

KIT GENE POLYMORPHISM IN ASSOCIATION WITH HORSE COAT COLOUR – TOBIANO

POLYMORFIZMUS GENU KIT VE VZTAHU KE ZBARVENÍ U KONÍ – TOBIANO

Chalupová P., Knoll A.

Department of Animal Morphology, Physiology and Genetics, Faculty of Agronomy, Mendel University of Agriculture and Forestry Brno, Zemědělská 1, 613 00, Brno, Czech Republic

E-mail: xchalup1@node.mendelu.cz, knoll@mendelu.cz

ABSTRACT

Tobiano spotting pattern is characterized by large patches of white that cross the dorsal midline and include legs. This pattern is caused by dominant gene *To*. Polymorphisms in *KIT* gene are associated with different spotting patterns, including tobiano. Totally 61 tobiano horses and 89 non-tobiano horses were tested by PCR-RFLP for polymorphism in intron 13 of the *KIT* gene and for chromosomal inversion on ECA3 (distal breakpoint is localized near *KIT*). Association of SNP in intron 13 was not absolute – 3 horses with just one tobiano parent were found homozygous. But in case of chromosomal inversion test, only tobiano horses with both tobiano parents were homozygous. This marker is suitable for zygosity testing. Results suggest, that chromosomal inversion on ECA3 could cause tobiano spotting pattern in horses.

Key words: horse, coat colour, tobiano, *KIT*, polymorphism.

ÚVOD

Tobiano je jedním ze vzorů strakatosti u koní. Je charakterizován odznaky na končetinách a jasně ohraničenými okrouhlými bílými skvrnami vertikálního uspořádání, přecházejícími přes hřbet. Rozsah skvrnitosti je různý. Vzor tobiano je determinován autozomálně dominantní alelou *To*. Kůň fenotypu tobiano (případně v kombinaci s jiným vzorem) bude mít tedy genotyp *ToTo* nebo *Toto*, non-tobiano *toto*. Strakatost je viditelná již při narození (BOWLING, 1996; GOWER, 2000; SPONENBERG, 2003).



Obr. 1 Bay tobiano (paint horse).

Gen *To* tvoří vazbovou skupinu (LG II) s geny pro albumin (*Al*), pro vazebné proteiny pro vitamin D (*GC* – group-specific component), extension (*E*) a roan (*Rn*) a esterázu (*ES*) (ANDERSSON *et* SANDBERG, 1982). Se vzorem tobiano jsou asociovány alely *AL-B* a *GC-S*. Nejméně 90 % tobiano koní má *AL-B* a *GC-S* alely (BOWLING, 1996).

Silným kandidátním genem pro tobiano je protoonkogen *C-kit* (*KIT*), který u člověka, prasete a myši způsobuje bílou skvrnitost (BROOKS *et al.*, 2002).

KIT kóduje receptor s transmembránovou tyrozin kinázou (stem cell factor receptor). Ligandem tohoto receptoru je KITLG (*KIT* ligand) neboli SCF (stem cell factor – faktor kmenových buněk; také nazýván mast cell growth factor – růstový faktor mastocytů), který ovlivňuje mj. tvorbu, zrání a přežívání melanoblastů a melanocytů (HRUŠKOVIČ *et* HRUŠKOVIČ, 1999).

Porovnáváním DNA sekvencí jednobarevných koní a koní homozygotních pro gen tobiano (*To*) byl nalezen v intronu 13 protoonkogenu *C-kit* (*KIT*) polymorfismus *MspI* (substituce C→G v pozici 693). Alela s restrikčním místem asociovaná se vzorem tobiano byla nazvána *KM1*, alela bez restrikčního místa *KM0*. Přestože alela *KM1* je silně vázaná s

genem *To*, asociace není absolutní (3 ze 104 testovaných jednobarevných koní rovněž nesli alelu *KM1*). Nicméně, test se jeví mnohem účinnější pro identifikaci homozygotů *ToTo* než biochemický test využívající *Al* a *GC* haplotypu (BROOKS *et al.*, 2002).

Brooks *et al.* (2007) metodou FISH zkoumali možný výskyt inverze ECA3. Sondy byly vybírány na základě homologie se sekvencí člověka. Porovnání výsledků od koní tobiano a non-tobiano odhalilo chromozomální paracentrickou inverzi, která zahrnuje přibližně třetinu celkové délky ECA3. Dva homozygotní tobiano koně nesli pouze chromozomy s inverzí, čtyři heterozygotní 1 invertovaný a 1 normální, u 2 non-tobiano koní inverze pozorována nebyla. Distální zlom lze identifikovat pomocí PCR – přímý primer ohraničuje zlom zdola, 2 reverzní primery jsou pak specifické pro non-tobiano a pro tobiano. Test PCR opět vykázal úplnou asociaci inverze s fenotypem tobiano. Inverze neruší kódující sekvenci žádného známého genu a není zcela jasné, jakým mechanismem způsobuje tobiano fenotyp. Je možné, že inverze ruší konzervovanou nekódující nebo regulační sekvenci *KIT* genu. Doposud nebyla nalezena žádná výjimka mezi asociací této inverze s tobiano fenotypem (BROOKS *et al.*, 2007).

Cílem práce je aplikovat obě metodiky na vybraný soubor koní, porovnat výsledky a zjistit vhodnost pro rutinní testování.

MATERIÁL A METODIKA

Bylo analyzováno 150 koní různých plemen (nejvyšší zastoupení mělo plemeno paint horse – 55 jedinců), z čehož bylo 61 koní vzoru tobiano (do této skupiny byly zahrnuty i minimálně exprimované vzory, kombinace s jiným vzorem a gray tobiano, kde již strakatost nemusí být z fenotypu patrná).

Pro izolaci DNA pomocí JETQUICK® Blood & Cell culture DNA Spin Kit (GENOMED) byly použity chlupové cibulky z hřívy.

Detekce polymorfizmu intronu 13 genu KIT (PCR–RFLP)

Dle metodiky Brooks *et al.* (2002). PCR byla optimalizována pro termální cykler PTC 200 (MJ Research).

Primery:

KIT-II 3-11F 5'- ACCCGCTTGCATTTTATCACCTGTCG - 3'

KIT-II 3-1235R 5'- CGAGCATATAGGAAAAGGGTAGAAAGAGGTGAG - 3'

Optimalizovaná reakční směs

Celkový objem 25 µl

2 µl templátové DNA, 19,55 µl H₂O, 2,5 µl 10 x LA PCR buffer complete (Top-Bio), 0,5 µl 10mM dNTP mixu (Fermentas), 0,125 µl primeru KIT-II 3-11F (10 pmol/µl) (Invitrogen™), 0,125 µl primeru KIT-II 3-1235R (10 pmol/µl) (Invitrogen™), 0,2 µl LA DNA polymerázy (5 U/µl) (Top-Bio).

Teplotní profil PCR reakce

Úvodní denaturace 95 °C/2 min.

35 cyklů (denaturace 95 °C/20 s, annealing 65 °C/30 s, elongace 68 °C/70 s)

závěrečná elongace 68 °C/10 min.

PCR produkt byl následně štěpen restriční endonukleázou *MspI*. Fragmenty byly elektroforeticky separovány na 2% agarózovém gelu. Vizualizace pomocí ethidium bromidu za použití UV světla.

Detekce chromozomální inverze ECA3 (PCR)

Dle metodiky Brooks *et al.* (2007).

Primery:

ECA3-F 5'- TGATAGATCAGTGTAGACGTAAGTGTGACAGAGAC - 3'

ECA3xR 5'- AACAGCTACTCCCACTCTAGCATAGGTTC - 3'

ECA3toR 5'- TTCACCACAGAGTATCCAATTATGTCTTTCACATAATGC- 3'

Optimalizovaná reakční směs

Celkový objem 25 µl

2 µl templátové DNA, 18,3 µl H₂O, 2,5 µl 10 x LA PCR buffer complete (Top-Bio), 0,5 µl dNTP mixu (Fermentas), 0,5 µl primeru ECA3-F (10 pmol/µl) (Invitrogen™), 0,5 µl primeru ECA3xR (10 pmol/µl) (Invitrogen), 0,5 µl primeru ECA3toR (10 pmol/µl) (Invitrogen™), 0,2 µl LA DNA polymerázy (5 U/µl) (Top-Bio).

Teplotní profil PCR reakce:

Úvodní denaturace 95 °C/2 min.

30 cyklů (denaturace 95 °C/20 s, annealing 57 °C/30 s, elongace 68 °C/20 s)

závěrečná elongace 68 °C/7 min.

VÝSLEDKY A DISKUZE

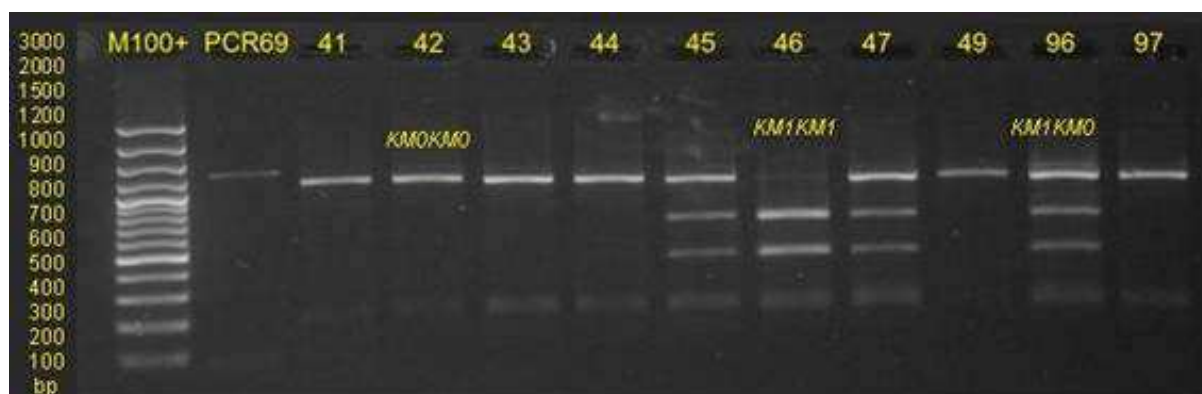
Stanovení genotypu intronu 13 genu KIT

PCR produkt (1249 bp) tvoří po štěpení *MspI* fragmenty následujících velikostí:

KM0KM0 – 189 a 1060 bp

KM1KM0 – 189, 397, 663 a 1060 bp (alela *KM1* je asociována se vzorem tobiano)

KM1KM1 – 189, 397 a 663 bp



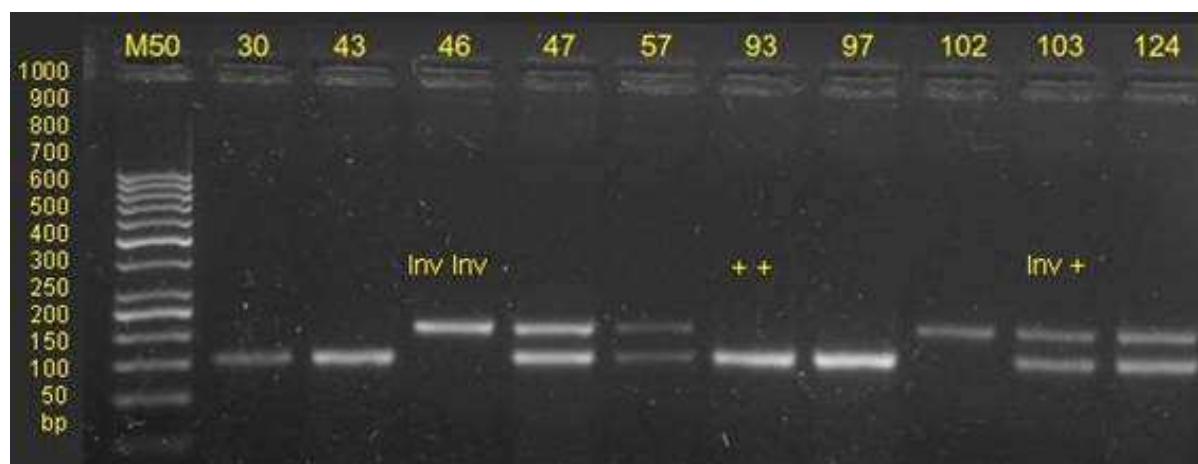
Obr. 2 Stanovení genotypů – intron 13 genu KIT (RFLP).

Detekce chromozomální inverze ECA3 (PCR)

Velikost PCR produktu

209 bp u chromozomu s inverzí (tobiano)

152 bp u normálního chromozomu



Obr. 3 Stanovení genotypů – chromozomální inverze ECA3 (PCR).

Tab. 1 Absolutní frekvence genotypů vzhledem k fenotypu rodičů.

	KM0 KM0	++	KM1 KM0	Inv +	KM1 KM1	Inv Inv
tobiano s 1 rodičem tobiano	–	–	42	45	3	–
tobiano s 2 rodiči tobiano	–	–	11	11	5	5
non-tobiano s 1 rodičem tobiano	8	8	–	–	–	–
non-tobiano s 2 rodiči non-tobiano	81	81	–	–	–	–

Bylo testováno 61 koní fenotypu tobiano (případně kombinace s jiným vzorem) a 89 koní non-tobiano. Metodou PCR–RFLP byl analyzován polymorfismus v intronu 13 genu KIT. Všichni koně fenotypu tobiano nesli alespoň jednu alelu KM1. Všichni koně non-tobiano

měli genotyp *KM0KM0*, avšak tři jedinci pouze s jedním rodičem tobiano vykazovali homozygotní genotyp *KM1KM1*.

Brooks *et al.* (2002) testovali 129 tobiano koní a 104 jednobarevných (anglický plnokrevník). Nepředpokládáně homozygotní vyšel jeden kůň (jeden z rodičů anglický plnokrevník – tedy non-tobiano). Tři jednobarevní angličtí plnokrevníci však alelu *KM1* nesli.

Lze souhlasit se závěry Brooks *et al.* (2002) – test může vést k falešným výsledkům při určování homozygotnosti.

Ve zkoumaném souboru nebyla alela *KM1* u jednobarevných koní prokázána. Je však nutno zdůraznit, že např. v případě minimálně exprimovaného tobiana nemusí být vzor rozpoznán, obdobně u gray tobiano koně, který již zcela vybělil.

Metodou PCR byla testována přítomnost chromozomální inverze ECA3. Brooks *et al.* (2007) u žádného z 58 jednobarevných anglických plnokrevníků inverzi neobjevili, včetně těch, kteří nesli *KM1* alelu, 96 tobiano koní bylo heterozygotních *Inv+*, 25 homozygotních *InvInv*. Zygotnost ve vztahu k fenotypu rodičů není uvedena. V souladu s výsledky Brooks *et al.* (2007) byla u sledovaného souboru chromozomální inverze ECA3 odhalena pouze u koní tobiano. Jako homozygotní *InvInv* byli zjištěni pouze jedinci s oběma rodiči tobiano.

Ve shodě s Brooks *et al.* (2002; 2007) jsem dospěla k obdobným závěrům, tzn., že asociace polymorfizmu v intronu 13 genu *KIT* s *To* alelou není úplná – 3 jedinci s jedním rodičem tobiano vykazovali homozygotní genotyp *KM1KM1*. Chromozomální inverze ECA3 však ukázala kompletní asociaci bez výjimek.

ZÁVĚR

Polymorfizmus intronu 13 genu *KIT* a chromozomální inverze ECA3 byly detekovány u 150 koní fenotypu tobiano i non-tobiano. Zatímco genotyp intronu 13 genu *KIT* testovaný metodou PCR–RFLP ve třech případech neodpovídal předpokládanému, v případě testování inverze metodou PCR byla asociace úplná. Nelze vyloučit, že chromozomální inverze ECA3 je příčinou tobiano skvrnitosti u koní. Molekulárně-genetickou analýzu chromozomální inverze ECA3 pomocí metody PCR je možné doporučit pro rutinní testování genotypu koní tobiano. Může být vhodným doplňkem při identifikaci koní minimálně exprimovaných či kombinovaných vzorů. Metoda je vhodná i z hlediska jednoduchosti, časové nenáročnosti a finanční přijatelnosti.

LITERATURA

ANDERSSON, L., SANDBERG, K. A linkage group composed of three coat color genes and three serum protein loci in horses, *The Journal of Heredity*, 1982, Vol. 73, No. 2, p. 91–94.

BOWLING, A. Horse Genetics. Cambridge: CABI Publishing, 1996. 224p.

ISBN 0851991017. Chapter 2–9, p. 19–81.

BROOKS, S.A., LEAR, T.L., ADELSON, D.L., BAILEY, E. A chromosome inversion near the *KIT* gene and the Tobiano spotting pattern in horses. *Cytogenetic and Genome Research*, 2007, Vol. 119, p. 225–230.

BROOKS, S.A., TERRY, R.B., BAILEY, E. A PCR-RFLP for *KIT* associated with tobiano spotting pattern in horses. *Animal Genetics*, 2002, Vol. 33, p. 301–303.

GOWER, J. *Horse Colour Explained: A Breeder's Perspective*, The Crowood Press, Ramsbury – Marlborough, 2000. 144 p. ISBN 1 86126 384 8.

HRUŠKOVIČ, I., HRUŠKOVIČ, B. *Lidské mastocyty ve zdraví a nemoci* [online]. *Medicína – odborné fórum lékařů a farmaceutů*, 1999.

Dostupné z: <http://www.zdrava-rodina.cz/med/med199/med199_41.htm>.

SPONENBERG, D.P. *Equine Color Genetics*. 2nd ed. Iowa State University Press, Blackwell Publishing, 2003. 215 p. ISBN 0-8138-0759-X.