

## Identyfikacja wariantu w rejonie genu *FAM14A* potencjalnie związanego z występowaniem syndromu metabolicznego (EMS) u koni czystej krwi arabskiej\*

Monika Stefaniuk-Szmukier,<sup>1</sup> Katarzyna Ropka-Molik<sup>2</sup>, Monika Bugno-Poniewierska<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, Zakład Hodowli Koni, al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków

<sup>2</sup>Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy, Dział Genomiki i Biologii Molekularnej Zwierząt, 32-083 Balice k. Krakowa

Monitoring oraz diagnostyka występowania w populacji zwierząt alleli genów niekorzystnych jest coraz częściej wybieranym narzędziem wspomagającym pracę hodowlaną. Aktualnie, rozwój metod z zakresu genetyki molekularnej umożliwia szybką identyfikację wariantów genów letalnych powodujących straty ekonomiczne. Działania te są szczególnie ważne w hodowli koni. Klacz może wydać rocznie jedno źrebię, a w sytuacji wystąpienia u potencjalnego potomka choroby letalnej koszty krycia, utrzymania klaczy podczas ciąży oraz utraty planowanego przychówku są znaczne. Oprócz chorób letalnych, gdzie straty są oczywiste, mogą występować także choroby o podłożu genetycznym nie powodujące śmierci osobnika. Straty wynikające z wystąpienia chorób tego typu wynikają głównie z długofalowego leczenia i nieprzydatności do pracy. Bardzo często objawy są złożone i niejednoznaczne, co dodatkowo utrudnia postawienie trafnej diagnozy.

Określenie syndromu metabolicznego (ang.

*equine metabolic syndrome*; EMS) zostało wprowadzone do medycyny weterynaryjnej w 2002 r. jako zespół chorobowy, w skład którego wchodzi m.in. otyłość i insulinooporność (IR), co w konsekwencji może prowadzić do ochwatów (Frank i in., 2010). Niemniej jednak, zespół ten obejmuje szersze spektrum dysfunkcji, które zaburzają metabolizm energetyczny, funkcjonowanie adipocytów, indukują stany zapalne oraz stres oksydacyjny.

Dotychczas uważano, że u podłoża EMS leży dieta bogata w węglowodany strukturalne (skrobia) o wysokim indeksie glikemicznym oraz czynniki genetyczne (Dugdale i in., 2010). Jednak, najnowsze badania Lewis i in. (2017), prowadzone w oparciu o wykorzystanie macierzy EquineSNP50 pozwoliły na identyfikację dwóch markerów molekularnych, położonych w okolicy genu kandydującego *FAM174A*. Wykazano, że występowanie allelu C w intragenicznym rejonie w pobliżu genu *FAM14A* (BIEC2-263524) Chr14: 69276814 T>C jest skorelowane z podwyższonym poziomem insuliny oraz występowaniem ochwatu. Natomiast drugi marker (11-G), znajdujący się w rejonie homopolimeru 3' UTR jest związany z insulinoopornością i wzrostem wartości wskaźnika oceny kondycji koni (Lewis i in., 2017).

Celem przeprowadzonych badań było oszacowanie frekwencji występowania pierwszego z dwóch potencjalnych markerów EMS allelu genu *FAM14A*; BIEC2-263524 w elitarnej

\*Praca wykonana w ramach projektu „Kierunki wykorzystania oraz ochrona zasobów genetycznych zwierząt gospodarskich w warunkach zrównoważonego rozwoju” współfinansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju w ramach Strategicznego programu badań naukowych i prac rozwojowych „Środowisko naturalne, rolnictwo i leśnictwo” – BIOSTRATEG, nr umowy: BIOSTRATEG2/297267/14/NCBR/2016.

populacji koni arabskich w Polsce. Uzyskane informacje mogą zostać uwzględnione w pracy hodowlanej. Identyfikacja zwierząt posiadających predyspozycje do EMS może ułatwić zarządzanie stadem oraz zapobiec rozwinięciu się syndromu.

### Materiał i metody

Materiał do badań stanowiła krew pobrana z żyły jarzmowej od 90 koni (62 klaczy i 28 ogierów) rasy czystej krwi arabskiej utrzymywanych w jednej stadninie. Genomowe DNA wyizolowano przy użyciu zestawu Sherlock (A & A Biotechnology). Jakość oraz stężenie uzyskanego DNA oceniono na aparacie Nanodrop. Mutację w rejonie genu *FAM174A* chr14: 69276814 T>C oznaczono na sekwenatorze kapilarnym Genetic Analyzer 3500xl.

### Wyniki i ich omówienie

Diagnostyka EMS jest związana z szeregiem testów, które w pracy w terenie mogą przysparzać wiele trudności. Aktualnie, rozpoznanie EMS polega na ocenie fenotypowej w połączeniu z testami klinicznymi. Ocena fenotypowa uwzględnia poznanie dokładnej wagi konia, obecność specyficznego otłuszczenia więzadła karkowego, łopatek, nasady ogona, a u ogierów również okolicy napletka (Frank i in., 2010; Carter

i in., 2009). Przeprowadza się również ocenę kondycji konia przy zastosowaniu skali BSC (*body condition scoring*) (Henneke i in., 1983). Dodatkowo, w celu rozpoznania subklinicznej lub/i klinicznej postaci ochwatu wykonuje się badanie rentgenowskie puszek kopytowej. Diagnostyka kliniczna obejmuje oznaczenie poziomu insuliny, testu kombinowanej tolerancji glukozy (Frank i in., 2006). Podjęto również próby poszukiwania metody, która uprościłaby diagnostykę EMS w oparciu o podstawową analizę składu włosa pochodzącego od chorych osobników (Marycz i in., 2013). Poznanie genetycznych podstaw leżących u podłoża predyspozycji koni do wystąpienia określonego zespołu chorobowego może przyczynić się do efektywniejszej diagnostyki oraz umożliwi wczesną prewencję.

Jak dotychczas, markery: BIEC2-26354 allele C oraz allele 11-G w rejonie *FAM174A* wykazują silne powiązanie z wynikami diagnostyki koni z EMS (poziomem insuliny trójglicerydów, BSC i ochwatem). Ponadto, haplotyp podwyższonego ryzyka wykazuje dominujący tryb dziedziczenia, zgodnie z wcześniejszymi obserwacjami (Treiber i in., 2006). Funkcja genu *FAM174A* nie została jednoznacznie poznana, przypuszcza się, że bierze udział w utrzymaniu homeostazy cholesterolu (Blattmann i in., 2013).

Tabela 1. Procentowy udział poszczególnych genotypów w rejonie genu *FAM14A* Chr14: 69276814 T>C  
The percentage share of particular genotypes in *FAM14A* Chr14 gene region: 69276814 T>C

Wyszczególnienie <i>Item</i>	Genotyp – <i>Genotype</i>			Liczba przebadanych zwierząt <i>Number of examined animals</i>
	TT	TC	CC	
Populacja – <i>Population</i>	31,6% (28)	51,6% (46)	16,8% (15)	89
Klacz – <i>Mares</i>	32,3% (20)	51,6% (32)	16,1% (10)	62
Ogier – <i>Stallions</i>	18,5% (8)	51,8% (14)	18,6% (5)	27

W przeprowadzonych badaniach dla wszystkich zwierząt oznaczono genotyp mutacji w rejonie genu *FAM174A* chr14: 69276814 T>C. W populacji koni czystej krwi arabskiej wykazano najwyższą frekwencję genotypu TC – 51,6%. Osobniki homozygotyczne TT stanowiły 31,6%; zidentyfikowano 16,8% koni posiadających genotyp CC (homozygoty recesywne). U klaczy wykazano porównywalny procentowy udział poszczególnych genotypów w stosunku do całej

badanej populacji (tab. 1). U osobników męskich natomiast, z uwagi na model reprodukcyjny koni arabskich, w którym ogier może pokryć liczną stawkę klaczy, wysoka frekwencja allelu C wśród potencjalnych reproduktorów zwraca uwagę na konieczność monitorowania populacji.

Przeprowadzone badania potwierdziły obecność allelu C w rejonie genu *FAM174A* Chr14: 69276814 T>C u koni czystej krwi arabskiej. Wykazano wysoki odsetek osobników po-

siadających allel C oraz obecność homozygot recesywnych.

Niemniej jednak, dokładna rola genu *FAM174A* nie została poznana, a uzyskane wy-

niki są pierwszym etapem badań nad przydatnością markerów genetycznych w typowaniu koni predysponowanych do wystąpienia syndromu metabolicznego.

### Literatura

- Blattmann P., Schuberth C., Pepperkok R., Runz H. (2013). RNAi-based functional profiling of loci from blood lipid genome-wide association studies identifies genes with cholesterol-regulatory function. *PLoS Genet.*, 9(2):e1003338; doi: 10.1371/journal.pgen.1003338. Epub 2013 Feb 28.
- Carter R.A., Geor R.J., Staniar W.B., Cubitt T.A., Harris P.A. (2009). Apparent adiposity assessed by standardised scoring systems and morphometric measurements in horses and ponies. *Vet. J.*, 179: 204–210.
- Dugdale A.H.A., Curtis G.C., Cripps P., Harri, P.A., Argo C.McG. (2010). Effect of dietary restriction on body condition, composition and welfare of overweight and obese pony mares. *Equine Vet. J.*, 42: 600–610. doi:10.1111/j.2042-3306.2010.00110.x.
- Frank N., Elliot S.B., Brandt L.E., Keisler D.H. (2006). Physical characteristics, blood hormone concentrations, and plasma lipid concentrations in obese horses with insulin resistance. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 228: 1383–1290.
- Frank N., Geor R.J., Bailey S.R., Durham A.E., Johnson P.J. (2010). Equine Metabolic Syndrome. *J. Vet. Int. Med.*, 24: 467–475; doi:10.1111/j.1939-1676.2010.0503.x.
- Henneke D.R., Potter G.D., Kreider J.L., Yeates B.F. (1983). Relationship between condition score, physical measurements and body fat percentage in mares. *Equine Vet. J.*, 15 (4): 371–372.
- Marycz K., Toker N.Y., Czogaa J., Michalak I., Nicpon J., Grzesiak J. (2013). An investigation of the elemental composition of horse hair affected by Equine Metabolic Syndrome (EMS) using SEM EDX and ICP-OES. *J. Anim. Vet. Adv.*, 12: 146–152.
- Lewis S.L., Holl H.M., Streeter C., Posbergh C., Schanbacher B.J., Place N.J., Mallicote M.F., Long M.T., Brooks S.A. (2017). Genomewide association study reveals a risk locus for equine metabolic syndrome in the Arabian horse. *J. Anim. Sci.*, 95 (3): 1071–1079; doi: 10.2527/jas.2016.1221.
- Treiber K.H., Kronfeld D.S., Hess T.M., Byrd B.M., Splan R.K., Staniar W.B. (2006). Evaluation of genetic and metabolic predispositions and nutritional risk factors for pasture-associated laminitis in ponies. *J. Am. Vet. Me.d Assoc.*, 228 (10): 1538–1845.

## VARIANT IDENTIFICATION IN *FAM14A* GENE REGION POTENTIALLY ASSOCIATED WITH THE OCCURRENCE OF EQUINE METABOLIC SYNDROME (EMS) IN PUREBRED ARABIAN HORSES

### Summary

Equine metabolic syndrome (EMS) is associated with obesity, insulin resistance and secondary laminitis. The diagnosis is often difficult and based on phenotypic observations and diagnostic tests which are often difficult to perform. Recently discovered genetic markers near candidate gene *FAM174A* strongly associated with elevated insulin levels, triglycerides, BCS commonly used to diagnose EMS. The exact role of *FAM174A* in horses remains unknown but findings suggest that it may play a role in cholesterol homeostasis. The purpose of the study was to estimate the frequency of the occurrence of the C allele in BIEC2-26354 near *FAM174A* gene elite population of Arabian horses. The analysis was performed on 89 horses (62 mares and 27 stallions). The *FAM174A* genotypes were identified by Sanger sequencing method. The obtained results showed the highest frequency of CT genotype (51.6%). 16.8% CC recessive homozygotes were identified. The obtained results are the first step for evaluation of EMS genetic markers in Polish population of Arabian horses.

**Key words:** EMS, *FAM14A*, Arabian Purebred, metabolic syndrome