

## Klinische und genetische Befunde bei einem männlichen Freiburger mit der neuen Fellfarbe Macchiato

M. Blatter<sup>1,2</sup>, B. Haase<sup>3</sup>, V. Gerber<sup>1</sup>, P.-A. Poncet<sup>2</sup>, T. Leeb<sup>4,5</sup>, S. Rieder<sup>2</sup>, D. Henke<sup>6</sup>, F. Janett<sup>7</sup>, D. Burger<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut Suisse de Médecine Equine, ALP-Haras und Universität Bern, <sup>2</sup>Schweizerisches Nationalgestüt, ALP-Haras, Avenches, <sup>3</sup>Faculty of Veterinary Science, University of Sydney, Sydney, Australien, <sup>4</sup>Institut für Genetik, Vetsuisse-Fakultät, Universität Bern, <sup>5</sup>DermFocus, Universität Bern, <sup>6</sup>Abteilung für Neurologie, Vetsuisse-Fakultät, Universität Bern, <sup>7</sup>Klinik für Reproduktionsmedizin, Vetsuisse-Fakultät, Universität Zürich

### Zusammenfassung

Im April 2008 wurde ein Freiburger Hengstfohlen mit einer ungewöhnlichen gescheckten Fellfarbe geboren, welche in dieser Form bisher in dieser Population noch nie beobachtet worden war. Das Fohlen hatte ausgedehnte weisse Abzeichen an Körper und Gliedmassen, einen weissen Kopf und blaue Augen. Da beide Elterntiere eine normale braune Fellfarbe haben, wurde beim Hengstfohlen eine *de novo* Mutation vermutet. Eine Kandidatengen-Untersuchung zeigte denn auch eine spontane Mutation im Gen für den Mikrophthalmie-assoziierten Transkriptionsfaktor (*MITF*). Eine 2010 durchgeführte detaillierte klinische Untersuchung ergab Hinweise auf eine beeinträchtigte Hörfunktion. Da bekannt ist, dass beim amerikanischen Paint Horse grossflächige weisse Abzeichen am Kopf in Kombination mit blauen Augen mit Taubheit verbunden sind, wurde das Hörvermögen des Hengstes durch Ableitung akustisch evozierter Hirnstammpotential (AEP) genauer abgeklärt. Diese Untersuchung bestätigte das Vorliegen einer bilateralen Taubheit beim untersuchten Pferd. Es wird angenommen, dass ein durch die *MITF* Gen-Mutation ausgelöster Melanozyten-Mangel Ursache für die Taubheit ist. Infolge Kastration des Pferdes kann die kausale Assoziation zwischen der *MITF* Gen-Mutation und den klinischen Befunden bei Nachkommen des Pferdes nicht mehr bestätigt werden.

Schlüsselwörter: Pferd, genetische Mutation, *MITF* Gen, Farbverdünnung, Taubheit

### Clinical evaluation of the new coat colour macchiato in a male Franches-Montagnes horse

In April 2008 a Franches-Montagnes colt was born with an unusual coat colour phenotype which had never been observed in that population before. The foal showed extended white markings on body and legs, a white head and blue eyes. As both parents have an unremarkable bay coat colour phenotype, a *de novo* mutation was expected in the offspring and a candidate gene approach revealed a spontaneous mutation in the microphthalmia associated transcription factor gene (*MITF*). A detailed clinical examination in 2010 indicated an impaired hearing capacity. As in the American Paint Horse large white facial markings in combination with blue eyes are associated with deafness, the hearing capacity of the stallion was closer examined performing brainstem auditory-evoked responses (BAER). The BAER confirmed bilateral deafness in the Franches-Montagnes colt. It is assumed that the deafness is caused by a melanocyte deficiency caused by the *MITF* gene mutation. Unfortunately, due to castration of the horse, the causal association between the mutation in the *MITF* gene and clinical findings cannot be confirmed by experimental matings.

Keywords: horse, genetic mutation, *MITF* gene, coat colour dilution, deafness

## 230 Fallberichte/Case reports

### Einleitung

Variationen der Fellfarben von Pferden und anderen Tierarten werden häufig durch Mutationen in Genen verursacht, welche die Entwicklung, Reifung und Migration der Melanozyten betreffen. Melanozyten entwickeln sich aus pluripotenten Zellen der Neuralleiste. Diese Vorläuferzellen differenzieren sich unter anderem in Melanozyten, proliferieren und migrieren dann in die Dermis, die Choroidea des Auges, die Iris, die Leptomeningen und die Stria vascularis der Cochlea im Innenohr. Neben der Fellpigmentation sind Melanozyten auch entscheidend für das Hörvermögen. Pigment-assoziierte Taubheit resultiert aus der Abwesenheit von Melanozyten in der Stria vascularis des Innenohres. Diese führt zur Degeneration des Blutgefässbettes in der äusseren Wand der Cochlea und infolge dessen gehen die Rezeptorzellen für akustische Impulse, die Haarzellen, ebenfalls zugrunde (Steel und Barkway, 1989; Tachibana, 1999). Taubheit in Assoziation mit einer veränderten Pigmentation (grossflächige weisse Abzeichen an den Beinen und am Kopf mit blauen Augen) wurde kürzlich beim amerikanischen Paint Horse und beim Quarter Horse von Magdesian *et al.* (2009) und Hauswirth *et al.* (2012) beschrieben. Hingegen wurde bei Mutationen, welche eine Farbverdünnung verursachen (Mariat *et al.*, 2003; Cook *et al.*, 2008), bisher noch nie von Veränderungen des Hörvermögens oder von anderen pathologischen Zuständen berichtet.

### Fallbeschreibung

#### Anamnese

Im April 2008 wurde ein Hengstfohlen der Freibergerrasse mit einer ungewöhnlichen gescheckten Fellfarbe geboren. Das Fohlen hatte vier weisse Gliedmassen, ein weisses Abdomen, grossflächige weisse Abzeichen am Kopf und blaue Augen (Abb. 1 und 2). Die Fellfarbe schien eine



Abbildung 1: Zweijähriger männlicher Freibergerrassehengst mit vier weissen Gliedmassen, weissem Abdomen, weissem Kopf und blauen Augen.



Abbildung 2: Zweijähriger Freibergerrassehengst mit weissem Kopf und blauen Augen.

Kombination von ausgeprägten weissen Abzeichen und einer Farbverdünnung zu sein. Soweit den Autoren bekannt, wurde diese Fellfarbe bisher nie in der Pferdepopulation beobachtet, sie wurde Macchiato genannt.

#### Genetische Untersuchung

Die Sequenzierung von Kandidatengenen, die bei weissen Abzeichen oder bei Farbverdünnung eine Rolle spielen, identifizierte eine spontane sinnverändernde Mutation im Exon 6 des Gens für den Mikrophthalmie-assoziierten Transkriptionsfaktor (*MITF*) (Hauswirth *et al.*, 2012).

#### Klinische Untersuchung

Bei einer im März 2010 durchgeführten detaillierten klinischen Untersuchung wurden ausser der ungewöhnlichen Fellfarbe und der blauen Iris keine speziellen Befunde erhoben. Eine ophthalmologische Untersuchung war unauffällig. Hingegen wurde eine im Vergleich zu einem simultan untersuchten gesunden Pferd verzögerte Reaktion auf Lärm beobachtet.

#### Untersuchung des Hörvermögens

Zur Evaluation des Hörvermögens des Hengstes wurden im April 2010 akustisch evozierte Hirnstammpotential (AEP) aufgezeichnet (Aleman *et al.*, 2008). Bei dieser Untersuchung wurden als Antwort auf einen auditiven Stimulus direkt im äusseren Gehörgang über subkutan am Kopf platzierte Elektroden elektrische Spannungen, die aus der Fortleitung des akustischen Signals resultieren, abgeleitet. Die daraus resultierenden Kurven können bestimmten Komponenten der peripheren und zentralen Hörbahn zugeordnet werden. Im Gegensatz zu gesunden Pferden konnten während der Untersuchung des Freibergerrassehengstes weder bei der Stimulation des linken noch des rechten Ohrs Potentiale abgeleitet werden, was bestätigte, dass der Hengst bilateral taub war.

## Andrologische Untersuchung und Fruchtbarkeit

Im März 2010 wurde auch eine andrologische Untersuchung durchgeführt. Um die extragonadalen Spermien-Reserven zu stabilisieren, wurde der Hengst während 5 Tagen täglich abgesamt. Drei Tage später wurde eine spermatologische Untersuchung vorgenommen. Dabei betrug das gelfreie Ejakulatsvolumen 6.5 ml, die Spermiedichte 157.7 Millionen Spermien/ml, die Gesamtspermienzahl 1'025 Millionen Spermien, die progressive Motilität 25 % und der Anteil an morphologisch normalen Spermien 30 %. Adspektion, Palpation und Grösse der Hoden waren unauffällig. Bei der Nachuntersuchung im Frühjahr 2011 konnte eine zunehmende Verschlechterung der Samenqualität beobachtet werden, und der Hengst wurde als nicht zuchttauglich beurteilt. In den Jahren 2010 und 2011 deckte der Hengst im Natursprung 2 Stuten mehrmals erfolglos, weshalb er schliesslich kastriert wurde.

## Blutuntersuchung

Weiter wurde im März 2010 eine Blutuntersuchung (Diavet-Labor AG, Bäch) durchgeführt. Die hämatologischen und biochemischen Untersuchungen waren ohne besondere Befunde.

## Diskussion

Aus der Erforschung von Krankheiten bei Menschen, Pferden, Hunden und Katzen sowie aus der Grundlagenforschung bei Mäusen ist bekannt, dass Mutationen von verschiedenen Genen Phänotypen mit weissen Abzeichen und mit einem erhöhten Risiko für Taubheit verursachen. Beim Menschen sind zwei ähnliche Krankheiten bekannt, die durch Gen-Mutationen ausgelöst werden und zu Taubheit und Hypopigmentierung von Haut und Haaren führen: Das Waardenburg-Syndrom, welches vier Subtypen aufweist, und das Tietz-Syndrom. Der Subtyp 2 vom Waardenburg-Syndrom und das Tietz-Syndrom werden durch Mutationen des *MITF* Genes verursacht. Mutationen, welche die DNA-Bindungsstelle von *MITF* wie beim beschriebenen Freiburgerhengst betreffen, verursachen beim Menschen typischerweise das mit schlimmeren Symptomen einhergehende Tietz-Syndrom (Smith et al., 2000).

Die Farbverdünnung, die ausgeprägten weissen Abzeichen an den Beinen und am Kopf, die blauen Augen sowie die Taubheit des beschriebenen Hengstes sind mit grosser Wahrscheinlichkeit mit einem Melanozyten-Mangel infolge der *de novo* Mutation im Exon 6 des *MITF* Gens assoziiert. Melanozyten sind für ein normales Hörvermögen unerlässlich und befinden sich in der gefässreichen Zone (Stria vascularis) der Cochlea im Innenohr. Die Stria vascularis ist im Rahmen der Modulation der chemischen Zusammensetzung (insbe-

sondere Kalium-Konzentration) der Endolymphe sehr wichtig. Es wird vermutet, dass die infolge der beschriebenen Mutation des *MITF* Gens in zu kleiner Anzahl vorliegenden Melanozyten das Kalium-Gleichgewicht in der Endolymphe nicht mehr gewährleisten können. Dadurch kommt es zu einem fehlenden K<sup>+</sup>-Potential, und als Folge dessen zu einer Degeneration der Stria vascularis mit Funktionsverlust der Rezeptorzellen (Haarzellen) und konsekutiver Taubheit (Steel und Barkway, 1989).

Auch Magdesian et al. (2009) haben beim amerikanischen Paint Horse über Taubheit im Zusammenhang mit einer veränderten Pigmentation (grossflächige weisse Abzeichen an Gliedmassen und Kopf, blaue Iris, auch als «splashed white» bezeichnet) berichtet. Im Gegensatz zu unserem Hengst wiesen 91 % der von Taubheit betroffenen Pferde zusätzlich die frame overo Mutation im Gen des Endothelin B-Rezeptors (*EDNRB*) auf. Mutationen im *EDNRB* Gen können ebenso wie Mutationen im *KIT* und/oder *MITF* Gen Phänotypen mit grossflächigen weissen Abzeichen auslösen (Metallinos et al., 1998; Rieder, 2009; Bellone, 2010; Hauswirth et al., 2012).

Der Name des *MITF* Gens stammt aus der Grundlagenforschung an Mäusen (Moore, 1995), bei denen Mutationen des Gens zu kleinen Augen, Retina-Degeneration, Hypopigmentierung, Abnormalitäten des Innenohrs (Taubheit), Problemen bei der Knochenresorption (Osteopetrose) und einer reduzierten Anzahl an Mast- und natürlichen Killerzellen führten. Unser Freiburgerhengst mit der bekannten Hypopigmentierung und Taubheit wurde sorgfältig auf andere mögliche *MITF* Gen-assoziierte Symptome untersucht. Eine ophthalmologische Untersuchung war vollständig unauffällig, und auch die hämatologische und biochemische Untersuchung ergab keine besonderen Befunde.

Infolge der Kastration des Hengstes kann eine mögliche kausale Assoziation zwischen der Mutation im *MITF* Gen und den klinischen Befunden nicht mit experimentellen Anpaarungen beziehungsweise Untersuchungen der Nachkommen bestätigt werden. Weiter ist unklar, ob die schlechte Samenqualität und Fruchtbarkeit direkte Folgen der Mutation im *MITF* Gen waren oder ob andere Faktoren wie das Alter des Hengstes oder die Gesundheit der Geschlechtsorgane der Stuten eine Rolle spielten. Bei Mäusen mit verschiedenen Mutationen des *MITF* Gens ist eine Beeinträchtigung der Fruchtbarkeit beschrieben (Steingrimsson et al., 2004).

Schlussfolgernd kann gesagt werden, dass die neu aufgetretene Farbaufhellung Macchiato mit einer Taubheit des betroffenen Tieres vergesellschaftet war. Klinische Abklärungen im Rahmen von neuen offensichtlichen genetischen Mutationen sind von grosser Wichtigkeit, nicht zuletzt im Sinne des Tierschutzes und ethischer Gesichtspunkte. Die bewusste Selektion von Tieren mit Verlusten von arttypischen Sinnen ist grundsätzlich abzulehnen (Poncet et al., 2011).

**232 Fallberichte/Case reports****Literatur**

Aleman, M., Puchalski, S. M., Williams, D. C.: Brainstem auditory-evoked responses in horses with temporohyoid osteoarthropathy. *J. Vet. Intern. Med.* 2008, 22, 1196–1202.

Bellone, R. R.: Pleiotropic effects of pigmentation genes in horses. *Anim. Genet.* 2010, 41 Suppl. 2: 100–110.

Cook, D., Brooks, S., Bellone R., Bailey, E.: Missense Mutation in Exon 2 of SLC36A1 Responsible for Champagne Dilution in Horses. *PLoS Genet.* 2008, 4: e1000195.

Hauswirth, R., Haase, B., Blatter, M., Brooks, S. A., Burger, D., Drögemüller C., Gerber V., Henke D., Janda J., Jude R., Magdesian K. G., Matthews J. M., Poncet P. A., Svansson V., Tozaki T., Wilkinson-White L., Penedo M. C. T., Rieder S., Leeb T.: Mutations in MITF and PAX3 Cause “Splashed White” and Other White Spotting Phenotypes in Horses. *PLoS Genet.* 2012, 8: e1002653.

Magdesian, K. G., Williams, D. C., Aleman, M., LeCouteur, R. A., Madigan, J. E.: Evaluation of deafness in American Paint Horses by phenotype, brainstem auditory-evoked responses, and endothelin receptor B genotype. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2009, 235: 1204–1211.

Mariat, D., Taourit, S., Guérin, G.: A mutation in the MATP gene causes the cream coat colour in the horse. *Genet. Sel. Evol.* 2003, 35: 119–133.

Metallinos D. L., Bowling A. T., Rine J.: A missense mutation in the endothelin-B receptor gene is associated with Lethal White Foal Syndrome: an equine version of Hirschsprung disease. *Mamm. Genome.* 1998, 9: 426–431.

Moore, K. J.: Insight into the microphthalmia gene. *Trends Genet.* 1995, 11, 442–448.

Poncet P. A., Bachmann I., Burger D., Ceppi A., Friedli K., Klopfenstein S., Maiatsky M., Rieder S., Rubli S., Rüegg P., Trolliet C. F.: Überlegungen zu Ethik und Pferd. Denkanstösse aus ethischer Sicht im Hinblick auf einen besseren Schutz der Würde

und des Wohlergehens von Pferden, Bericht des Observatoriums der schweizerischen Pferdebranche, 2011, Avenches.

Rieder, S.: Molecular tests for coat colours in horses. *J. Anim. Breed. Genet.* 2009, 126, 415–424.

Smith, S. D., Kelley, P. M., Kenyon, J. B., Hoover, D.: Tietz syndrome (hypopigmentation/deafness) caused by mutation of MITF. *J. Med. Genet.* 2000, 37, 446–448.

Steel, K. P. and Barkway, C.: Another role for melanocytes: their importance for normal stria vascularis development in the mammalian inner ear. *Development.* 1989, 107: 453–463.

Steingrimsson, E., Copeland N. G., Jenkins N. A.: Melanocytes and the Microphthalmia Transcription Factor Network. *Ann. Rev. Genet.* 2004, 38, 365–411.

Tachibana, M.: Sound needs sound melanocytes to be heard. *Pigment Cell. Res.* 1999, 12: 344–354.

**Korrespondenz**

Dr. med. vet. Marlis Blatter  
Pferdeklinik in Kirchheim  
Nürtinger Strasse 200  
73230 Kirchheim/Teck  
Deutschland  
Tel.: +41 (0)76 530 09 22  
Fax: +49 (0)7021 81154  
marlisblatter@hotmail.com

Manuskripteingang: 3. August 2012

Angenommen: 22. August 2012