

GENETICS ANALYSIS OF WHITE SPOTTING IN THE DOGS

GENETICKÁ ANALÝZA STRAKATOSTI PSŮ

Nesvadbová M., Knoll A.

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

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

ABSTRACT

White spotting in dogs appears to be controlled by a major simple recessive locus. *MITF* was identified as the candidate gene for white spotting in dogs. Complete co-segregation with SPN in intron 3 was found in this gene and recessively inherited, random or piebald spotting in Schipperke, Beagle crossbreds and Newfoundlands. The aim of this work was to optimise the method conditions in our laboratories and to verify the SNP for testing of white spotting in the dogs. We used PCR-RFPL assay for breed testing Newfoundlands, Rhodesian Ridgeback, Great Dane and Pug Dog, but we did not confirm the aforesaid SNP. Therefore analyses of this candidate gene will continue in the future.

Key words: white spotting, dog, genetic marker

ÚVOD

U psů bylo doposud identifikováno sedm genů, které jsou zodpovědné za zbarvení srsti: *TYRP1*, *ASIP*, *MC1R*, *CBD103*, *MLPH*, *SILV* a *MITF* (Schmutz and Berryere 2007). Bílá strakatost (white spotting) psů znamená výskyt pigmentovaných ploch vedle čistě bílých nebo prokvetlých částí těla. Mezi různými plemeny i mezi jedinci jednoho plemene je ve strakatosti velká variabilita (Dostál 2007). Lokus strakatosti (*S*) byl definován Littleem (1957). Popsal čtyři alely tohoto lokusu: *S* (solid), *Sⁱ* (irish spotting), *S^p* (piebald spotting) a *S^w* (extreme white). Alela *S* kontroluje jednotné zbarvení bez strakatosti, alela *Sⁱ* je zodpovědná za výskyt bílé barvy na ploše těla menší než 20 %, alela *S^p* za výskyt bílé barvy na 20-80 % těla a alela *S^w* kontroluje extrémně bílé zbarvení na více než 80 % těla.

Metallinos a Rine (2000) se jako první pokusili najít gen, který je zodpovědný za strakatost psů. Studovali geny *ENDRB* a *KIT* u kříženců border kolií a novofundlandského psa. Ačkoliv tyto geny jsou zapojeny do bílé skvrnitosti u dalších savců, jako jsou koně, prasata, skot, myši a krysy, nejsou tyto geny odpovědné za strakatost u sledovaných plemen psů. Stejně tak nejsou tyto geny zodpovědné za bílé zbarvení, které můžeme vidět u boxerů (van Hagen et al. 2004). Jako kandidátní gen pro strakatost psů byl identifikován gen *MITF*. V intronu 3 tohoto genu byl nalezen jednonukleotidový polymorfismus – SNP, který byl testován u plemen šiperka, novofundlandský pes a kříženců bígla (Rothschild et al. 2006). Také Karlson et al. (2007) a Leegwater et al. (2007) identifikovali region CFA20 jako oblast, která ukrývá gen pro bílé zbarvení u boxerů a kandidátní gen pro tento region je *MITF*.

Cílem této práce bylo dle publikace Rothschild et al. (2006) vypracovat metodiku testování jimi nalezeného SNP, optimalizovat podmínky této metodiky a ověřit, zda je tento marker možné využít i u dalších plemen psů.

MATERIÁL A METODIKA

Využitelnost SNP v genu *MITF* bylo sledováno u plemene novofundlandský pes (5 černých, 4 s bílými odznaky na hrudi a 2 bíločerní psi), rhodeský ridgeback (7 s bílými odznaky na hrudi a 4 pláštově zbarvení psi), německá doga (9 černých psů s bílými odznaky) a mops (2 s bílými odznaky na hrudi a 3 černí psi). Vzorky DNA byly odebrány z bukální sliznice psů pomocí odběrových kartáčků (Cytobrush Plus, Medscand Medical AB). Z těchto kartáčků byla DNA extrahována pomocí DNA kitu (Jetquick Tissue DNA Spin Kit, GENOMED). PCR primery (přímý 5'-GGGTTATTGTGAGGGAGCAA-3' a zpětný 5'-CAAAGCCACCCAAAGAGAGA-3') byly převzaty z publikace Rothschild et al. (2006). Polymerázová řetězová reakce (PCR) byla provedena v termocykleru PTC-100 (MJ Research) a reakční směs (15 µl) obsahovala 50 ng genomické DNA, 1x HotStarTaq Master Mix (QIAGEN) a 0.2 µM každého primeru. Pomocí programu Webcutter (<http://www.firstmarket.com/cutter/cut2.html>) byl vyhledán vhodný restriční enzym (HinfI), který byl použit při štěpení sledovaného polymorfismu metodou polymorfismus délky restričních fragmentů (RFLP).

VÝSLEDKY A DISKUZE

Rothschild et al. (2006) identifikoval jako kandidátní gen pro strakatost psů gen *MITF*. V intronu 3 tohoto genu byl nalezen jednonukleotidový polymorfismus - SNP (C/T). Testování tohoto SNP pomocí metody PCR-RFLP bylo provedeno u plemen šiperka, novofundlandský pes a kříženci bígla. Jednotně zbarvení psi (SS) byli CC, obligátní heterozygoti (Ss) byli CT a strakatí psi (ss) byli TT. Mezi SNP a fenotypem strakatosti nebyly nalezeny žádné rekombinace.

Pro potvrzení správnosti této analýzy byl nejprve tento polymorfismus testován u jedinců plemene novofundlandský pes. Avšak námi použitá metoda PCR-RFLP odhalila, že sledované SNP se u tohoto plemene nevyskytuje. Stejně výsledky byly dosaženy také u plemene rhodeský ridgeback, německá doga a mops. Námi dosažené výsledky naznačují, že sledované SNP není možné využívat k detekci strakatosti u psů. Zda se testované SNP u sledovaných plemen opravdu nevyskytuje, bude dále ověřeno sekvenováním.

Anderson (2008) uvádí, že v kódující sekvenci genu *MITF* nebyla nalezena žádná mutace, a proto se předpokládá, že strakatost u psů pravděpodobně způsobují regulační mutace v tomto genu. Srovnáním polymorfizmů mezi psy, kteří reprezentovali různé formy alel S, byly odhaleny tři kandidátní kauzální mutace v nekódujících oblastech tohoto genu: krátká rozptýlená sekvence (SINE), polymorfismus v délce sekvence a delece 12 párů bazí. Zmíněné kauzální mutace budeme testovat v rámci připravovaného projektu a výsledky budou použity pro další vědeckovýzkumnou práci pregraduálních studentů.

ZÁVĚR

Cílem práce bylo dle publikace Rothschild et al. (2006) vypracovat metodiku testování jimi nalezeného SNP, optimalizovat podmínky metodiky a ověřit, zda je tento marker možné využít i u dalších plemen psů. Sledované SNP nebylo nalezeno u plemen novofundlandský pes, rhodeský ridgeback, německá doga a mops, proto jej pravděpodobně není možné využívat k detekci strakatosti u psů. V další fázi práce budou testovány jiné kauzální mutace nalezené v genu *MITF* a výsledky budou použity pro vědeckovýzkumnou práci studentů.

LITERATURA

- Anderson L. (2008): Genome-wide association analysis in domestic animals: a powerful approach for genetic dissection of trait loci. *Genetica* (online, <http://www.springerlink.com/content/ur381n0t07n44033/fulltext.pdf>).
- Dostál J. (2007): *Genetika a šlechtění plemen psů*. DONA, 261 s.
- Karlson E.K., Baranowska I., Wade C.M, Salmon Hillbertz N.H., Zody M.C., Anderson N., Biagi T.M., Patterson N., Pielberg G.R., Kulbokas E.J. 3rd, et al. (2007): Efficient mapping of mendelian traits in dogs through genome-wide association. *Nature Genetics*, 39(11): 13218.
- Leegwater P.A., van Hagen M.A., van Oost B.A. (2007): Localization of white spotting locus in Boxer dogs on CFA20 by genome-wide linkage analysis with 1500 SNPs. *Journal of Heredity*, 98(5):549-52.
- Little C.C. (1957): *The Inheritance of Coat Color in Dogs*. Comstock Publishing Ass., 232 s.
- Metallinos D. & Rine J. (2000) Exclusion of EDNRB and KIT as the basis for white spotting in Border Collies. *Genome Biology* (online, <http://www.genomebiology.com/2000/1/2/research/0004>).
- Rothschild M.F., Van Cleave P.S., Glenn K.L., Carlstrom L.P., Ellinwood N.M. (2006): Association of MITF with white spotting in Beagle crosses and Newfoundland dogs. *Animal Genetics*, 37(6):606-7.
- Schmutz S.M., Berryere T.G. (2007): Genes affecting coat colour and pattern in domestic dogs: a review. *Animal Genetics*, 38(6):539-49.
- van Hagen M.A.E., van der Kolk J., Barendse M.A.M., Imholz S., Leegwater P.A.J., Knol B.W. & van Oost B.A. (2004): Analysis of the inheritance of white spotting and the evaluation of KIT and EDNRB as spotting loci in Dutch Boxer Dogs. *Journal of Heredity*, 95(6):526-31.