporcji, co może powodować problemy z określeniem wzoru marmurkowego w okrywie włosowej (25). Ponadto gen merle wpływa na rozcieńczenie jedynie eumelaniny, pozostawiając jednocześnie syntezę feomelaniny na fizjologicznym poziomie (28), zatem u heterozygotycznych psów *Mm* o rudym umaszczeniu identyfikacja miniaturowych rozcieńczonych plam jest praktycznie niemożliwa (33), dlatego też występowanie w określonej populacji osobników *MM*, pomimo zakazu kojarzenia psów z merlingiem, jest wysoce prawdopodobne, a problem zdrowotny osobników merle wciąż aktualny.

Rasy o umaszczeniu merle zaakceptowane przez FCI

Międzynarodowa Federacja Kynologiczna (FCI) obejmująca 99 krajów członkowskich i partnerskich, jest odpowiedzialna za promocję i nadzór nad hodowlą psów rasowych oraz ochronę ich zdrowia i dobrostan, toteż umaszczenie marmurkowe jest uznawane jedynie u wybranych ras psów. W Polsce Związek Kynologiczny (<https://www.zkwp.pl/wzorcowe.php>) dopuszcza fenotypowy efekt merle we wzorcach rasowych trzech grup psów (tab. 2), tj. grupy pierwszej, drugiej i czwartej.

Ze zrozumiałych względów opisanych wyżej kojarzenie homozygotycznych osobników *MM* jest stanow-

Tab. 2. Rasy psów z umaszczeniem merle dopuszczone przez Związek Kynologiczny w Polsce

Grupa	Rasy psów
1. Owczarki i inne psy pasterskie z wyłączeniem szwajcarskich psów do bydła	border collie (FCI 297), mudi (FCI 238), owczarek australijski (FCI 342), owczarek francuski beauceron (FCI 44), owczarek pirenejski (a face rase) (FCI 138), owczarek pirenejski (a poil long) (FCI 141), owczarek szetlandzki (FCI 88), owczarek szkocki długowłose (FCI 156), owczarek szkocki krótkowłose (FCI 296), welsh corgi cardigan (FCI 38)
2. Pinczery i sznauclery, molosy, szwajcarskie psy górskie i do bydła, pozostałe rasy	dog niemiecki (FCI 235)
4. Jamniki	jamnik (FCI 148)

czo odradzane. W Polsce wielu hodowców rezygnuje z krycia heterozygotycznych psów merle, aby zminimalizować ryzyko uzyskania szczeniąt double merle. W Wielkiej Brytanii (UK Kennel Club) prowadzona jest pod tym względem ścisła kontrola: szczenięta po rodzicach z umaszczeniem merle nie są oficjalnie rejestrowane, podobnie jak w wielu innych krajach europejskich. W Stanach Zjednoczonych z kolei praktykowany jest inny zwyczaj. Wszystkie szczenięta po rodzicach merle można legalnie ewidencjonować w całym kraju, a psy MM bez problemów zdrowotnych są pokazywane na wystawach i dopuszczane do dalszej hodowli (10). Należy jednak zdecydowanie podkreślić, że pomijanie przez hodowców możliwych negatywnych skutków niewłaściwych kojarzeń nie powinno być akceptowane. Pomimo ewentualnych efektów ekonomicznych (wyższa cena za psy z umaszczeniem merle), nie należy pomijać aspektów etycznych, bowiem osłabianie zdrowotne danej populacji, zwłaszcza przez świadomych kynologów i uznane związki kynologiczne, mija się z ideą hodowlaną, której zawsze powinna towarzyszyć dbałość o zdrowie i dobrostan zwierząt.

Piśmiennictwo

- Balicki I., Bryła P.: Anomalia oczu owczarków collie. Okulistyka Weterynaryjna, e-kwartalnik dla lekarzy i studentów weterynarii 2011, 1, 1-6.
- Ballif B. C., Emerson L. J., Ramirez C. J., Carl C. R., Sundin K., Flores-Smith H., Shaffer L. G.: The PMEL gene and merle (dapple) in the dachshund: cryptic, hidden, and mosaic variants demonstrate the need for genetic testing prior to breeding. Hum. Genet. 2021, 140, 1581-1591.
- Ballif B. C., Ramirez C. J., Carl C. R., Sundin K., Zahand A., Shaffer L. G., Flores-Smith H.: The PMEL gene and merle in the domestic dog: A continuum of insertion lengths leads to a spectrum of coat color variations in Australian Shepherds and related breeds. Cytogenet. Genome Res. 2018, 156, 22-34.
- Bauer B. S., Sandmeyer L. S., Grahn B. H.: Diagnostic ophthalmology. Microphthalmos and multiple ocular anomalies (MOA) OU consistent with merle ocular dysgenesis (MOD). Can. Vet. J. 2015, 56, 767-768.
- Bissig C., Rochin L., Van Niel G.: PMEL amyloid fibril formation: The bright steps of pigmentation. Int. J. Mol. Sci. 2016, 17, 1438-1442.
- Brancalion L., Haase B., Wade C. M.: Canine coat pigmentation genetics: a review. Animal Genetics 2022, 53, 1, 3-34.
- Candille S. I., Kaelin C. B., Cattanaach B. M., Yu B., Thompson D. A., Nix M. A., Kerns J. A., Schmutz S. M., Millhauser G. L., Barsh, G. S.: A β -defensin mutation causes black coat color in domestic dogs. Science 2007, 318, 1418-1423.
- Cargill E. J., Famula T. R., Schnabel R. D., Szczep G. M., Murphy K. E.: The color of a Dalmatian's spots: linkage evidence to support the TYRP1 gene. BMC Vet. Res. 2005, 1, 1-9.
- Cichorek M., Wachulska M., Stasiewicz A.: Heterogeneity of neural crest-derived melanocytes. Cent. Eur. J. Biol. 2013, 8, 315-330.
- Ciechańska J., Bury P.: Geny pleiotropowe związane z umaszczeniem i skutki ich występowania u psów. Prz. Hod. 2011, 79, 16-17.
- Clark L., Wahl J., Rees C., Murphy K.: Retrotransposon insertion in SILV is responsible for merle patterning of the domestic dog. Proc. Natl Acad. Sci. USA 2006, 103, 1376-1381.
- D'Alba L., Matthew D., Shawkey D.: Melanosomes: biogenesis, properties, and evolution of an ancient organelle. Physiol. Rev. 2019, 99, 1-19.
- De Riso L., Lewis T., Freeman J., de Stefani A., Mattisek L., Blott S.: Prevalence, heritability and genetic correlations of congenital sensorineural deafness and pigmentation phenotypes in the Border Collie. Vet. J. 2011, 188, 286-290.
- Dreger D. L., Anderson H., Donner J., Clark J. A., Dykstra A., Hughes A. M., Ekenstedt K. J.: Atypical genotypes for canine agouti signaling protein suggest novel chromosomal rearrangement. Genes 2020, 11, 739-746.
- Hagen M. A. E., Kolk J., Barendse M. A. M., Imholz S., Leegwater P. A. J., Knol B. W., Oost B. A.: Analysis of the inheritance of white spotting and the evaluation of KIT and EDNRB as spotting loci in Dutch boxer dogs. J. Hered. 2004, 95, 526-531.
- Hedan B., Corre S., Hitte C., Dreano S., Vilboux T., Derrien T., Denis B., Galibert F., Galibert M. D., Andre C.: Coat colour in dogs: identification of the Merle locus in the Australian shepherd breed. BMC Vet. Res. 2006, 2, 9.
- Hellstrom A. R., Watt B., Fard S. S., Tenza D., Mannstrom P., Narfstrom K., Ekestén B., Ito S., Wakamatsu K., Larsson J.: Inactivation of Pmel alters melanosome shape but has only a subtle effect on visible pigmentation. PLoS Genet. 2011, 7, e1002285.
- Körberg I. B., Sundström E., Meadows J. R. S., Pielberg G. R., Gustafson U., Hedhammar A., Karlsson E. K., Seddon J., Söderberg A., Vilà C., Zhang X., Åkesson M., Lindblad-Toh K., Andersson G., Andersson L.: A simple repeat polymorphism in the MITF-M promoter is a key regulator of white spotting in dogs. PLoS One 2014, 9, e104363.
- Kushimoto T., Basur V., Valencia J., Matsunaga J., Vieira W. D., Ferrans V. J., Muller J., Appella E., Hearing V. J.: A model for melanosome biogenesis based on the purification and analysis of early melanosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2001, 98, 10698-10703.
- Langevin M., Synkova H., Jancuskova T., Pekova S.: Merle phenotypes in dogs – SILV SINE insertions from Mc to Mh. PLoS One 2018, 13, 10-15.
- Lee Y., Rio D. C.: Mechanisms and regulation of alternative pre-mRNA splicing. Annu. Rev. Biochem. 2015, 84, 291-323.
- Martin C. L., Pickett J. P., Spiess B. M.: Ophthalmic Disease in Veterinary Medicine. Manson Publishing, London 2005, s. 414-417.
- Minnick M. F., Stillwell L. C., Heineman J. M., Stiegler G. L.: Highly repetitive DNA sequence possibly unique to canids. Gene 1992, 110, 235-238.
- Mitchell A. L.: Dominant dilution and other color factors in Collie dogs. J. Hered. 1935, 26, 425-430.
- Murphy S. C., Evans J. M., Tsai K. L., Clark L. A.: Length variations within the Merle retrotransposon of canine PMEL: correlating genotype with phenotype. Mob. DNA 2018, 9, 26.
- Oguro-Okano M., Honda M., Yamazaki K., Okano K.: Mutations in the melanocortin 1 receptor, β -defensin 103 and agouti signaling protein genes, and their association with coat color phenotypes in Akita-inu dogs. J. Vet. Med. Sci. 2011, 73, 853-858.
- Platt S., Freeman J., Stefani A., Wieczorek L., Henley W.: Prevalence of unilateral and bilateral deafness in Border Collies and association with phenotype. J. Vet. Intern. Med. 2006, 20, 1355-1362.
- Pelles Z., Gáspárdy A., Zöldág L., Lénárt X., Ninausz N., Varga L., Zenke P.: Merle allele variations in the Mudi dog breed and their effects on phenotypes. Acta Vet. Hung. 2019, 67, 159-173.
- Reissmann M., Ludwig A.: Pleiotropic effects of coat colour-associated mutations in humans, mice and other mammals. Semin. Cell Dev. Biol. 2013, 24, 576-586.
- Sargan D. R.: Collie eye anomaly in the rough collie. J. Small Anim. Pract. 2001, 42, 204.
- Schmitz J., Brosius J.: Exonization of transposed elements: A challenge and opportunity for evolution. Biochimie 2011, 93, 1928-1934.
- Schmutz S. M.: An analysis of the inheritance pattern of an adult-onset hearing loss in Border Collie dogs. Canine Genet. Epidemiol. 2014, 6, 98-109.
- Stain G. M., Clark L. A., Wahl J. M., Turner A. E.: Prevalence of deafness in dogs heterozygous or homozygous for the merle allele. J. Vet. Intern. Med. 2009, 23, 282-286.
- Strain G. M.: Canine deafness. Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract. 2012, 42, 1209-1224.
- Theos A. C., Truschel S. T., Raposo G., Marks M. S.: The Silver locus product Pmel17/gp100/Silv/ME20: controversial in name and in function. Pigment Cell Res. 2005, 18, 322-336.
- Varga L., Lénárt X., Zenke P., Orbán L., Hudák P., Ninausz N., Pelles Z., Szőke A.: Being merle: The molecular genetic background of the canine merle mutation. Genes 2020, 11, 660.
- Wang W., Kirkness E. F.: Short interspersed elements (SINEs) are a major source of canine genomic diversity. Genome Res. 2005, 15, 1798-808.
- Watson A., Wayman J., Kelley R., Feugier A., Bjourge V.: Increased dietary intake of tyrosine upregulates melanin deposition in the hair of adult black-coated dogs. Anim. Nutr. 2018, 4, 422-428.
- Yasumoto K., Watabe H., Walencia J., Kushimoto T., Kobayashi T., Appella E., Vincent J.: Epitope mapping of the melanosomal matrix protein gp100 (PMEL17): rapid processing in the endoplasmic reticulum and glycosylation in the early Golgi compartment. J. Biol. Chem. 2004, 279, 28330-28338.
- Yu W., Zong S., Du P., Zhou P., Li H., Wang E., Xiao H.: Role of the stria vascularis in the pathogenesis of sensorineural hearing loss: A narrative review. Front. Neurosci. 2021, 15, 774585.

Autor korespondencyjny: prof. dr hab. inż. Iwona Szatkowska, ul. Klemensa Janickiego 29, 71-270 Szczecin; e-mail: iwona.szatkowska@zut.edu.pl