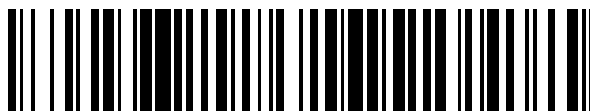


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 465 140**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.05.2012 E 12747875 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.04.2014 EP 2542702**

54 Título: **Método para predecir el patrón de locomoción en caballos**

30 Prioridad:

05.05.2011 SE 1130034
03.08.2011 US 201161514749 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.06.2014

73 Titular/es:

CAPILET GENETICS AB (100.0%)
Öster Skogsta 1
725 93 Västerås, SE

72 Inventor/es:

ANDERSSON, LISA S;
ANDERSSON, LEIF y
LINDGREN, GABRIELLA

74 Agente/Representante:

ES 2 465 140 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para predecir el patrón de locomoción en caballos

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a métodos para predecir el patrón de locomoción en caballos incluyendo la capacidad de un caballo de usar aires diferentes y la capacidad de trotar o pasear a una velocidad rápida. Los métodos comprenden determinar en una muestra de ADN obtenida de un caballo el alelo de al menos un marcador genético, en el que dicho al menos un marcador genético se ubica en el cromosoma 23 de caballo, estando dicho marcador asociado con la capacidad de usar aires diferentes.

Antecedentes

Los caballos muestran una variación considerable en su patrón de locomoción tanto dentro de como entre las razas. Los tres aires básicos en caballos son paso, trote y galope. Los caballos usan estos aires diferentes según su velocidad, el paso se usa a velocidad lenta, el trote es un modo más rápido de locomoción y el galope es el aire que los caballos usan normalmente para correr rápido. Sin embargo, algunos caballos tienen la capacidad de usar también aires alternativos, por ejemplo paseo y tölt, y tales caballos se denominan caballos de paso. Un caballo que pasea mueve las dos patas en el mismo lado en un movimiento lateral a diferencia de un caballo que trotar que hace un movimiento diagonal en el que las patas traseras y delanteras diagonales se mueven hacia delante y hacia atrás juntas. Además, los caballos islandeses pueden realizar un quinto aire denominado tölt, que es un aire de cuatro ritmos con el mismo patrón de caída de pata que el paso. Un rasgo característico del tölt es que el caballo entonces siempre tiene al menos un casco tocando el suelo, dando un aire muy suave. Ejemplos de otros aires alternativos similares, también conocidos como aires amblados, son el fox trot, el rack, el running walk y el paso corto. Los aires alternativos varían en el patrón, la sincronización y la cadencia de caída de pata, y pueden dividirse en general en cuatro categorías: paseo, ambladura de ritmo regular, ambladura lateral y ambladura diagonal. La tabla 1 proporciona una clasificación de razas como caballos de paso o no de paso. La mayoría de las razas de caballos son de hecho no de paso y sólo se listan ejemplos representativos de tales razas en la tabla. Los caballos que representan razas clasificadas como no de paso nunca o raramente pueden realizar los aires alternativos mientras la mayoría de o todos los caballos de las razas de paso pueden realizar aires alternativos. Hay más razas de paso por todo el mundo además de las listadas en la tabla 1. A veces, hay una variación considerable también dentro de las razas con respecto al patrón de locomoción. Por ejemplo, los caballos islandeses se clasifican como de cuatro pasos o de cinco pasos, en los que los primeros pueden realizar paso, trote, galope y tölt mientras que los últimos también pueden pasear.

El caballo Standardbred, usado para carreras de trotones tiene una capacidad única de trotar o pasear a una velocidad muy rápida sin caer en galope que es el aire normal a alta velocidad para un caballo. En América del Norte, se ha desarrollado una subpoblación de caballos Standardbred que pasean a velocidad muy alta. Otras razas de caballos usadas para carreras de trotones incluyen razas como el trotón de sangre fría, caballos finlandeses, el trotón francés y el trotón Orlov.

El patrón de locomoción en caballos se encuentra bajo una fuerte selección en la cría de caballos. Por ejemplo, la capacidad de correr usando galope, trote y paseo se selecciona en caballos purasangre, trotones Standardbred y caballos de paso Standardbred, respectivamente. Los caballos con la capacidad de usar aires alternativos también son altamente deseados por algunos jinetes y es un rasgo sobre el cual se han desarrollado muchas razas especializadas. Los métodos para predecir el patrón de locomoción en un caballo, es decir su capacidad de usar aires diferentes, tendría por tanto una gran utilidad en la industria de la cría de caballos. El documento WO 2010/029527 da a conocer SNP predictivos del rendimiento de carrera de caballos.

Breve descripción de la invención

Los presentes inventores han identificado un locus genético en caballos que determina la capacidad del caballo de usar aires diferentes y la capacidad de trotar a una velocidad rápida. Se encontró un codón de terminación prematuro en el gen para el factor de transcripción 3 relacionado con doublesex y mab-3 (DMRT3) en todos los caballos sometidos a prueba con la capacidad de realizar aires alternativos. Los caballos mutantes expresan una proteína DMRT3 truncada que carece de los últimos 174 residuos de aminoácido pero mantiene un dominio de unión a ADN funcional. DMRT3 se expresa en un subconjunto de neuronas en la médula espinal del caballo.

Por consiguiente, la presente invención proporciona métodos para predecir el patrón de locomoción en caballos incluyendo la capacidad de un caballo de usar aires diferentes, la capacidad de trotar o pasear a una velocidad rápida y la capacidad de realizar el adiestramiento.

Un primer aspecto de la invención proporciona métodos para predecir el patrón de locomoción en caballos incluyendo la capacidad de un caballo de usar aires alternativos, la capacidad de trotar a una velocidad rápida y la capacidad de realizar el adiestramiento que comprende extraer proteína de una muestra obtenida de un caballo. Los

métodos comprenden además determinar en dicha muestra de proteína la presencia o ausencia de una forma truncada de la proteína DMRT3. La proteína DMRT3 puede ser una proteína DMRT3 truncada en la posición de aminoácido 300 correspondiente a la proteína SEQ ID NO: 4. La determinación puede hacerse mediante el uso de un método inmunoquímico, tal como inmunotransferencia de tipo Western, usando un anticuerpo anti-DMRT3.

Un segundo aspecto de la invención proporciona métodos para predecir el patrón de locomoción en caballos incluyendo la capacidad de un caballo de usar aires alternativos, la capacidad de trotar a una velocidad rápida y la capacidad de realizar el adiestramiento que comprende extraer ADN de una muestra obtenida de un caballo. Los métodos comprenden además determinar en dicho ADN el alelo de al menos un marcador genético, en el que dicho al menos un marcador genético se ubica en la región entre los SNP flanqueantes en las posiciones de nucleótido 22.628.976 (correspondiente a la posición 51 en SEQ ID NO: 6) y 23.315.071 (correspondiente a la posición 51 en SEQ ID NO: 7) en el cromosoma 23 de caballo.

El marcador genético puede seleccionarse de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) e inserción/delecciones (INDELS).

Preferiblemente, el marcador genético se selecciona de los marcadores genéticos listados en las tablas 4, 5, 7 y 8.

Preferiblemente, el marcador genético se ubica en la región entre los SNP flanqueantes en las posiciones de nucleótido 22.919.878 y 23.011.289 en el cromosoma 23 de caballo.

Preferiblemente, el marcador genético se selecciona de los marcadores genéticos listados en la tabla 8.

Lo más preferiblemente, el marcador genético se ubica en la posición 22.999.655 en el cromosoma 23 de caballo, correspondiente a la posición 939 en SEQ ID NO: 1.

Más específicamente, los métodos pueden comprender identificar en dicho ADN el nucleótido en una o más posición/posiciones específica(s) seleccionada(s) de las posiciones 22.919.878; 22.920.361; 22.920.434; 22.920.646; 22.920.717; 22.921.203; 22.922.079; 22.922.780; 22.923.569; 22.924.120; 22.924.142; 22.924.299; 22.924.380; 22.924.407; 22.926.098; 22.926.188; 22.926.872; 22.927.387; 22.927.607; 22.928.220; 22.928.537; 22.928.587; 22.929.137; 22.930.011; 22.932.024; 22.932.895; 22.933.218; 22.936.034; 22.940.759; 22.942.423; 22.945.643; 22.946.599; 22.948.774; 22.949.055; 22.949.108; 22.949.240; 22.949.710; 22.956.846; 22.960.132; 22.960.528; 22.960.710; 22.964.042; 22.965.059; 22.967.119; 22.967.656; 22.967.915; 22.968.898; 22.973.984; 22.974.589; 22.979.124; 22.980.014; 22.982.879; 22.984.588; 22.985.746; 22.988.210; 22.988.991; 22.993.092; 22.994.591; 22.999.058; 22.999.655; 23.002.606; 23.003.956; 23.008.772; 23.008.789; 23.009.648; 23.010.164; y 23.011.289, en el cromosoma 23 de caballo.

Lo más preferiblemente, los métodos comprenden identificar en dicho ADN el nucleótido en la posición específica 22.999.655 en el cromosoma 23 de caballo.

Más específicamente, los métodos pueden comprender determinar en dicho ADN la presencia o ausencia de:

- i) el nucleótido C en una posición de nucleótido correspondiente a la posición 939 en SEQ ID NO: 1,
- ii) el nucleótido A en una posición de nucleótido correspondiente a la posición 939 en SEQ ID NO: 3,
- iii) el nucleótido C y/o T en una posición de nucleótido correspondiente a la posición 51 en SEQ ID NO: 5,
- iv) el nucleótido A y/o G en una posición de nucleótido correspondiente a la posición 51 en SEQ ID NO: 6,
- v) el nucleótido C y/o T en una posición de nucleótido correspondiente a la posición 51 en SEQ ID NO: 7,
- vi) el nucleótido G y/o C en una posición de nucleótido correspondiente a la posición 51 en SEQ ID NO: 8,
- vii) el nucleótido A y/o G en una posición de nucleótido correspondiente a la posición 51 en SEQ ID NO: 9,
- viii) el nucleótido T y/o G en una posición de nucleótido correspondiente a la posición 51 en SEQ ID NO: 10,
- ix) el nucleótido T y/o C en una posición de nucleótido correspondiente a la posición 51 en SEQ ID NO: 11,
- x) el nucleótido C y/o T en una posición de nucleótido correspondiente a la posición 51 en SEQ ID NO: 12,
- xi) el nucleótido A y/o G en una posición de nucleótido correspondiente a la posición 51 en SEQ ID NO: 13,
- xii) el nucleótido A y/o C en una posición de nucleótido correspondiente a la posición 51 en SEQ ID NO: 14,

xiii) el nucleótido G y/o C en una posición de nucleótido correspondiente a la posición 51 en SEQ ID NO: 15,
xiv) el nucleótido C y/o T en una posición de nucleótido correspondiente a la posición 51 en SEQ ID NO: 16,
5 xv) el nucleótido G y/o A en una posición de nucleótido correspondiente a la posición 51 en SEQ ID NO: 17,
xvi) el nucleótido G y/o C en una posición de nucleótido correspondiente a la posición 51 en SEQ ID NO: 18,
xvii) el nucleótido C y/o A en una posición de nucleótido correspondiente a la posición 51 en SEQ ID NO: 19,
10 xviii) el nucleótido T y/o C en una posición de nucleótido correspondiente a la posición 51 en SEQ ID NO: 20,
xix) el nucleótido C y/o T en una posición de nucleótido correspondiente a la posición 51 en SEQ ID NO: 21,
15 xx) el nucleótido C y/o T en una posición de nucleótido correspondiente a la posición 51 en SEQ ID NO: 22,
xxi) el nucleótido C y/o A en una posición de nucleótido correspondiente a la posición 51 en SEQ ID NO: 23,
xxii) el nucleótido C y/o G en una posición de nucleótido correspondiente a la posición 51 en SEQ ID NO: 24,
20 xxiii) el nucleótido A y/o T en una posición de nucleótido correspondiente a la posición 51 en SEQ ID NO: 25.

Preferiblemente, los métodos comprenden determinar en dicho ADN la presencia o ausencia de:

25 i) el nucleótido C en una posición de nucleótido correspondiente a la posición 939 en SEQ ID NO: 1,
ii) el nucleótido A en una posición de nucleótido correspondiente a la posición 939 en SEQ ID NO: 3,
iii) el nucleótido C y/o T en una posición de nucleótido correspondiente a la posición 51 en SEQ ID NO: 5,
30 iv) el nucleótido C y/o T en una posición de nucleótido correspondiente a la posición 51 en SEQ ID NO: 7,
v) el nucleótido T y/o C en una posición de nucleótido correspondiente a la posición 51 en SEQ ID NO: 20,
35 vi) el nucleótido C y/o T en una posición de nucleótido correspondiente a la posición 51 en SEQ ID NO: 21,
vii) el nucleótido C y/o T en una posición de nucleótido correspondiente a la posición 51 en SEQ ID NO: 22,
viii) el nucleótido C y/o A en una posición de nucleótido correspondiente a la posición 51 en SEQ ID NO: 23,
40 ix) el nucleótido C y/o G en una posición de nucleótido correspondiente a la posición 51 en SEQ ID NO: 24,
x) el nucleótido A y/o T en una posición de nucleótido correspondiente a la posición 51 en SEQ ID NO: 25.

45 Lo más preferiblemente, los métodos comprenden determinar en dicho ADN la presencia o ausencia de:

i) el nucleótido C en una posición de nucleótido correspondiente a la posición 939 en SEQ ID NO: 1 o
50 ii) el nucleótido A en una posición de nucleótido correspondiente a la posición 939 en SEQ ID NO: 3.

El caballo puede seleccionarse de cualquier caballo o raza de caballos que pertenezcan a la especie *Equus caballus*. Ejemplos de razas de caballos pueden encontrarse en la tabla 1.

55 **Tabla 1.** Clasificación de razas de caballos como de paso o no de paso, en los que los caballos de paso tienen la capacidad de realizar aires alternativos además de los tres aires básicos paso, trote y galope.

Raza	Clasificación
Silla Americano	de paso
Campolina	de paso
Caballo Islandés	de paso
Caballo Silla de la Montaña de Kentucky	de paso
Mangalarga Marchador	de paso
Caballo Marwari	de paso
Foxtrotter de Missouri	de paso
Paso Fino	de paso
Paso Peruano	de paso

Caballo Racking	de paso
Caballo Rocky Mountain	de paso
Caballo Pinto de Silla	de paso
Standardbred *	de paso
De Paso de Tennessee	de paso
Walkaloosa	de paso
Akhal-Teké	no de paso
Caballo American Paint	no de paso
Andaluz	no de paso
Árabe	no de paso
Belga	no de paso
Dole	no de paso
Poni Exmoor	no de paso
Frisón	no de paso
Haflinger	no de paso
Hannoveriano	no de paso
Lusitano	no de paso
Caballo de tiro Sueco del Norte	no de paso
Fjord noruego	no de paso
Caballo Cuarto de Milla	no de paso
Silla Francés	no de paso
Poni de las Shetland	no de paso
Suffolk Punch	no de paso
Purasangre	no de paso
Trakehner	no de paso

*Dos poblaciones separadas, caballos de paso y trotones, muchos trotones parecen poder realizar tölt.

Según un aspecto de la invención, los métodos según la presente invención pueden usarse para la prueba de paternidad de caballos.

- 5 Se contempla que cualquier método o composición descrito/a en el presente documento puede implementarse con respecto a cualquier otro método o composición descrito/a en el presente documento. El uso de la palabra "un" o "una" cuando se usa junto con el término "que comprende" en las reivindicaciones y/o la memoria descriptiva puede significar "uno", pero también es compatible con el significado de "uno o más", "al menos uno" y "uno o más de uno".
- 10 Estas y otras realizaciones de la invención se apreciarán y se entenderán mejor cuando se consideren junto con la siguiente descripción y los dibujos adjuntos. Sin embargo, debe entenderse que la siguiente descripción, aunque indica diversas realizaciones de la invención y numerosos detalles específicos de la misma, se da a modo de ilustración y no de limitación. Pueden realizarse muchas sustituciones, modificaciones, adiciones y/o cambios dentro del alcance de la invención sin apartarse del espíritu de la misma, y la invención incluye todas las sustituciones, modificaciones, adiciones y/o cambios de ese tipo.

15 Leyendas de las figuras

Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar adicionalmente determinados aspectos de la presente invención. La invención puede entenderse mejor con referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de realizaciones específicas presentadas en el presente documento.

25 Figura 1. Resultados del análisis del genoma completo de 70 caballos islandeses clasificados como de cuatro pasos o de cinco pasos. El SNP altamente asociado en la posición de nucleótido de par de bases Cr23:22.967.656 se marca mediante una flecha.

30 Figura 2. Región genómica que alberga el locus *Gait* en el cromosoma 23 que controla el patrón de locomoción en caballos. El gen *DMRT3* no está anotado de manera apropiada en este conjunto pero se representa mediante el transcrito Ensembl ENSECAT00000025062 indicado mediante una flecha en esta figura. La figura está adaptada a partir de un resultado del navegador genómico UCSC (www.genome.ucsc.edu).

Figura 3. Alineación de nucleótidos y aminoácidos para los codones 296 a 306 de *DMRT3* de caballo incluyendo el codón 301 en el que se produce una mutación sin sentido en el alelo asociado con la capacidad de pasear.

35 Figura 4. Alineación de aminoácidos 249 a 331 (numerados según la secuencia de caballo) en la proteína DMRT3 de diferentes especies de vertebrados incluyendo la forma de tipo natural (WT) y mutante (MUT) de la proteína DMRT3 de caballo. "." indica hueco en la alineación; "-" indica identidad con la secuencia maestra usada (ganado); * indica la mutación sin sentido en el codón 301 en el alelo mutante de caballo.

Figura 5. Presentación esquemática de las formas de tipo natural y mutante (*gait*) predichas de la proteína DMRT3 en caballos. DM= módulo de unión a ADN de tipo dedo de zinc. DMA= dominio de proteína de función desconocida presente en proteínas DMRT.

Figura 6. EMSA que usa un oligonucleótido que representa un motivo de unión a DMRT3 y proteínas de tipo natural y mutante DMRT3 etiquetadas con myc traducidas *in vitro*. Se demostraron grandes desplazamientos usando un anticuerpo anti-myc (que reconoce ambas formas) o con un anticuerpo anti-DMRT3 que reconoce la parte C-terminal de la proteína de tipo natural, pero no la forma truncada. También se usó un oligonucleótido correspondiente a un sitio de unión a DMRT1 y proporcionó resultados similares (datos no mostrados). Se añadió el oligonucleótido competitivo frío en un exceso de 150X. GS=desplazamiento en gel que representa el complejo entre la proteína DMRT3 y el oligonucleótido; SS=gran desplazamiento que representa el complejo entre el anticuerpo, la proteína DMRT3 y el oligonucleótido.

Descripción detallada de la invención

Los presentes inventores han demostrado que hay un locus, denominado en el presente documento *Gait*, en el cromosoma 23 de caballo que tiene un gran impacto sobre el patrón de locomoción en caballos. Los presentes resultados muestran que se requiere homocigosidad para un alelo recesivo en este locus para la capacidad de un caballo de pasear. Se postula que la mutación sin sentido en la posición de nucleótido 22.999.655 en el exón 2 del gen *DMRT3* es la mutación causante del alelo *Gait*. *DMRT3* es un gen altamente conservado presente en todos los vertebrados estudiados hasta el momento. La función de la proteína DMRT3 no se ha establecido por ningún estudio previo pero el hecho de que se expresa en el cerebro y en la médula espinal del ratón (MGI, www.informatics.jax.org) es compatible con un papel crítico para controlar la locomoción tal como se demuestra mediante el presente estudio. La mutación sin sentido subyacente al alelo *gait* puede naturalmente tener un efecto fenotípico sobre la condición heterocigótica ya que se produce en el último exón de *DMRT3* y se espera que codifique para una forma truncada de la proteína (SEQ ID NO: 4) que carece los últimos 174 aminoácidos (figura 5). El dominio DM de unión a ADN de DMRT3 se ubica en la parte N-terminal que se mantiene en la forma truncada (figura 5). Por tanto, la forma mutante de DMRT3 puede unirse a sus secuencias de ADN diana pero puede mostrar defectos con respecto a la interacción con otras proteínas requeridas para su función normal y por tanto puede tener un efecto negativo dominante en heterocigotos. Merece la pena observar que sólo uno de los caballos islandeses era homocigótico para el alelo de tipo natural (no de paseo) en el locus *Gait*.

Este estudio ha establecido un marcador genético que puede usarse para predecir la constitución genética de un caballo con respecto a su patrón de locomoción. Se ha predicho que el alelo *gait* está presente en la mayoría de, si no en todas, las razas de paso, algunas de las cuales se listan como de paso en la tabla 1 y puede aparecer a una baja frecuencia en otras razas también. El marcador también predice la capacidad de un caballo de trotar o pasear a una alta velocidad como se encuentra a una alta frecuencia en caballos usados para carreras de trotones. Además, se ha predicho que los caballos con al menos un alelo de tipo natural son mejores en concursos de salto, adiestramiento tradicional y la finalización de carreras a galope.

El patrón de locomoción determina la capacidad de un caballo de usar aires alternativos, así como la capacidad del caballo de trotar o pasear a una velocidad rápida, y su capacidad de realizar el adiestramiento. Los aires alternativos incluyen, paseo, y los aires amblados están ejemplificados por tölt, running walk, rack, clásico fino, paso corto, paso largo, paso ilano, sobreandando, fox trot.

Puede predecirse que un caballo que es homocigótico o heterocigótico para el alelo *gait* tiene la capacidad de usar aires alternativos y trotar a alta velocidad. Puede predecirse que un caballo que es homocigótico o heterocigótico para el alelo de tipo natural tiene mejor capacidad de realizar concursos de salto, adiestramiento y la finalización de carreras a galope.

La utilidad de esta invención en la industria de la cría de caballos incluye la determinación del genotipo de animales de cría potencial para maximizar la posibilidad de obtener una progenie con un patrón de locomoción favorecido. La información sobre el genotipo en el locus *DMRT3* también puede usarse por vendedores y compradores de caballos para predecir la capacidad del caballo realizar aires diferentes. Además, los métodos según la invención pueden usarse para introducir de manera eficaz el alelo *gait* en razas no de paso.

Según un aspecto de la invención, los métodos según la presente invención pueden usarse para seleccionar caballos para cría.

Por consiguiente, un aspecto de la invención proporciona métodos para seleccionar un caballo para cría, comprendiendo dichos métodos determinar en una muestra de ADN obtenida de dicho caballo el alelo de al menos un marcador genético, en el que dicho al menos un marcador genético se ubica en la región entre los SNP flanqueantes en las posiciones de nucleótido 22.628.976 en el cromosoma 23 de caballo. El marcador genético puede seleccionarse de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) e inserción/deleciones (INDELS).

Preferiblemente, el marcador genético se selecciona de los marcadores genéticos listados en las tablas 4, 5, 7 y 8.

Preferiblemente, el marcador genético se ubica en la región entre los SNP flanqueantes en las posiciones de nucleótido 22.919.878 y 23.011.289 en el cromosoma 23 de caballo.

Preferiblemente, el marcador genético se selecciona de los marcadores genéticos listados en la tabla 8.

Lo más preferiblemente, el marcador genético se ubica en la posición 22.999.655 en el cromosoma 23 de caballo, correspondiente a la posición 939 en SEQ ID NO: 1.

La prueba más fiable para determinar el genotipo en el locus *Gait* es determinar la presencia y/o ausencia de la mutación sin sentido en el exón 2 de *DMRT3* (posición de nucleótido 22.999.655 en el cromosoma 23, correspondiente a la posición de nucleótido 939 en SEQ ID NO: 3). Sin embargo, los marcadores genéticos ubicados en el intervalo entre los marcadores flanqueantes en las posiciones de nucleótido 22.628.976 y 23.315.071, y más específicamente los marcadores genéticos ubicados en el intervalo entre las posiciones 22.919.878 y 23.011.289, ejemplificados por los marcadores listados en la tabla 8, muestran una asociación más o menos fuerte al genotipo para el SNP causante en la posición de nucleótido 22.999.655 debido a la presencia de desequilibrio de ligamiento en la región. Por consiguiente, uno o más de estos marcadores, individualmente o en combinación, puede(n) usarse para determinar el genotipo en el locus *Gait*, y por consiguiente también puede(n) usarse en los métodos según la presente invención.

El término "muestra" o "muestra biológica" según la presente invención se refiere a cualquier material que contiene células nucleadas de dicho caballo que va a someterse a prueba. En una realización preferida, la muestra biológica que va a usarse en los métodos de la presente invención se selecciona del grupo que consiste en sangre, espermatozoides, raíces de pelo, leche, fluidos corporales así como tejidos que incluyen células nucleadas.

En la técnica se conocen ampliamente métodos de extracción, aislamiento y purificación de ADN y pueden aplicarse en la presente invención. Los protocolos convencionales para el aislamiento de ADN genómico se refieren entre otros a Sambrook, J., Russell, D. W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, tercera edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1.31-1.38, 2001 y Sharma, R.C., *et al.* "A rapid procedure for isolation of RNA-free genomic DNA from mammalian cells", *BioTechniques*, 14, 176-178, 1993.

Según la presente invención, el término "SNP" se refiere a un polimorfismo de un solo nucleótido en una posición particular en el genoma de caballo que varía entre una población de individuos. Los SNP pueden identificarse por su ubicación dentro de la secuencia particular dada a conocer, es decir dentro del intervalo de pares de bases 22.628.976 y 23.315.071 en el cromosoma 23 de caballo o su nombre tal como se muestra en las tablas 4, 5, 7 y 8. Los SNP identificados que son útiles para predecir la capacidad de un caballo de usar aires diferentes según la presente invención se muestran en las tablas 4, 5, 7 y 8. Por ejemplo, el SNP BIEC2-620109 de la tabla 5 indica que la base nucleotídica (o el alelo) en la posición de nucleótido 22.967.656 en el cromosoma 23 de la secuencia de referencia tal como se denomina en el presente documento puede ser o bien citosina (C) o bien timidina (T). El alelo asociado con o indicativo de que un caballo puede usar cinco pasos es en el caso de SNP BIEC2-620109 de la tabla 5 timidina (T).

La expresión "determinar en dicho ADN el alelo de al menos un marcador genético" según la presente invención se refiere a un método para determinar o identificar si una secuencia de nucleótidos particular está presente en una muestra de ADN.

La expresión "identificar en dicho ADN el nucleótido en una o más posiciones específicas en el cromosoma 23 de caballo" se refiere a un método para determinar la identidad del nucleótido en dicha posición específica en el cromosoma 23 de caballo, es decir para determinar si el nucleótido en dicha posición específica es adenina (A), citosina (C), guanina (G) o timidina (T).

Hay varios métodos conocidos por los expertos en la técnica para determinar si una secuencia de nucleótidos particular está presente en una muestra de ADN y para identificar el nucleótido en una posición específica en una secuencia de ADN. Estos incluyen la amplificación de un segmento de ADN que abarca el marcador genético por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o cualquier otro método de amplificación, interrogar el marcador genético por medio de la hibridación específica de alelo, el ensayo de 3' exonucleasa (ensayo Taqman), ensayo de PCR basado en colorante fluorescente y agente de extinción, el uso de enzimas de restricción específicas de alelo (técnicas basadas en RFLP), secuenciación directa, el ensayo de ligación de oligonucleótidos (OLA), pirosecuenciación, el ensayo invasor, minisequenciación, técnicas basadas en DHPLC, polimorfismo conformacional de cadenas sencillas (SSCP), PCR específica de alelo, electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE), electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE), escisión química por apareamiento erróneo (CMC), sistema basado en el análisis heterodúplex, técnicas basadas en espectroscopia de masas, ensayo por escisión invasiva, secuenciación de relación de polimorfismos (PRS), microalineamientos, un ensayo de extensión por círculo rodador, técnicas basadas en HPLC, ensayos basados en extensión, ARMS (sistema de mutación refractario a amplificación), ALEX (extensión lineal de mutación refractaria a amplificación), SBCE (extensión de

cadena de base única), ensayos de balizas moleculares, Invader (tecnologías Third Wave), ensayos de reacción en cadena de la ligasa, técnicas basadas en ensayo de 5'-nucleasa, electroforesis de red capilar (CAE) por hibridación, ensayos de truncamiento de proteínas (PTT), inmunoensayos e hibridación en fase sólida (transferencia puntual, transferencia puntual inversa, chips). Esta lista de métodos no pretende ser exclusiva, sino simplemente ilustrar la diversidad de métodos disponibles. Algunos de estos métodos pueden realizarse según los métodos de la presente invención en formato de microalineamientos (microchips) o en perlas.

Por tanto, la invención también se refiere al uso de cebadores o pares de cebadores, en los que los cebadores o pares de cebadores se hibridan en condiciones rigurosas en el ADN que comprende el intervalo entre las posiciones de nucleótido 22.628.976 y 23.315.071, preferiblemente entre las posiciones de pares de bases 22.919.878 y 23.011.289 en el cromosoma 23 de caballo, o en la hebra complementaria del mismo.

Preferiblemente, los cebadores o pares de cebadores se hibridan en condiciones rigurosas en las secuencias SEQ ID NO: 1, 3 y 5 a 25.

Preferiblemente, los cebadores de la invención tienen una longitud de al menos 14 nucleótidos tales como 17 ó 21 nucleótidos.

Más específicamente, los cebadores pueden seleccionarse de SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 30 y SEQ ID NO: 31.

En una realización, los cebadores en realidad se unen a la posición de los SNP tal como se denomina en las tablas 4, 5, 7 y 8. Un oligonucleótido específico de alelo de ese tipo según la presente invención es normalmente un oligonucleótido de al menos 14 a 21 bases de nucleótidos de longitud diseñado para detectar una diferencia de una única base en la secuencia genética de la diana del caballo que va a someterse a prueba. Según la presente invención, puede(n) aplicarse uno o más cebadores específicos con el fin de identificar más de un SNP solo tal como se denomina en el presente documento. Como consecuencia, cuando se realiza la unión en condiciones rigurosas, tal cebador o tales cebadores es/son útil/útiles para distinguir entre variantes polimórficas diferentes ya que la unión sólo se produce si las secuencias del cebador y la diana tienen complementariedad completa. Además se prefiere que los cebadores tengan una longitud máxima de 24 nucleótidos. Tales cebadores pueden acoplarse con un método de detección apropiado tal como una reacción de elongación o una reacción de amplificación, que pueden usarse para diferenciar entre las variantes polimórficas y entonces sacar conclusiones con respecto al caballo con respecto a su capacidad de usar aires diferentes.

La hibridación preferiblemente se realiza en condiciones rigurosas o altamente rigurosas. El experto en la técnica conoce ampliamente o puede establecer según protocolos convencionales "condiciones rigurosas o altamente rigurosas" de hibridación. Las condiciones rigurosas apropiadas para cada secuencia pueden establecerse basándose en parámetros ampliamente conocidos tales como temperatura, composición de las moléculas de ácido nucleico, condiciones salinas, etc.: véase, por ejemplo, Sambrook *et al.* "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor, 1989 o Higgins y Hames (eds.), "Nucleic acid hybridization, a practical approach", IRL Press, Oxford 1985, véase en particular el capítulo "Hybridization Strategy" de Britten y Davidson. Las condiciones típicas (altamente rigurosas) comprenden hibridación a 65°C en 0,5xSSC y SDS al 0,1% o hibridación a 42°C en formamida al 50%, 4xSSC y SDS al 0,1%. La hibridación habitualmente va seguida de lavado para eliminar señales no específicas. Las condiciones de lavado incluyen condiciones tales como 65°C, 0,2xSSC y SDS al 0,1% o 2xSSC y SDS al 0,1% o 0,3xSSC y SDS al 0,1% a 25°C - 65°C.

El término "posiciones de nucleótido de pares de bases 22.628.976 y 23.315.071 en el cromosoma 23 de caballo" y otras posiciones de nucleótido indicadas similares se refieren a la secuencia de referencia de caballo según el conjunto preliminar de Sep. 2007 *Equus caballus*, EquCab2 (equCab2 versión UCSC). Se produjo EquCab2 por The Broad Institute. EquCab2 está disponible en el navegador genómico www.genome.ucsc.edu.

Ejemplos

Se realizó un examen de genoma completo para determinar los genes que afectan al patrón de locomoción usando el chip de SNP de caballo que comprende ensayos para 54.602 polimorfismos de un solo nucleótido en el genoma de caballo (Illumina EquineSNP50 BeadChip; http://www.illumina.com/products/equine_snp50_whole_genome_genotyping_kits.ilmn). En el ensayo se usó un material de población que comprendía 70 caballos islandeses en los que se clasificaron 30 como de cuatro pasos y se clasificaron 40 como de cinco pasos, es decir sólo estos últimos tenían una capacidad documentada de pasear.

Material animal. Se tomaron muestras de sangre de 70 caballos islandeses de Suecia. Se preparó ADN genómico de todos caballos usando el kit QIAamp DNA Blood Midi (Qiagen). Se pidió a los dueños de los caballos que clasificaran sus caballos como de cuatro pasos o de cinco pasos. Se tomaron muestras de pelo de 61 caballos Standardbred de Suecia y 2 trotones Suecos del Norte. Se extrajo ADN de seis raíces de pelo añadiendo 97 µl de disolución de Chelex y 7 µl de proteínaasa K y se incubó a 56°C durante 60 minutos seguido por una incubación a 95°C durante 10 minutos.

Análisis de genoma completo (GWA). Se realizó el GWA usando Illumina EquineSNP50 BeadChip (http://www.illumina.com/products/equine_snp50_whole_genome_genotyping_kits.ilmn). Se llevó a cabo el análisis estadístico de los datos usando el software PLINK (Purcell *et al.* 2007. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am. J. Hum. Genet.* 81:559-575).

Secuenciación de ADN. Se amplificaron mediante PCR y se secuenciaron varias regiones codificantes y no codificantes ubicadas entre los SNP flanqueantes en las posiciones de nucleótido de pares de bases 22.628.976 y 23.315.071 en el cromosoma 23 de caballo para identificar polimorfismos de secuencia. Todos los cebadores usados para estos experimentos se listan en la tabla 2. Se amplificaron los amplicones con condiciones de PCR convencionales y (ciclado térmico 2720, Applied Biosystems, Foster City, CA). Se realizó una secuenciación de Sanger convencional usando un secuenciador capilar AB3730 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Tabla 2. Cebadores usados para la amplificación mediante PCR y secuenciación de regiones seleccionadas en caballos

Amplicón	Región amplificada Posiciones de nucleótido	Cebador directo	Cebador inverso
ANKRD15exon1.1	cr23:22792627-22793280	TCATACCAGCTTGCCACACT	GAGGAGAGAGAGCTCGTGGA
ANKRD15exon1.2	cr23:22793162-22793792	CTAATGGAGACCCGAGAAG	GCCGGAACCTCTTATCCTC
ANKRD15exon1.3	cr23:22793704-22794386	GAGAAGTGGCGGGAATTAT	GCCCCACGACTTTATTCTCA
ANKRD15exon1.4	cr23:22794261-22794946	TGCAGACGAGAGACCAAATG	AAACCCAGAAGTGCCTGAGA
ANKRD15exon1.5	cr23:22794844-22795453	GCGGACAGTGGCTATAGGAG	AATACATTGTCCCCACCCTTC
ANKRD15exon2	cr23:22807940-22808575	ATGGGATTGTAGCTGAGTGG	AAGCCTGATGCTGAGAAGGA
ANKRD15exon3	cr23:22809005-22809616	TGCGATGCACAAATTTTCC	CTGGGGGTTTCTGAGTTCTG
ANKRD15exon4	cr23:22810246-22810904	GCAACCCAGGTTATCCCTTT	TCACCTTCTGCACCTGCATT
ANKRD15exon5	cr23:22812005-22812621	AAGTCGACTGAGGGGCTCTT	ACCTTGGCCCAGATAGGTTT
ANKRD15exon6	cr23:22815102-22815741	TCCCCAGGAACATACAGCTC	TGGAAGGATTTGAGGATGC
ANKRD15exon7	cr23:22817755-22818429	GCTTCTGGCCTCACGAAATA	TGGCATGAAGACACCACAAT
ANKRD15exon8	cr23:22818653-22819254	AGCCCCAGTACAGACCACAC	GGGAAGTCGCCTACACTGAA
ANKRD15exon9	cr23:22820739-22821346	GAGGATCCGTGGGATACAGA	AGCAAGTCTCCTGAGCAAGC
ANKRD15exon10	cr23:22821626-22822233	CAGAGGACACATCTGCCTGA	CAAAACCATCCTGGAAATGG
ANKRD_GAP	cr23:22836558-22837273	GTCCATCCCCCTTCTCTCCTC	TGTCAGCTGCAGAATGGAAG
PRIMER_DS7	cr23:22851938-22852292	AGACTGGCCCTGAGCTAACA	CTGAAGGTGCCCTCTACAGC
PRIMER_DS5	cr23:22868140-22868803	TTACCTGCCCCCTTTGTTTTG	CATCTTTGCCCTCAGACTC
PRIMER_DS2	cr23:22869516-22870124	TTACGTGGCACCCTACTTC	AGCCTGGACTCTGCTCTTGA
PRIMER_DS1	cr23:22872699-22873368	TGCTGCCCTCTGTCTATGTG	AAAGTAACGATGCGGTGGAC
PRIMER_DS4	cr23:22874773-22875445	AAATGGCTGTGCCGTTTAC	CTGTGTGACCAAGCTCTCCA
PRIMER_DS3	cr23:22876084-22876784	GAAAATGCTGACGTGCTGAA	CTTGCTGCCTTTTGCCTATC
PRIMER_DS6	cr23:22876563-22877255	GCAGAGCGACCTGGAGATAG	GGCCTTAGAGGGACACATGA
BIETOP-620109B_3	cr23:22967269-22967902	CCTCTCACCCAGACACCATT	AGTTGGCAAAACAACAGGACA
BIETOP-620109D_2	cr23:22967525-22968019	AAGTCCTTTCTTGGGGGCTA	GGTCCATCGTTGACCAAAAT
BIETOP-620109C_2	cr23:22967526-22968041	AGTCCTTTCTTGGGGGCTAA	ACGGCACCCACCATCATCTAT
DMRT3exon0	cr23:22985884-22986463	GCCCCAACTTAAGACCCTCT	CCGCGCTGCTTAGGAGTC
DMRT3exon0B	cr23:22985884-22987295	GCCCCAACTTAAGACCCTCT	TACCTGGCTGTCTGAGCTG
DMRT3GAP	cr23:22986413-22987358	GAGCAGCTGACAGCCCTATC	AAAGCTGGACTCCGAAGTTTTC
DMRT3exon2.1	cr23:22999117-22999797	CTCCTTCCAAGAAGCCTGTG	AGAGTCTGCGGAAAACCTCA
DMRT3exon2.2	cr23:22999709-23000396	CCTTGAGCTCATACCCCATC	ACTAAAGCCGAGAGCAGAG
DMRT3exon2.3	cr23:23000251-23001049	GAGAGGCCTCGTCTGTGTA	TCCCACTCACATTTCCCAAT
PRIMER_1	cr23:23009567-23010210	CAAGGGCATGAGGAGTGTTT	ACTCCATGATTGACAAAGAG
PRIMER_2	cr23:23027620-23028300	TCATTCCACCGCAATGTGT	GCCCACTGGCAGCAACAGAG
PRIMER_3	cr23:23048139-23048767	CTGTTGTCCAGCCCTGTAT	AGGTGAGTCCAGGCTAGCAA
DMRT2exon1	cr23:23055803-23056469	GAGCCCGAGCGGATAATACT	ATTAGGACCGCACAGGACAC
DMRT2exon2	cr23:23056584-23057237	GCGGCTAGGGTGGTACTTCT	CTCGTCTCGTCTCTCGTC
DMRT2_GAP	cr23:23057214-23057971	GAGGACGACGAGGACGAG	CCACTTTCAAGGCCTCTCTG
DMRT2exon2GAP	cr23:23057214-23057971	GAGGACGACGAGGACGAG	CCACTTTCAAGGCCTCTCTG
DMRT2exon3	cr23:23059113-23059736	CTGGGGTGACTCTAGCAAGG	TCACACCAAGGCAAAATTTC
DMRT2exon4.1	cr23:23061639-23062293	CCCCCAAAGGGAATATTTT	GAAGTGGGTGGTGGCATT
DMRT2exon4.2	cr23:23062130-23062788	TTCAGGGTCTGGGAATATGG	TCCAACTTGTGTGGCTACGA
DMRT2exon4.3	cr23:23062686-23063285	GGCCCCAAGAAACACAGAG	CCTGTAGACCCAGAGACCA
PRIMER_4	cr23:23067103-23067766	GGTCCAAATTGTAGGGCTGA	TTCCCCAGGAGGTTCTCTTT
PRIMER_5	cr23:23069404-23070095	CCAGATCAAGGGGAATGCTA	CAAGGCAGACCAATCCATT
PRIMER_6	cr23:23076510-23077194	CAAAGTAAGCATCCCCAGGA	GCAGCACCTCTTCTCTCATC
PRIMER_7	cr23:23080154-23080820	TGGAAATTTTGGGCTGTTTC	TTTCTCCAGGGAATTTGTGC
PRIMER_8	cr23:23085336-23086005	GCTGCTGGAGACGAAAAG	CGAAGGGCACCTAATCAAAA

Resequenciación de genoma en profundidad. Se prepararon muestras de ADN de dos caballos islandeses, un homocigoto de *DMRT3* mutante hembra y un control macho (de tipo natural homocigótico) para la secuenciación. Se generaron bibliotecas de extremos emparejados Illumina de estas muestras de ADN (tamaños de inserto medios de aproximadamente 220 bases). Se secuenciaron las dos bibliotecas (2 x 100 pb) en siete y cinco carriles,

respectivamente, usando un instrumento HiSeq de Illumina. Se mapearon las lecturas en el genoma de caballo (conjunto de referencia EquCab2) usando el software BWA, y se eliminaron los duplicados de PCR usando el software Picard (<http://picard.sourceforge.net>). La profundidad de lectura promedio obtenida para cada muestra era de aproximadamente 30x. Se obtuvieron resultados de SNP y pequeñas inserciones/delecciones a partir de los datos de mapeo tras someter las alineaciones a realineación alrededor de indels y luego a obtención de resultados de variantes usando el Genome Analysis Toolkit (GATK). Se sometieron los resultados de variantes a filtros VariantFiltrationWalker recomendados para determinar los SNP listados en la página wiki de GATK (http://www.broadinstitute.org/gsa/wiki/index.php/The_Genome_Analysis_Toolkit) y las alineaciones de lectura que solapaban resultados de SNP e inserción/delección dentro del locus *Gail* de 438 kb se revisaron entonces manualmente para eliminar los resultados de artefactos obvios. Se usaron profundidades de lectura observadas en ventanas de una kilobase para obtener resultados de duplicaciones candidatas en la región de IBD mínima, y se usaron distancias de mapeo y orientaciones entre lecturas emparejadas para detectar variaciones estructurales en relación con el conjunto de referencia. Se usó el software ANNOVAR para anotar SNP en relación con los genes Ensembl.

Análisis de SNP usando ensayos TaqMan. Se diseñaron ensayos TaqMan para examinar los SNP en el cromosoma 23, posición de nucleótido 22.967.656 (BIEC2_620109; el SNP incluido en el panel de SNP de Illumina que muestra la asociación más fuerte con el fenotipo) y en la posición de nucleótido 22.999.655 (DMRT3.3; el SNP que provoca un codón de terminación prematuro en el exón 2 de *DMRT3*). Los ensayos de genotipado de SNP Custom TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA) diseñados para estos dos SNP se resumen en la tabla 3. Se obtuvieron diseños de sonda y cebador de la página web de Applied Biosystems (<http://www5.appliedbiosystems.com/tools/cadt/>) usando la opción de orden de ensayos de genotipado personalizados. Se usó el sistema de detección de secuencia ABI PRISM 7900 HT para el formato de 384 pocillos (Applied Biosystems, Foster City, CA) para el análisis.

Tabla 3. Descripción de ensayos TaqMan para SNP en las posiciones de nucleótido 22.967.656 (BIEC2_620109) y 22.999.655 (DMRT3.3) en el cromosoma 23 de caballo.

BIEC2_620109		SEQ ID NO
Sec. de cebador directo.	GCAAAGTGCAGAAATAGTCTTTTGGG	26
Sec. de cebador inverso	CACTCTTTTGGGAATGGTTCACATTAAGG	27
Alelo de referencia*	C	
Secuencia indicadora (FAM)	TAGTGCAAACGGTACGTT	28
Alelo no de referencia	T	
Secuencia indicadora (VIC)	AAATAGTGCAAACAGTACGTT	29
DMRT3.3		
Sec. de cebador directo	CCTCTCCAGCCGCTCCT	30
Sec. de cebador inverso	TCAAAGATGTGCCCGTTGGA	31
Alelo de referencia*	C	
Secuencia indicadora (VIC)	CTGCCGAAGTTTCG	32
Alelo no de referencia	A	
Secuencia indicadora (FAM)	CTCTGCCTAAGTTTCG	33

*según el conjunto EquCab2 (disponible en el navegador genómico www.genome.ucsc.edu)

El análisis de genoma completo revela un locus en el cromosoma 23 de caballo que controla el patrón de locomoción. Se realizó el análisis estadístico de los datos del chip de SNP para los 70 caballos islandeses con una clasificación fenotípica como de cuatro pasos o de cinco pasos usando PLINK; 39.695 SNP pasaron el control de calidad. Se realizó una prueba de chi cuadrado para cada marcador por separado con el fin de determinar una diferencia significativa en las frecuencias de genotipo entre caballos de cuatro pasos frente a de cinco pasos. Se usó un modelo genético que asumía un modo recesivo de herencia. Se usaron diez mil permutaciones para corregir para múltiples pruebas. El análisis estadístico reveló una asociación altamente significativa entre un SNP (BIEC2_620109, SEQ ID NO: 5) en la posición de nucleótido de par de bases 22.967.656 en el cromosoma 23 de caballo y el fenotipo gait ($P=0,0002$, significancia de genoma completo; figura 1). Se ubicaron los dos SNP que flanqueaban inmediatamente el SNP altamente asociado en las posiciones de nucleótido 22.628.976 (BIEC2-619907, SEQ ID NO: 6) y 23.315.071 (BIEC2-620244, SEQ ID NO: 7) y éstos mostraron sólo asociaciones débiles al fenotipo ($P=0,01$ para el SNP en la posición de par de bases 22.628.976 y $P=0,32$ para el SNP en la posición de par de bases 23.315.071). Este resultado demostró que uno o más polimorfismos de secuencia que controlan el patrón de locomoción se ubican en los alrededores del SNP en la posición de par de bases 22.967.656 (el SNP más asociado) y dentro del intervalo definido por los marcadores flanqueantes en las posiciones de pares de bases 22.628.976 y 23.315.071 que muestran una asociación significativamente más débil al fenotipo gait. Esta región abarca 686 kilopares de bases y cinco genes se ubican en el intervalo *ANKRD15*, *DMRT1*, *DMRT3*, *DMRT2* y *GTF2A2* (figura 2). Este locus se denominó el locus *Gail* y los resultados estaban de acuerdo con una herencia recesiva del alelo asociado con la capacidad de pasear, mientras que el alelo de tipo natural (no de paseo) en este locus era dominante.

La resecuenciación de regiones seleccionadas perfecciona la localización del locus *Gail*. Se resecuenciaron varios

amplicones (tabla 2) de la región genómica que alberga el locus *Gait* tal como se define por el examen de genoma completo (desde la posición de nucleótido 22.628.976 hasta la posición 23.315.071 en el cromosoma 23) en un pequeño conjunto de caballos de cuatro pasos y de cinco pasos con el fin de perfeccionar la localización del locus *Gait*. Todos los polimorfismos de secuencia detectados en este análisis se resumen en la tabla 4. Los resultados mostraron que hay un haplotipo distinto asociado con el alelo *gait* recesivo y que el bloqueo de haplotipo que muestra una completa asociación a *gait* en esta raza se rompe en la posición de nucleótido 22.877.015 justo aguas arriba del gen *DMRT1*. Los resultados perfeccionan la localización del locus *Gait* en el intervalo desde la posición de nucleótido de par de bases 22.877.015 hasta la posición de par de bases 23.315.071; *ANKRD15* se ubica fuera del intervalo crítico para *Gait*.

Tabla 4. Polimorfismos de secuencia detectados resecuenciando amplicones de la región genómica que alberga el locus *Gait* en el cromosoma 23 de caballo

SNP	Posición	Fenotipo										
		De cuatro pasos				De cinco pasos						
		Caballo 1	Caballo 2	Caballo 3	Caballo 4	Caballo 5	Caballo 6	Caballo 7	Caballo 8	Caballo 9	Caballo 10	Caballo 11
ANKRD15.1	22.793.939	GG	GC	GC	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG
ANKRD15.2	22.810.322	GG	GA	GA	GG	GA	GG	GA	GG	GG	GG	GA
ANKRD15.3	22.812.345	GG	GT	GT	GG	GT	GG	GT	GG	GG	GG	GT
ANKRD15.4	22.812.251	TT	TT	TT	TT	TC	TT	TC	TT	TT	TT	TC
ANKRD15.5	22.818.132	TT	CT	CT	TT	CT	TT	CT	TT	TT	TT	CT
ANKRD15.6	22.818.158	GG	GA	GA	GG	GA	GG	GA	GG	GG	GG	GA
ANKRD15.7	22.821.872	CC	CA	CA	CC	CA	CC	CA	CC	CC	CC	CA
ANKRD15.8	22.821.884	GG	GG	GG	GG	CG	GG	CG	GG	GG	GG	CG
SNP.1	22.868.190	nt	nt	CC	CC	nt	nt	nt	nt	CC	CC	CT
SNP.2	22.868.678	nt	nt	GA	AA	nt	nt	nt	nt	AA	AA	GA
SNP.3	22.872.820	nt	nt	GG	GG	nt	nt	nt	nt	GG	GG	GC
SNP.4	22.876.848	nt	nt	CA	AA	nt	nt	nt	nt	AA	AA	AA
SNP.5	22.877.015	nt	nt	TT	TT	nt	nt	nt	nt	TT	TT	CT
BIEC2_620109	22.967.656	CC	CC	CC	CT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT
DMRT3.1	22.986.593	TT	TT	TT	CT	CC	CC	nt	nt	CC	CC	CC
DMRT3.2	22.987.143	CC	CC	CC	CT	TT	TT	nt	nt	TT	TT	TT
DMRT3.3	22.999.655	CC	CC	CC	CA	AA	AA	nt	nt	AA	AA	AA
DMRT3.4	22.999.665	GC	GG	GG	GC	CC	CC	nt	nt	CC	CC	CC
SNP.6	23.009.648	nt	nt	AA	AT	nt	nt	nt	nt	TT	TT	TT

nt=no sometido a prueba

Una mutación sin sentido ubicada en el exón 2 de *DMRT3* muestra concordancia completa con la capacidad de pasear. El intervalo crítico para el locus *Gait* comprende los cuatro genes *DMRT1*, *DMRT2*, *DMRT3* y *GTF2A2*. Los genes *DMRT* pertenecen a una familia de factores de transcripción que contienen el dominio DM de unión a ADN de tipo dedo de zinc (Murphy *et al.* 2007. Vertebrate DM domain proteins bind similar DNA sequences and can heterodimerize on DNA. BMC Mol. Biol. 8:58). Se han secuenciado la mayoría de los exones de *DMRT* en esta región e identificado un pequeño número de polimorfismos de secuencia (tabla 4). Uno de éstos (*DMRT3.3*), ubicado en el exón 2 de *DMRT3* en la posición de nucleótido 22.999.655, provocó una mutación sin sentido en el alelo asociado con la capacidad de pasear (figura 3). Por tanto, se predice que el alelo *gait* codifica para una forma truncada de la proteína *DMRT3* (SEQ ID NO: 4) que carece de los últimos 174 aminoácidos, reduciendo el tamaño total de la proteína desde 474 hasta 300 aminoácidos. Se muestra la *DMRT3* de caballo de tipo natural de longitud completa como SEQ ID NO: 2. Una alineación de la parte de la proteína *DMRT3* incluyendo la posición 301 del aminoácido mutado (serina) en caballos muestra que esta proteína se conserva altamente entre vertebrados incluyendo especies de pez, pájaro y mamífero (figura 4).

Se diseñaron ensayos TaqMan para los polimorfismos en las posiciones de nucleótido 22.967.656 (el SNP asociado de manera más significativa en el análisis de GWA) y en la posición 22.999.655 (la mutación en *DMRT3* que crea un codón de terminación prematuro). Se usaron éstos para seleccionar los 70 caballos islandeses incluidos en este estudio. Ambos SNP mostraron asociación completa entre homocigosidad para el alelo no de referencia en ambos loci y el fenotipo (tabla 5), el soporte estadístico para una asociación era contundente ($P=6,73 \times 10^{-10}$ para ambos SNP, prueba exacta de Fisher). Los resultados implican que hay un desequilibrio de ligamiento muy fuerte entre estos dos SNP en la población estudiada, los dos SNP se ubican a 32 kilopares de bases de separación. Nueve animales que se clasificaron como de cuatro pasos eran homocigóticos para el haplotipo asociado con el alelo *gait* (tabla 5). Estos animales o bien se clasificaron de manera errónea por sus dueños, lo cual es completamente posible, o bien el genotipo *Gait* muestra penetrancia incompleta debido a la interacción con factores ambientales (por ejemplo entrenamiento) u otros factores genéticos desconocidos.

Se sometieron a prueba 2 trotones Suecos del Norte y 61 caballos Standardbred Suecos (ambos usados para carreras de trotones en Suecia) para investigar si el alelo *gait* está presente en otras razas de caballos. Se ha encontrado que los 2 trotones Suecos del Norte y 59 caballos Standardbred eran homocigóticos para la mutación sin

sentido de DMRT3 en la posición de nucleótido 22.999.655 en el cromosoma 23 de caballo mientras que los 2 caballos Standardbred restantes eran heterocigóticos A/C. La alta frecuencia de este alelo en estas razas sugiere fuertemente que la mutación tiene un efecto favorable sobre la capacidad de trotar a una velocidad rápida. De hecho, también se consideraron los dos caballos identificados como heterocigóticos para el alelo *gait* como poco trotones. Se ha predicho que el alelo *gait* está presente a una alta frecuencia en la mayoría de, si no todas, las razas de caballos de paso así como caballos usados para carreras de trotones.

Tabla 5. Asociación altamente significativa entre los SNP en la posición de nucleótido 22.967.656 (BIEC2-620109) y 22.999.655 (DMRT3.3) en el cromosoma 23 de caballo en relación con la clasificación fenotípica de caballos islandeses como de cuatro pasos o de cinco pasos. Se calcularon estadísticas usando la prueba exacta de Fisher, con el alelo *Gait* como el alelo recesivo. OR= razón de posibilidades.

MARCADOR	BIEC2-620109	DMRT3.3
Alelo 1 (A ₁)	C	C
Alelo 2 (A ₂)	T	A
De tipo natural	21	21
De cinco pasos	9	9
	1	1
	39	39
p	6,73E-10	6,73E-10
OR	83,18	83,18

A₁/- = A₁/A₁ o A₁/A₂

Tabla 6. Distribución de genotipo para una mutación sin sentido (A) en DMRT3 entre poblaciones de caballos.

Raza	Número	CC	CA	AA
Caballo islandés	70	0,01	0,30	0,69
Trotón Standardbred	61	0,00	0,03	0,97
Trotón de sangre fría	2	0,00	0,00	1,00

Tabla 7. Secuencias de SNP

SEQ ID NO	secuencia	SNP	posición
SEQ ID NO: 5	TTGTTGGGGTCTTATGCAAAGTGCAGAAATAGTCTTTTGA AAAACGTAC[C/T]GTTTGCACATTTTCTATTTCATTCCACC CTTAATGTGAACCATTCCTAA	BIEC2_620109	22.967.656
SEQ ID NO: 6	AGAAATGATATATAAAATACGAATGCCTCTTAGACAGAAT CCTTATGT[A/G]TGGCAGACAGAAGTATTAGTTCGCTTAACAG ATATTGAGTGCCTTATATGAG	BIEC2-619907	22.628.976
SEQ ID NO: 7	CTCTTCTTGCATCCTATCCCCCTAGTGTGCGCAAGGGAAGT TGTGAGAGA[C/T]GAGCTTGTAGATCTGCTCTAGAAAATAG GCCTGTTTTCTTAAGAAACCGT	BIEC2-620244	23.315.071
SEQ ID NO: 8	CAGAGTGCCGGTCTGTGGCTGTGGCGCTGACGAGCACA TGGACAACATT[G/C]TCGTGTACCACAGGGGCTCCAGGTCC TGTAAGGATGCTGCTGTGGGACA	ANKRD15.1	22.793.939
SEQ ID NO: 9	AGAAGTCTATCAAAACACACAGGCTTACTAGGCTTTTTAA ATAGACTTG[A/G]CTTTGAAGTCTAAGTGCAGGATCTAAAA CCACTGGCGAAATTTCTGGA	ANKRD15.2	22.810.322
SEQ ID NO: 10	TTACCTGCATGCCTCTCCCCCTAAACCATTTCTAGCATGTG TGGGCAGAG[T/G]GGGCATCGTCTGCCCTGCTCACTGGA TCACTCTGGGAACGTTTCTTCA	ANKRD15.3	22.812.345
SEQ ID NO: 11	AAGGATATGGTGAAGTCTGACCTACAGACACTGTCCCCGGT CTGTACAAAG[T/C]GCCCAAGTGGTGACAAAGCATCCCTCG CCTGCCCTGAGCTGTACCTG	ANKRD15.4	22.812.251
SEQ ID NO: 12	AACGCCAAAGCCAGCCAGGTGACTGCGCTTGCTTCCTGGG CTCATGCTCA[C/T]ACTGCTGTGACCCGACAGGTGCCAC GCCACACTTCCCACCGCTCGGCA	ANKRD15.5	22.818.132
SEQ ID NO: 13	GCTTGCTTCCCTGGGCTCATGCTCACACTGCTGTGACCCGC ACAGGTGCC[C/A/G]CGCCACACTTCCCACCGCTCGGCACT CACTCATGGCCAGCCCGAGTCC	ANKRD15.6	22.818.158
SEQ ID NO: 14	ACTGAATGTATACATTTTGTGCTGAACTCACCAGCAAAACA GAAGGCAGA[A/C]AACCAAGGTTGAAGGCTGGAGCTGTC ACAGTAGAAGTTGAGCCAGCAGG	ANKRD15.7	22.821.872
SEQ ID NO: 15	CATTTTGTGCTGAACTCACCAGCAAAAGGCAGAAAA ACCAAGGGTT[G/C]AAGGCTGGAGCTGTACAGTAGAAGTT GAGCCAGCAGGAATTTGCTGGCC	ANKRD15.8	22.821.884
SEQ ID NO: 16	TCACTCTAATCAAGTTGCTATCACCATTACACAATTGTCCA GGATAGTA[C/T]TGGGACCCAGAAAGATCACGCCGCTCCA TTCCATTTCCTCACTTGTTC	SNP_1	22.868.190
SEQ ID NO: 17	CTGGGCTGAAACAGGTGGTCTCTTCCCCGCTGCTGTG GTCAGGCTGC[G/A]CTCTTCTCCCTCCCGAGGCTTAAGTC ACTTCATGCAGAACCTTTATAC	SNP_2	22.868.678
SEQ ID NO: 18	CCAGCATTTCTCCGCTTTCAACTTCTCCCGCTCCTCCAATC CAAAGTGA[G/C]TTAGCATCAGTACCCACAATGATCAAG CATTTTCTGTGTGGCAGGCCTG	SNP_3	22.872.820
SEQ ID NO: 19	AGGCAAGAAGCGATAGGCAAAAGGCAGCAAGAGCTGGAC CTGCAGATTG[C/A]AAGTTCTCTGGAGCCAGTAGGTGGAA ACCTCATCAGCAATGAACGACAGG	SNP_4	22.876.848

SEQ ID NO: 20	CCACACTGAGAGTCTTATTTGCTGATAGAAATGCAGAGACT TGCTTTTTC[T/C]GAGGCTTTCAACCTCGTACTTAATTCTCCT AAGTGAGAAAGAAACCACTC	SNP.5	22.877.015
SEQ ID NO: 21	ACCAGCGGGAGACTGAGGCTGCGAGCGCCGCAAAGACGG GTGCCGCATC[T/C]TGGCCAGCCCGGAGCGCACGCGGCC GCCGGAGCTGCCGGGACCAAGGACCG	DMRT3.1	22.986.593
SEQ ID NO: 22	CCGTCTCAGCCGCCGCCGCCGAGCGTCCCGCCGCCGAG TTGGCTGCCGGC[C/T]GCCCGCTGCCCTGGGCCACCAGGC CGCAGCCCGGGGCCCTGCAGGCGCA	DMRT3.2	22.987.143
SEQ ID NO: 23	GGAGGTCTCTCTCCAGCCGCTCCTCGGCCTCGGCCGC CGACCGAATT[C/A]GGCAGAGCCCGAGAGCCTCGTGTG CCCTCCAACGGGCACATCTTTGAAC	DMRT3.3	22.999.655
SEQ ID NO: 24	CTCTCCAGCCGCTCCTCGGCCTCGGCCGCCGACCGAACT TCGGCAGAGCC[C/G]GAGAGCCTCGTGTGCTCCCAACG GGCACATCTTTGAACACACCTTGAG	DMRT3.4	22.999.665
SEQ ID NO: 25	GGCTTGGCCCCTAGGGCATTTGAAGGGCTGGGGAGAGTCA CATGTACTCCC[A/T]CTGTGGCCTGAAGACCTACCTGGAGG GAAACCAGCTTGCTTAGGGGGCCT	SNP.6	23.009.648

Tabla 8. Variantes de secuencia en el cromosoma 23 de caballo que muestran fuerte asociación genética con la mutación Gait en caballos. La mutación Gait se produce en el cromosoma 23 de caballo, posición de nucleótido de pb 22.999.655 y se indica en negrita y cursiva a continuación.

Tipo	Ubicación / consecuencia ¹	Coordinada (EquCab2)	Alelo de ref. ²	Alelo(s) var. ³
SNP	intrónica	22919878	A	G
SNP	intrónica	22920361	C	T
SNP	intrónica	22920434	A	T
SNP	intrónica	22920646	G	A
SNP	intrónica	22920717	C	T
SNP	intrónica	22921203	G	T
SNP	intrónica	22922079	A	G
SNP	intrónica	22922780	C	T
SNP	intrónica	22923569	A	G
SNP	intrónica	22924120	G	A
INDEL	intrónica	22924142	-	A
SNP	intrónica	22924299	T	G
SNP	intrónica	22924380	A	G
SNP	intrónica	22924407	C	T
SNP	intrónica	22926098	C	T
SNP	intrónica	22926188	T	C
SNP	intrónica	22926872	A	C
SNP	intrónica	22927387	C	T
SNP	intrónica	22927607	T	C
SNP	intrónica	22928220	C	T
SNP	intrónica	22928537	T	G
SNP	intrónica	22928587	A	G
SNP	intrónica	22929137	G	A
SNP	intrónica	22930011	A	C
SNP	intrónica	22932024	G	A
SNP	intrónica	22932895	A	G
SNP	intrónica	22933218	A	G ⁴
SNP	intrónica	22936034	A	G
SNP	intrónica	22940759	T	G
SNP	intrónica	22942423	T	A
SNP	intrónica	22945643	G	C
SNP	intrónica	22946599	A	T
SNP	intrónica	22948774	C	T
SNP	intrónica	22949055	A	G
SNP	intrónica	22949108	A	G
SNP	intrónica	22949240	T	C
SNP	intrónica	22949710	A	G
SNP	intrónica	22956846	G	T
SNP	intrónica	22960132	A	C
SNP	intrónica	22960528	T	C
SNP	intrónica	22960710	C	T
SNP	intrónica	22964042	C	T
INDEL	intrónica	22965059	-	GA
SNP	intrónica	22967119	C	T

SNP	intrónica	22967656	C	T
SNP	intrónica	22967915	G	C
SNP	intrónica	22968898	G	A
SNP	intrónica	22973984	C	T
SNP	intrónica	22974589	T	C
SNP	intergénica	22979124	T	C
SNP	intergénica	22980014	C	T
SNP	intergénica	22982879	T	C
INDELS	intergénicas	22984588	A	-
INDEL	intergénica	22985746	G	-
SNP	intrónica	22988210	C	A
SNP	intrónica	22988991	T	G
SNP	intrónica	22993092	C	A
SNP	intrónica	22994591	C	A
SNP	intrónica	22999058	G	A
SNP	SNP de parada de ganancia (stopgain SNP)	22999655	C	A
SNP	intergénica	23002606	A	G
INDEL	intergénica	23003956	-	TG
SNP	intergénica	23008772	G	A
SNP	intergénica	23008789	G	A
SNP	intergénica	23009648	A	T
SNP	intergénica	23010164	G	A
SNP	intergénica	23011289	G	C

¹Ubicación: Indica dónde se ubica el SNP en relación con los genes Ensembl. En casos de solapamientos de secuencia codificante, se indica la consecuencia predicha para la proteína. Se realizó la intersección del gen usando el software ANNOVAR

²Alelo de ref. Éste es el alelo de referencia en el conjunto de genoma de caballo (EquCab2).

5 ³Alelo var.: Éste es el alelo variante en la posición polimórfica que muestra asociación muy fuerte con la mutación *Gail*. Para polimorfismos de inserción en relación con el conjunto de referencia (EquCab2), el alelo de referencia se denomina "-" y para deleciones en relación con la referencia el alelo variante se denomina "-". El caballo mutante secuenciado era homocigótico para el alelo variante en todos los sitios excepto uno (véase pie de página 4) listado en esta tabla a menos que se indique lo contrario en la columna de alelo var.

10 ⁴Se identificó este SNP como heterocigótico (AG) en el caballo mutante y homocigótico para el alelo de referencia en el caballo control. El alelo G en este SNP posiblemente se ha producido posteriormente a la mutación sin sentido de *DMRT3*.

15 Ensayos de desplazamiento de movilidad electroforética (EMSA). Se hibridaron el oligonucleótido 5'-ggatccTCGAGAACAATGTAACAATTTGCCCC-3' y su secuencia complementaria en Tris 10 mM pH 7,5, EDTA 1 mM, KCl 50 mM calentando en primer lugar hasta 95°C durante 2 min y después se enfriaron hasta 25°C (2 min/grado). Se marcó el dúplex con Klenow de la ADN polimerasa y [α -32P]-dCTP y se purificó usando una columna Bio-Rad Micro Bio-Spin 30. Se produjeron proteínas mutantes y de tipo natural de *DMRT3* mediante traducción *in vitro* usando un sistema de transcripción/traducción acoplado TNT Quick (Promega). Se realizó EMSA
20 tal como se describe por Culbertson y Leeds, 2003 (Looking at mRNA decay pathways through the window of molecular evolution. Curr. Opin. Genet. Dev. 13, 207-214) con las siguientes modificaciones. No se añadió ADN de plásmido y se usaron 1,0 μ l de proteína traducida *in vitro* y 150x competidor frío. Se incubó la mezcla de reacción en hielo durante 20 min antes de añadir el oligonucleótido radioactivo y después se incubó a temperatura ambiente durante 30 min. Se procesaron los geles a 150 V a temperatura ambiente. Se encontró que la proteína *DMRT3* tanto
25 mutante como de tipo natural de longitud completa se unían a un motivo de unión a *DMRT* definido anteriormente (figura 6). Por tanto, la mutación de *DMRT3* no conduce a un patrón de expresión alterado y la proteína mutante parece mantener su ubicación celular y el perfil de unión a ADN. Por tanto, puede ser una forma negativa dominante con unión a ADN normal pero interacción defectuosa con otras proteínas. Esto estaría de acuerdo con los claros efectos fenotípicos observados en heterocigotos. Sin embargo, la mutación no es completamente dominante ya que
30 los heterocigotos CA y los homocigotos AA muestran diferencias fenotípicas distintas.

Conclusiones

35 Se han presentado evidencias abundantes de que la mutación *DMRT3_Ser301STOP* tiene un efecto importante sobre los aires en caballos. La interpretación de las consecuencias fenotípicas de esta mutación es que la homocigosidad para la mutación se requiere, pero no es suficiente, para el paseo, ya que muchos trotones Standardbred y algunos caballos islandeses que son mutantes homocigóticos no pasean. Por otro lado, la heterocigosidad u homocigosidad para la mutación son permisivas para permitir que se realicen una variedad de aires andados de cuatro ritmos, con modificadores genéticos que pueden ser únicos para cada raza de paso. La

mutación promueve aires amblados y el paseo e inhibe la transición desde trote o paseo a galope, lo que explica su alta frecuencia en caballos de paso y trotones usados para carreras de trotones. Es una cuestión abierta si la mutación altera el destino de DMRT3-neuronas o cambia su regulación transcripcional, pero está claro que estas neuronas deben desempeñar un papel clave para el centro de control en la médula espinal que coordina los movimientos de los miembros.

Todos los métodos dados a conocer y reivindicados en el presente documento puede hacerse y ejecutarse sin experimentación excesiva en vista de la presente descripción. Aunque los métodos de esta invención se han descrito en cuanto a realizaciones preferidas, resultará evidente para los expertos en la técnica que pueden aplicarse variaciones a los métodos y en las etapas o en la secuencia de las etapas del método descrito en el presente documento. Más específicamente, resultará evidente que determinados agentes que están relacionados tanto química como fisiológicamente pueden sustituirse por los agentes descritos en el presente documento obteniendo al mismo tiempo resultados iguales o similares.

Lista de secuencias

5	<110>	Capilet Genetics AB Andersson, Lisa S Andersson, Leif Lindgren, Gabriella	
	<120>	Método para predecir el patrón de locomoción en caballos	
10	<130>	Gate	
	<150>	documento SE 1130034-0	
	<151>	05-05-2011	
15	<150>	documento US 61/514.749	
	<151>	03-08-2011	
	<160>	33	
20	<170>	PatentIn versión 3.5	
	<210>	1	
	<211>	2196	
	<212>	ADN	
25	<213>	<i>Equus caballus</i>	
	<220>		
	<221>	CDS	
	<222>	(39)..(1463)	
30	<400>	1	
		ccgccgccag cccgccagct cttccgggag ctcagggc atg aac ggc tac ggt tcc	56
		Met Asn Gly Tyr Gly Ser	
		1 5	
		ccc tac ctg tac atg ggc ggc ccg gtg tgc cag ccg ccg cgg gcg ccc	104
		Pro Tyr Leu Tyr Met Gly Gly Pro Val Ser Gln Pro Pro Arg Ala Pro	
		10 15 20	
		ttg cag cgc acg ccc aag tgc gcg cgc tgc cgc aac cac ggg gtg ctg	152
		Leu Gln Arg Thr Pro Lys Cys Ala Arg Cys Arg Asn His Gly Val Leu	
		25 30 35	
		tcc tgg ctc aag ggt cac aag cgc tac tgc cgc ttc aag gac tgc acc	200
		Ser Trp Leu Lys Gly His Lys Arg Tyr Cys Arg Phe Lys Asp Cys Thr	
		40 45 50	
		tgc gag aag tgc atc ctc atc atc gag cgg cag agg gtc atg gcg gcg	248
		Cys Glu Lys Cys Ile Leu Ile Ile Glu Arg Gln Arg Val Met Ala Ala	
		55 60 65 70	
		cag gtg gcg ctg cgc cgg cag caa gct aac gag agc ctc gag agc ctc	296
		Gln Val Ala Leu Arg Arg Gln Gln Ala Asn Glu Ser Leu Glu Ser Leu	
		75 80 85	
		att ccc gac tgc ctg cgt gct ctg ccc ggc ccc ccg ccg ccg ggg gac	344
		Ile Pro Asp Ser Leu Arg Ala Leu Pro Gly Pro Pro Pro Pro Gly Asp	
		90 95 100	
		gcc gcc gct gcc gcc ccg cag ccg ccg ccc acc tgc cag ccg tct cag	392
		Ala Ala Ala Ala Ala Pro Gln Pro Pro Pro Thr Ser Gln Pro Ser Gln	
		105 110 115	
		ccg ccg ccg ccg cag cgt ccc gcc gcc gag ttg gct gcg gcc gcc gcg	440

Pro	Pro	Pro	Pro	Gln	Arg	Pro	Ala	Ala	Glu	Leu	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala		
120						125					130						
ctg	cgc	tgg	gcc	acc	gag	ccg	cag	ccc	ggg	gcg	ctg	cag	gcg	cag	ctc	488	
Leu	Arg	Trp	Ala	Thr	Glu	Pro	Gln	Pro	Gly	Ala	Leu	Gln	Ala	Gln	Leu		
135					140				145						150		
gac	aag	cca	gat	ttg	act	gag	gag	cga	ctt	ggg	gac	ggc	agc	tcc	gca	536	
Asp	Lys	Pro	Asp	Leu	Thr	Glu	Glu	Arg	Leu	Gly	Asp	Gly	Ser	Ser	Ala		
				155					160					165			
gac	aac	aca	gag	acc	ttc	agc	gac	aaa	gac	acc	gac	cag	agg	agc	tcc	584	
Asp	Asn	Thr	Glu	Thr	Phe	Ser	Asp	Lys	Asp	Thr	Asp	Gln	Arg	Ser	Ser		
			170					175					180				
cca	gat	gtg	gtg	aaa	agt	aag	ggc	tgc	ttc	acc	ccg	gag	agc	ccc	gag	632	
Pro	Asp	Val	Val	Lys	Ser	Lys	Gly	Cys	Phe	Thr	Pro	Glu	Ser	Pro	Glu		
		185					190					195					
gtc	gtg	tct	gtg	gat	gaa	ggc	ggg	tat	gcg	gtc	cag	aag	aac	gga	ggc	680	
Val	Val	Ser	Val	Asp	Glu	Gly	Gly	Tyr	Ala	Val	Gln	Lys	Asn	Gly	Gly		
200					205						210						
acc	tcc	gag	agc	cgc	ccc	gac	agt	ccc	aag	tac	cac	ggg	gaa	cag	aat	728	
Thr	Ser	Glu	Ser	Arg	Pro	Asp	Ser	Pro	Lys	Tyr	His	Gly	Glu	Gln	Asn		
215					220					225					230		
cac	ctc	ctg	atc	gag	ggc	ccc	tcg	ggg	acc	gtt	tct	ctg	ccc	ttc	agc	776	
His	Leu	Leu	Ile	Glu	Gly	Pro	Ser	Gly	Thr	Val	Ser	Leu	Pro	Phe	Ser		
				235					240					245			
ttg	aaa	gcc	aac	aga	ccg	ccc	ctg	gaa	gtg	tta	aaa	aaa	atc	ttc	ccc	824	
Leu	Lys	Ala	Asn	Arg	Pro	Pro	Leu	Glu	Val	Leu	Lys	Lys	Ile	Phe	Pro		
			250					255					260				
aac	cag	aag	ccc	acg	gtg	ctg	gag	ctc	atc	ctg	aag	ggc	tgt	ggg	ggc	872	
Asn	Gln	Lys	Pro	Thr	Val	Leu	Glu	Leu	Ile	Leu	Lys	Gly	Cys	Gly	Gly		
		265					270					275					
gac	ctg	gtg	agc	gcc	gtg	gag	gtc	ctc	ctc	tcc	agc	cgc	tcc	tcg	gcc	920	
Asp	Leu	Val	Ser	Ala	Val	Glu	Val	Leu	Leu	Ser	Ser	Arg	Ser	Ser	Ala		
		280				285					290						
tcg	gcc	gcc	gac	cga	act	tcg	gca	gag	ccc	gag	agc	ctc	gtg	ttg	ccc	968	
Ser	Ala	Ala	Asp	Arg	Thr	Ser	Ala	Glu	Pro	Glu	Ser	Leu	Val	Leu	Pro		
295					300					305					310		
tcc	aac	ggg	cac	atc	ttt	gaa	cac	acc	ttg	agc	tca	tac	ccc	atc	tcc	1016	
Ser	Asn	Gly	His	Ile	Phe	Glu	His	Thr	Leu	Ser	Ser	Tyr	Pro	Ile	Ser		
				315					320					325			
tct	tcc	aaa	tgg	tcc	gtg	gga	tcg	gcc	ttc	agg	gtc	cca	gac	acg	ttg	1064	
Ser	Ser	Lys	Trp	Ser	Val	Gly	Ser	Ala	Phe	Arg	Val	Pro	Asp	Thr	Leu		
			330					335					340				
agg	ttt	tcc	gca	gac	tct	agt	aac	gtt	gtc	ccc	aac	ccc	ttg	gcc	gtg	1112	
Arg	Phe	Ser	Ala	Asp	Ser	Ser	Asn	Val	Val	Pro	Asn	Pro	Leu	Ala	Val		
		345					350					355					
ccc	ctg	cag	cat	cct	ttc	ccc	cag	ccg	ccc	cgg	tac	cct	ctg	atg	ctg	1160	
Pro	Leu	Gln	His	Pro	Phe	Pro	Gln	Pro	Pro	Arg	Tyr	Pro	Leu	Met	Leu		
		360				365					370						
agg	aat	act	ttg	gca	aga	aac	cag	tcg	agc	ccc	ttc	ctg	ccc	aat	gat	1208	
Arg	Asn	Thr	Leu	Ala	Arg	Asn	Gln	Ser	Ser	Pro	Phe	Leu	Pro	Asn	Asp		

[illegible]

gcatttgaac	tctgacccc	tgcctcccc	aggagaggcc	togtccgtg	tatacccttt	1563
ccttctgttt	gacaaagtga	ctgtgcttga	ttctatacct	tagcaataaa	aacataactt	1623
atttaatttc	ttgcacttca	ctggaaaatg	ccaaatagct	ctgctctgcg	gcttttagtgc	1683
tgaatgttta	ttgtaaaaga	gagtctaata	ctaagaatag	tcttgggaaa	gctgggtcca	1743
cggaagattt	atttggggat	ggaaagctga	aggtcagcct	tgctcctaaa	ctcaacctgg	1803
aatgttcaat	aaaatagtat	acttgaatgc	agttttgtaa	aaaaggattc	ctcaggatat	1863
ttgaaaccta	aaggaagtgg	tttggttgca	aatggaccag	aaacagggac	attatattct	1923
taggctaaaa	accttgcatt	taaaagagag	actgcactta	agaatagagt	gaactgctca	1983
catgcttatt	taagcttggg	cagttttcag	agacaaattc	cattaagaat	tattcttttc	2043
acatgaccga	atcgaaacat	gtgtaatgtc	aatgtaaaac	caatcacagc	tgtgaactgc	2103
atgaaatgta	ttgtgaaatg	aacacaagat	taagctttgt	caggttaatg	tagcatgcta	2163
aggactctag	aaaaaaataa	actaaggaga	tga			2196

<210>	2
<211>	474
<212>	PRT
<213>	<i>Equus caballus</i>

<400> 2

Met Asn Gly Tyr Gly Ser Pro Tyr Leu Tyr Met Gly Gly Pro Val Ser
1 5 10 15

Gln Pro Pro Arg Ala Pro Leu Gln Arg Thr Pro Lys Cys Ala Arg Cys
20 25 30

Arg Asn His Gly Val Leu Ser Trp Leu Lys Gly His Lys Arg Tyr Cys
 35 40 45
 Arg Phe Lys Asp Cys Thr Cys Glu Lys Cys Ile Leu Ile Ile Glu Arg
 50 55 60
 Gln Arg Val Met Ala Ala Gln Val Ala Leu Arg Arg Gln Gln Ala Asn
 65 70 75 80
 Glu Ser Leu Glu Ser Leu Ile Pro Asp Ser Leu Arg Ala Leu Pro Gly
 85 90 95
 Pro Pro Pro Pro Gly Asp Ala Ala Ala Ala Ala Pro Gln Pro Pro Pro
 100 105 110
 Thr Ser Gln Pro Ser Gln Pro Pro Pro Pro Gln Arg Pro Ala Ala Glu
 115 120 125
 Leu Ala Ala Ala Ala Ala Leu Arg Trp Ala Thr Glu Pro Gln Pro Gly
 130 135 140
 Ala Leu Gln Ala Gln Leu Asp Lys Pro Asp Leu Thr Glu Glu Arg Leu
 145 150 155 160
 Gly Asp Gly Ser Ser Ala Asp Asn Thr Glu Thr Phe Ser Asp Lys Asp
 165 170 175
 Thr Asp Gln Arg Ser Ser Pro Asp Val Val Lys Ser Lys Gly Cys Phe
 180 185 190
 Thr Pro Glu Ser Pro Glu Val Val Ser Val Asp Glu Gly Gly Tyr Ala
 195 200 205
 Val Gln Lys Asn Gly Gly Thr Ser Glu Ser Arg Pro Asp Ser Pro Lys
 210 215 220
 Tyr His Gly Glu Gln Asn His Leu Leu Ile Glu Gly Pro Ser Gly Thr
 225 230 235 240
 Val Ser Leu Pro Phe Ser Leu Lys Ala Asn Arg Pro Pro Leu Glu Val
 245 250 255
 Leu Lys Lys Ile Phe Pro Asn Gln Lys Pro Thr Val Leu Glu Leu Ile
 260 265 270
 Leu Lys Gly Cys Gly Gly Asp Leu Val Ser Ala Val Glu Val Leu Leu
 275 280 285

Ser Ser Arg Ser Ser Ala Ser Ala Ala Asp Arg Thr Ser Ala Glu Pro
290 295 300

Glu Ser Leu Val Leu Pro Ser Asn Gly His Ile Phe Glu His Thr Leu
305 310 315 320

Ser Ser Tyr Pro Ile Ser Ser Ser Lys Trp Ser Val Gly Ser Ala Phe
325 330 335

Arg Val Pro Asp Thr Leu Arg Phe Ser Ala Asp Ser Ser Asn Val Val
340 345 350

Pro Asn Pro Leu Ala Val Pro Leu Gln His Pro Phe Pro Gln Pro Pro
355 360 365

Arg Tyr Pro Leu Met Leu Arg Asn Thr Leu Ala Arg Asn Gln Ser Ser
370 375 380

Pro Phe Leu Pro Asn Asp Val Thr Leu Trp Asn Thr Met Thr Leu Gln
385 390 395 400

Gln Gln Tyr Gln Leu Arg Ser Gln Tyr Val Ser Pro Phe Pro Gly Ser
405 410 415

Ser Pro Ser Val Phe Arg Ser Ser Pro Val Leu Pro Thr Arg Ala Pro
420 425 430

Glu Asp Pro Arg Ile Ser Ile Pro Asp Asp Gly Cys Pro Ile Val Ser
435 440 445

Lys Gln Ser Leu Tyr Thr Glu Asp Asp Tyr Asp Glu Arg Ser Asp Ser
450 455 460

Ser Asp Ser Arg Ile Leu Asn Thr Ser Ser
465 470

<210> 3
<211> 2196
5 <212> ADN
<213> *Equus caballus*

<220>
10 <221> CDS
<222> (39)..(941)

<400> 3

ccgccgccag ccgcgcagct cttccgggag ctcagggc atg aac ggc tac ggt tcc 56
Met Asn Gly Tyr Gly Ser
1 5

ccc tac ctg tac atg ggc ggc ccg gtg tgc cag ccg ccg cgg gcg ccc 104
Pro Tyr Leu Tyr Met Gly Gly Pro Val Ser Gln Pro Pro Arg Ala Pro

10	15	20	
ttg cag cgc acg ccc aag tgc gcg cgc tgc cgc aac cac ggg gtg ctg Leu Gln Arg Thr Pro Lys Cys Ala Arg Cys Arg Asn His Gly Val Leu 25 30 35			152
tcc tgg ctc aag ggt cac aag cgc tac tgc cgc ttc aag gac tgc acc Ser Trp Leu Lys Gly His Lys Arg Tyr Cys Arg Phe Lys Asp Cys Thr 40 45 50			200
tgc gag aag tgc atc ctc atc atc gag cgg cag agg gtc atg gcg gcg Cys Glu Lys Cys Ile Leu Ile Ile Glu Arg Gln Arg Val Met Ala Ala 55 60 65 70			248
cag gtg gcg ctg cgc cgg cag caa gct aac gag agc ctc gag agc ctc Gln Val Ala Leu Arg Arg Gln Gln Ala Asn Glu Ser Leu Glu Ser Leu 75 80 85			296
att ccc gac tcg ctg cgt gct ctg ccc ggc ccc ccg ccg ccg ggg gac Ile Pro Asp Ser Leu Arg Ala Leu Pro Gly Pro Pro Pro Pro Gly Asp 90 95 100			344
gcc gcc gct gcc gcc ccg cag ccg ccg ccc acc tcg cag ccg tct cag Ala Ala Ala Ala Ala Pro Gln Pro Pro Pro Thr Ser Gln Pro Ser Gln 105 110 115			392
ccg ccg ccg ccg cag cgt ccc gcc gcc gag ttg gct gcg gcc gcc gcg Pro Pro Pro Pro Gln Arg Pro Ala Ala Glu Leu Ala Ala Ala Ala Ala 120 125 130			440
ctg cgc tgg gcc acc gag ccg cag ccc ggg gcg ctg cag gcg cag ctc Leu Arg Trp Ala Thr Glu Pro Gln Pro Gly Ala Leu Gln Ala Gln Leu 135 140 145 150			488
gac aag cca gat ttg act gag gag cga ctt ggg gac ggc agc tcc gca Asp Lys Pro Asp Leu Thr Glu Glu Arg Leu Gly Asp Gly Ser Ser Ala 155 160 165			536
gac aac aca gag acc ttc agc gac aaa gac acc gac cag agg agc tcc Asp Asn Thr Glu Thr Phe Ser Asp Lys Asp Thr Asp Gln Arg Ser Ser 170 175 180			584
cca gat gtg gtg aaa agt aag ggc tgc ttc acc ccg gag agc ccc gag Pro Asp Val Val Lys Ser Lys Gly Cys Phe Thr Pro Glu Ser Pro Glu 185 190 195			632
gtc gtg tct gtg gat gaa ggc ggg tat gcg gtc cag aag aac gga ggc Val Val Ser Val Asp Glu Gly Gly Tyr Ala Val Gln Lys Asn Gly Gly 200 205 210			680
acc tcc gag agc cgc ccc gac agt ccc aag tac cac ggg gaa cag aat Thr Ser Glu Ser Arg Pro Asp Ser Pro Lys Tyr His Gly Glu Gln Asn 215 220 225 230			728
cac ctc ctg atc gag ggc ccc tcg ggg acc gtt tct ctg ccc ttc agc His Leu Leu Ile Glu Gly Pro Ser Gly Thr Val Ser Leu Pro Phe Ser 235 240 245			776
ttg aaa gcc aac aga ccg ccc ctg gaa gtg tta aaa aaa atc ttc ccc Leu Lys Ala Asn Arg Pro Pro Leu Glu Val Leu Lys Lys Ile Phe Pro 250 255 260			824
aac cag aag ccc acg gtg ctg gag ctc atc ctg aag ggc tgt ggg gcc Asn Gln Lys Pro Thr Val Leu Glu Leu Ile Leu Lys Gly Cys Gly Gly 265 270 275			872

gac ctg gtg agc gcc gtg gag gtc ctc ctc tcc agc cgc tcc tcg gcc 920
Asp Leu Val Ser Ala Val Glu Val Leu Leu Ser Ser Arg Ser Ser Ala
280 285 290

tcg gcc gcc gac cga act tag gcagagcccg agagcctcgt gttgcctccc 971
Ser Ala Ala Asp Arg Thr
295 300

aacggggcaca tctttgaaca caccttgagc tcatacccca tctcctcttc caaatgggtcc 1031

gtgggatcgg ccttcagggt cccagacacg ttgaggtttt cgcagactc tagtaacgtt 1091

gtccccaacc ccttgggcgt gccctgcag catcctttcc cccagccgcc ccggtaccct 1151

ctgatgctga ggaatacttt ggcaagaaac cagtcgagcc ccttcctgcc caatgatgtc 1211

accctgtgga acaccatgac gctgcagcag cagtagcagc tgagggtcca gtacgtcagc 1271

cctttccccc ggagctcgcc cagcgtcttc agaagctcgc ctgtccttcc cagcgcgccc 1331

cccgaagacc ctcgatctc catccctgac gatgggtgtc cgattgtgtc aaagcagtct 1391

ctttacaccg aggatgacta tgacgagagc tccgactcct cagactctag aatactcaac 1451

acatcatctt aaagtgggtac cgggtggctg gtgaccaggt gacattttct gtgcatttga 1511

actctgaccc cctgcctccc ccaggagagc cctcgtcctg tgtataccct ttccttctgt 1571

ttgacaaagt gactgtgctt gattctatac cttagcaata aaaacataac ttattttaatt 1631

tcttgcaactt cactggaaaa tgccaaatag ctctgctctg cggctttagt gctgaatgtt 1691

tattgtaaaa gagagtctaa tgctaagaat agtcttggga aagctgggtc cacggaagat 1751

ttatttgggg atggaaagct gaaggtcagc cttgctccta aactcaacct ggaatgttca 1811

ataaaatagt atacttgaat gcagttttgt aaaaaaggat tcctcaggat atttgaaacc 1871

taaaggaagt ggtttggttg caaatggacc agaaacaggg acattatatt cttaggctaa 1931

aaaccttgca tttaaaagag agactgcact taagaataga gtgaactgct cacatgctta 1991

tttaagcttg gacagttttc agagacaaat tccattaaga attattcttt tcacatgacc 2051

gaatcgaac atgtgtaatg tcaatgtaa accaatcaca gctgtgaact gcatgaaatg 2111

tattgtgaaa tgaacacaag attaagcttt gtcagggtta ttagcatgc taaggactct 2171

agaaaaaat aaactaagga gatga 2196

<210> 4
<211> 300
<212> PRT
<213> *Equus caballus*

<400> 4

Met Asn Gly Tyr Gly Ser Pro Tyr Leu Tyr Met Gly Gly Pro Val Ser
1 5 10 15

Gln Pro Pro Arg Ala Pro Leu Gln Arg Thr Pro Lys Cys Ala Arg Cys
20 25 30

Arg Asn His Gly Val Leu Ser Trp Leu Lys Gly His Lys Arg Tyr Cys
 35 40 45
 Arg Phe Lys Asp Cys Thr Cys Glu Lys Cys Ile Leu Ile Ile Glu Arg
 50 55 60
 Gln Arg Val Met Ala Ala Gln Val Ala Leu Arg Arg Gln Gln Ala Asn
 65 70 75 80
 Glu Ser Leu Glu Ser Leu Ile Pro Asp Ser Leu Arg Ala Leu Pro Gly
 85 90 95
 Pro Pro Pro Pro Gly Asp Ala Ala Ala Ala Ala Pro Gln Pro Pro Pro
 100 105 110
 Thr Ser Gln Pro Ser Gln Pro Pro Pro Gln Arg Pro Ala Ala Glu
 115 120 125
 Leu Ala Ala Ala Ala Ala Leu Arg Trp Ala Thr Glu Pro Gln Pro Gly
 130 135 140
 Ala Leu Gln Ala Gln Leu Asp Lys Pro Asp Leu Thr Glu Glu Arg Leu
 145 150 155 160
 Gly Asp Gly Ser Ser Ala Asp Asn Thr Glu Thr Phe Ser Asp Lys Asp
 165 170 175
 Thr Asp Gln Arg Ser Ser Pro Asp Val Val Lys Ser Lys Gly Cys Phe
 180 185 190
 Thr Pro Glu Ser Pro Glu Val Val Ser Val Asp Glu Gly Gly Tyr Ala
 195 200 205
 Val Gln Lys Asn Gly Gly Thr Ser Glu Ser Arg Pro Asp Ser Pro Lys
 210 215 220
 Tyr His Gly Glu Gln Asn His Leu Leu Ile Glu Gly Pro Ser Gly Thr
 225 230 235 240
 Val Ser Leu Pro Phe Ser Leu Lys Ala Asn Arg Pro Pro Leu Glu Val
 245 250 255
 Leu Lys Lys Ile Phe Pro Asn Gln Lys Pro Thr Val Leu Glu Leu Ile
 260 265 270
 Leu Lys Gly Cys Gly Gly Asp Leu Val Ser Ala Val Glu Val Leu Leu
 275 280 285

	Ser	Ser	Arg	Ser	Ser	Ala	Ser	Ala	Ala	Asp	Arg	Thr
	290						295					300
	<210>	5										
	<211>	101										
5	<212>	ADN										
	<213>	<i>Equus caballus</i>										
	<220>											
	<221>	misc_feature										
10	<222>	(51)..(51)										
	<223>	n e s c o t										
	<400>	5										
		ttgttgggggt cttatgcaaa gtgcagaaat agtcttttgg aaaaacgtac ngtttgcaact										60
15		atcttcttat ttctattcac ccttaatgtg aaccattcca a										101
	<210>	6										
	<211>	101										
	<212>	ADN										
20	<213>	<i>Equus caballus</i>										
	<220>											
	<221>	misc_feature										
	<222>	(51)..(51)										
25	<223>	n e s a o g										
	<400>	6										
		agaaatgata tataaaaatt acgaatgcct cctagacaga atccttatgt ntggcacaga										60
		agtatttagt tgccttaaca gatattgagt gcttatatga g										101
30												
	<210>	7										
	<211>	101										
	<212>	ADN										
	<213>	<i>Equus caballus</i>										
35												
	<220>											
	<221>	misc_feature										
	<222>	(51)..(51)										
	<223>	n e s c o t										
40												
	<400>	7										
		ctcttccttg catcctatcc ccctagtgtc gcaaggggaag ttgtgagaga ngagcttgta										60
		gatctgctct agaaaatagg cctgttttct taagaaaccg t										101
45												
	<210>	8										
	<211>	101										
	<212>	ADN										
	<213>	<i>Equus caballus</i>										
50												
	<220>											
	<221>	misc_feature										
	<222>	(51)..(51)										
	<223>	n e s g o c										
55												
	<400>											

cagagtgccg gtctgtggct gtgggcgctg acgagcacat ggacaacatt ntcgtgtacc 60

acaggggctc caggtcctgt aaggatgctg ctgtggggac a 101

5 <210> 9
 <211> 101
 <212> ADN
 <213> *Equus caballus*

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (51)..(51)
 <223> n e s a o g

<400> 9

agaactcatt caaaaccacc aggcttacta ggctttttta aatagacttg nctttgaact 60

15 tctaagtgca ggatctaaaa ccactggcga aattttctgga a 101

20 <210> 10
 <211> 101
 <212> ADN
 <213> *Equus caballus*

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (51)..(51)
 <223> n e s t o g

<400> 10

ttacctgcat gcctctcccc ctaaaccatt tctagcatgt gtgggcagag ngggcactgt 60

30 gctgccctgc tcaactggatc actctgggaa cgtttccttc a 101

35 <210> 11
 <211> 101
 <212> ADN
 <213> *Equus caballus*

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (51)..(51)
 <223> n e s t o c

<400> 11

aaggatatgg tgagtctgac ctacagacac tgtccccggt ctgtacaaag ngcccaagtg 60

45 gtgacaaagc atccctcgcc tgccccctga gctgttacct g 101

50 <210> 12
 <211> 101
 <212> ADN
 <213> *Equus caballus*

55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (51)..(51)
 <223> n e s c o t

<400> 12

aacgccaaag ccagccaggt gactgcgctt gcttcctggg ctcatgctca nactgctgtg 60
 accgcacag gtgccacgc cacacttccc accgctcggc a 101
 5 <210> 13
 <211> 101
 <212> ADN
 <213> *Equus caballus*
 <220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (51)..(51)
 <223> n es a o g
 <400> 13
 gcttgccttc tgggctcatg ctacactgc tgtgaccgc acaggtgcc ncgcacact 60
 15 tcccaccgt cggcactcac tcatgacca gccccagtc c 101
 <210> 14
 <211> 101
 <212> ADN
 20 <213> *Equus caballus*
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (51)..(51)
 25 <223> n es a o c
 <400> 14
 actgaatgta tacattttgt gcctgaactc accagcaaac agaaggcaga naaccaaggg 60
 ttgaaggctg gagctgtcac agtagaagtt gagccagcag g 101
 30 <210> 15
 <211> 101
 <212> ADN
 <213> *Equus caballus*
 35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (51)..(51)
 <223> n es g o c
 40 <400> 15
 cttttgtgc ctgaactcac cagcaaacag aaggcagaaa accaagggtt naaggctgga 60
 gctgtcacag tagaagttga gccagcagga atttgctggc c 101
 45 <210> 16
 <211> 101
 <212> ADN
 <213> *Equus caballus*
 50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (51)..(51)
 <223> n es c o t
 55 <400> 16

tcactctaatt caagtttgcta tcaccattca cacaattgtc caggatagta ntgggacccc 60
 agaaagatca cgccgctcca ttcccatttc ccacttggtc c 101

5 <210> 17
 <211> 101
 <212> ADN
 <213> *Equus caballus*

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (51)..(51)
 <223> n es g o a

<400> 17

15 ctgggctgaa acaggtggtc ctgctttccc cgctgcctg gtcaggctgc ncttttctcc 60
 cctccccagg cttaagtcac ttcattgcaga accctttata c 101

20 <210> 18
 <211> 101
 <212> ADN
 <213> *Equus caballus*

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (51)..(51)
 <223> n es g o c

<400> 18

30 ccagcattct ccgctttcaa ctttctcccg ctctccaat ccaaactgga nttagcatca 60
 gctaccacaca atgatcaagc attttctgtg tggcaggcct g 101

35 <210> 19
 <211> 101
 <212> ADN
 <213> *Equus caballus*

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (51)..(51)
 <223> n es c o a

<400> 19

45 aggcaagaag cgataggcaa aaggcagcaa gagctggacc tgcagatttg naagttctct 60
 ggagccagta ggtggaaacc tcatcagcaa atgaacgcag g 101

50 <210> 20
 <211> 101
 <212> ADN
 <213> *Equus caballus*

55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (51)..(51)
 <223> n es l o c

<400> 20

	ccacactgag agtcttattt gctgatagaa atgcagagac ttctcttttc ngaggctttc	60
	aacctcgtag ttaattctcc taagtgagaa agaaaccact c	101
5	<210> 21 <211> 101 <212> ADN <213> <i>Equus caballus</i>	
10	<220> <221> misc_feature <222> (51)..(51) <223> n e s c o t	
	<400> 21	
	accagcggga gactgagget gcgagcgccg caaagacggg tgccgcatct ntggccagcc	60
15	cggagcgcac gcggccgccc gagctgcggg accaaggacc g	101
20	<210> 22 <211> 101 <212> ADN <213> <i>Equus caballus</i>	
25	<220> <221> misc_feature <222> (51)..(51) <223> n e s c o t	
	<400> 22	
	ccgtctcagc cgcgcgcgcc gcagcgtccc gccgcgcagt tggtgcggc ngecgcgctg	60
30	cgctgggcca ccgagccgca gcccggggcg ctgcaggcgc a	101
35	<210> 23 <211> 101 <212> ADN <213> <i>Equus caballus</i>	
40	<220> <221> misc_feature <222> (51)..(51) <223> n e s c o a	
	<400> 23	
45	ggaggtcttc ctctccagcc gctcctcggc ctgcggccgc gaccgaactt nggcagagcc	60
	cgagagcctc gtgttgccct ccaacgggca catctttgaa c	101
50	<210> 24 <211> 101 <212> ADN <213> <i>Equus caballus</i>	
55	<220> <221> misc_feature <222> (51)..(51) <223> n e s c o g	
	<400> 24	

	ctctccagcc gctcctcggc ctcgcccgcc gaccgaactt cggcagagcc ngagagcctc	60
	gtgttgccct ccaacgggca catctttgaa cacaccttga g	101
5	<210> 25 <211> 101 <212> ADN <213> <i>Equus caballus</i>	
10	<220> <221> misc_feature <222> (51)..(51) <223> n e s a o t	
	<400> 25	
	ggcctggccc ctagggcatt gaagggctgg ggagagtcac atgtactccc nctgtggcct	60
15	gaagacctac ctggagggaa accagcttgc ttagggggcc t	101
20	<210> 26 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador	
25	<400> 26	
	gcaaagtgca gaaatagtct ttgga	26
30	<210> 27 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Cebador	
	<400> 27	
40	cactcttttg gaatggttca cattaagg	28
45	<210> 28 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Indicador	
50	<400> 28	
	tagtgcaaac ggtacgtt	18
55	<210> 29 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Indicador	
	<400> 29	

	aaatagtgc aacagtacgt t	21
5	<210> 30 <211> 17 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador <400> 30	
15	cctctccagc cgctcct	17
20	<210> 31 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Cebador <400> 31	
25	tcaaagatgt gcccggttgga	20
30	<210> 32 <211> 13 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Indicador <400> 32	
35	ctgccgaagt tcg	13
40	<210> 33 <211> 15 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Indicador <400> 33	
50	ctctgcctaa gttcg	15

REIVINDICACIONES

1. Método para predecir el patrón de locomoción en un caballo incluyendo la capacidad de usar aires alternativos, trotar o pasear a una velocidad rápida, y realizar el adiestramiento, comprendiendo dicho método las etapas de:
 - i) extraer ADN de una muestra obtenida de un caballo,
 - ii) determinar en dicho ADN la presencia o ausencia de al menos un marcador genético útil para predecir la capacidad de un caballo de usar aires diferentes, en el que dicho al menos un marcador genético se ubica en la región entre los SNP flanqueantes en las posiciones de nucleótido 22.628.976, correspondiente a la posición 51 de SEQ ID NO: 6, y 23.315.071, correspondiente a la posición 51 de SEQ ID NO: 7, en el cromosoma 23 de caballo; y

en el que la posición de nucleótido de dicho marcador se refiere a la secuencia de referencia de caballo según el conjunto preliminar de Sep. 2007 *Equus caballus*, EquCab2.
2. Método según la reivindicación 1, en el que dicho al menos un marcador genético se ubica en la región entre los SNP flanqueantes en las posiciones de nucleótido de pares de bases 22.919.878 y 23.011.289 en el cromosoma 23 de caballo.
3. Método según la reivindicación 1, en el que el marcador genético se selecciona de los marcadores genéticos listados en la tabla 5, tabla 7 y tabla 8.
4. Método según la reivindicación 2, en el que el marcador genético se selecciona de los marcadores genéticos listados en la tabla 8.
5. Método según la reivindicación 2, que comprende identificar en dicho ADN el nucleótido en una o más posiciones específicas seleccionadas de las posiciones 22.919.878; 22.920.361; 22.920.434; 22.920.646; 22.920.717; 22.921.203; 22.922.079; 22.922.780; 22.923.569; 22.924.120; 22.924.142; 22.924.299; 22.924.380; 22.924.407; 22.926.098; 22.926.188; 22.926.872; 22.927.387; 22.927.607; 22.928.220; 22.928.537; 22.928.587; 22.929.137; 22.930.011; 22.932.024; 22.932.895; 22.933.218; 22.936.034; 22.940.759; 22.942.423; 22.945.643; 22.946.599; 22.948.774; 22.949.055; 22.949.108; 22.949.240; 22.949.710; 22.956.846; 22.960.132; 22.960.528; 22.960.710; 22.964.042; 22.965.059; 22.967.119; 22.967.656; 22.967.915; 22.968.898; 22.973.984; 22.974.589; 22.979.124; 22.980.014; 22.982.879; 22.984.588; 22.985.746; 22.988.210; 22.988.991; 22.993.092; 22.994.591; 22.999.058; 22.999.655; 23.002.606; 23.003.956; 23.008.772; 23.008.789; 23.009.648; 23.010.164; y 23.011.289, en el cromosoma 23 de caballo.
6. Método según la reivindicación 1, que comprende determinar en dicho ADN la presencia o ausencia de:
 - i) el nucleótido C en una posición de nucleótido correspondiente a la posición 939 en SEQ ID NO: 1,
 - ii) el nucleótido A en una posición de nucleótido correspondiente a la posición 939 en SEQ ID NO: 3,
 - iii) el nucleótido C y/o T en una posición de nucleótido correspondiente a la posición 51 en SEQ ID NO: 5,
 - iv) el nucleótido A y/o G en una posición de nucleótido correspondiente a la posición 51 en SEQ ID NO: 6,
 - v) el nucleótido C y/o T en una posición de nucleótido correspondiente a la posición 51 en SEQ ID NO: 7,
 - vi) el nucleótido G y/o C en una posición de nucleótido correspondiente a la posición 51 en SEQ ID NO: 8,
 - vii) el nucleótido A y/o G en una posición de nucleótido correspondiente a la posición 51 en SEQ ID NO: 9,
 - viii) el nucleótido T y/o G en una posición de nucleótido correspondiente a la posición 51 en SEQ ID NO: 10,
 - ix) el nucleótido T y/o C en una posición de nucleótido correspondiente a la posición 51 en SEQ ID NO: 11,
 - x) el nucleótido C y/o T en una posición de nucleótido correspondiente a la posición 51 en SEQ ID NO: 12,
 - xi) el nucleótido A y/o G en una posición de nucleótido correspondiente a la posición 51 en SEQ ID NO: 13,
 - xii) el nucleótido A y/o C en una posición de nucleótido correspondiente a la posición 51 en SEQ ID NO: 14,
 - xiii) el nucleótido G y/o C en una posición de nucleótido correspondiente a la posición 51 en SEQ ID NO:

15,

xiv) el nucleótido C y/o T en una posición de nucleótido correspondiente a la posición 51 en SEQ ID NO: 16,

xv) el nucleótido G y/o A en una posición de nucleótido correspondiente a la posición 51 en SEQ ID NO: 17,

xvi) el nucleótido G y/o C en una posición de nucleótido correspondiente a la posición 51 en SEQ ID NO: 18,

xvii) el nucleótido C y/o A en una posición de nucleótido correspondiente a la posición 51 en SEQ ID NO: 19,

xviii) el nucleótido T y/o C en una posición de nucleótido correspondiente a la posición 51 en SEQ ID NO: 20,

xix) el nucleótido C y/o T en una posición de nucleótido correspondiente a la posición 51 en SEQ ID NO: 21,

xx) el nucleótido C y/o T en una posición de nucleótido correspondiente a la posición 51 en SEQ ID NO: 22,

xxi) el nucleótido C y/o A en una posición de nucleótido correspondiente a la posición 51 en SEQ ID NO: 23,

xxii) el nucleótido C y/o G en una posición de nucleótido correspondiente a la posición 51 en SEQ ID NO: 24, y/o

xxiii) el nucleótido A y/o T en una posición de nucleótido correspondiente a la posición 51 en SEQ ID NO: 25.

7. Método según la reivindicación 4, que comprende determinar en dicho ADN la presencia o ausencia de:

i) el nucleótido C en una posición de nucleótido correspondiente a la posición 939 en SEQ ID NO: 1, y/o

ii) el nucleótido A en una posición de nucleótido correspondiente a la posición 939 en SEQ ID NO: 3.

8. Método para predecir el patrón de locomoción en un caballo incluyendo la capacidad de usar aires alternativos, trotar o pasear a una velocidad rápida, y realizar el adiestramiento, comprendiendo dicho método las etapas de;

i) extraer proteína de una muestra obtenida de un caballo, y

ii) determinar en dicha muestra de proteína la presencia o ausencia de una forma truncada de la proteína DMRT3.

9. Uso del método según cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para la prueba de paternidad.

10. Uso del método según cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para la selección de un caballo para cría.

11. Método para la selección de un caballo para cría, comprendiendo dicho método determinar en una muestra de ADN obtenida de dicho caballo el alelo de al menos un marcador genético útil para predecir la capacidad de un caballo de usar aires diferentes, en el que dicho al menos un marcador genético se ubica en la región entre los SNP flanqueantes en las posiciones de nucleótido 22.628.976 y 23.315.071 correspondientes a la posición 51 de SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7, respectivamente, en el cromosoma 23 de caballo, en el que la posición de nucleótido de dicho marcador se refiere a la secuencia de referencia de caballo según el conjunto preliminar de Sep. 2007 *Equus caballus*, EquCab2.

Figura 1

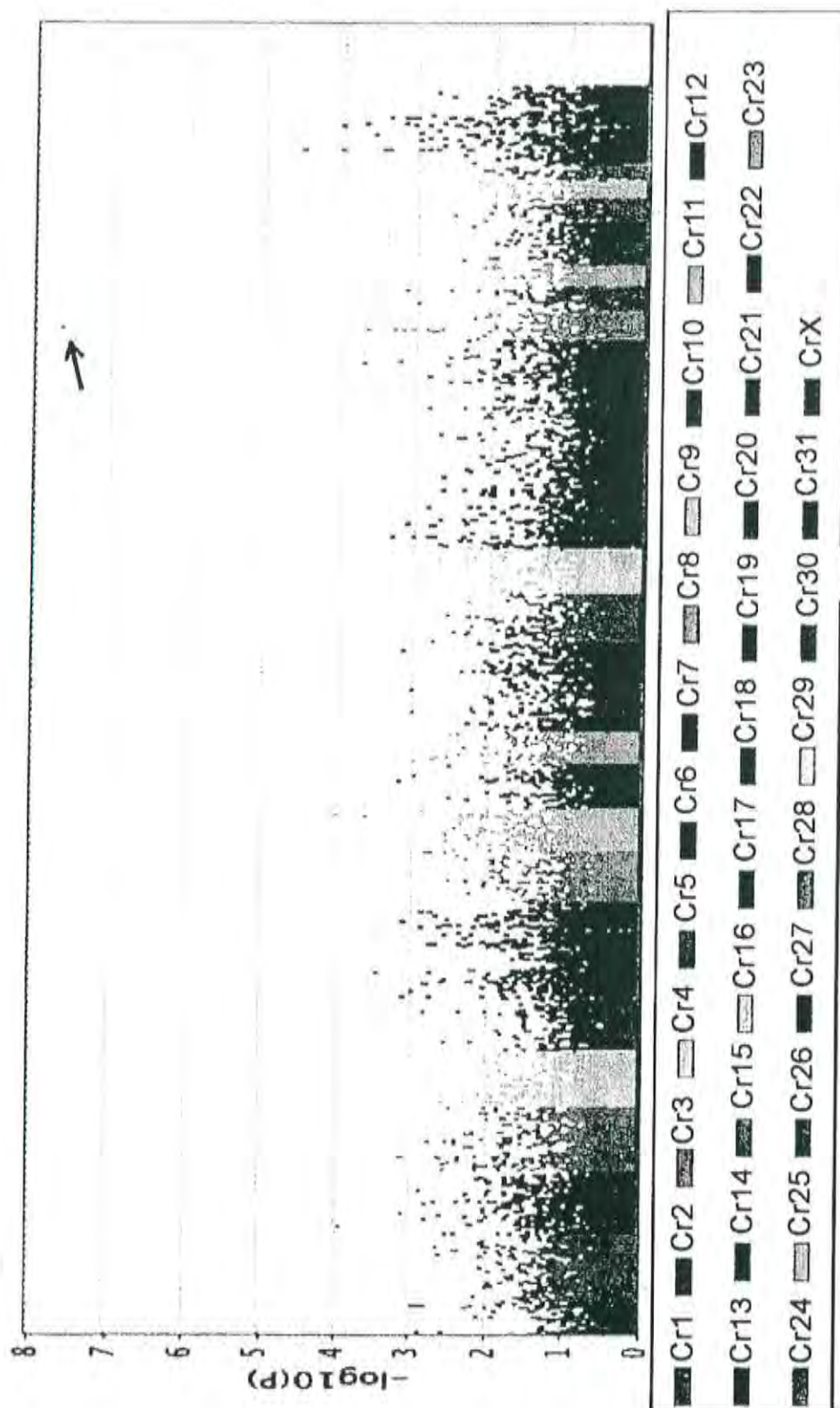


Figura 2

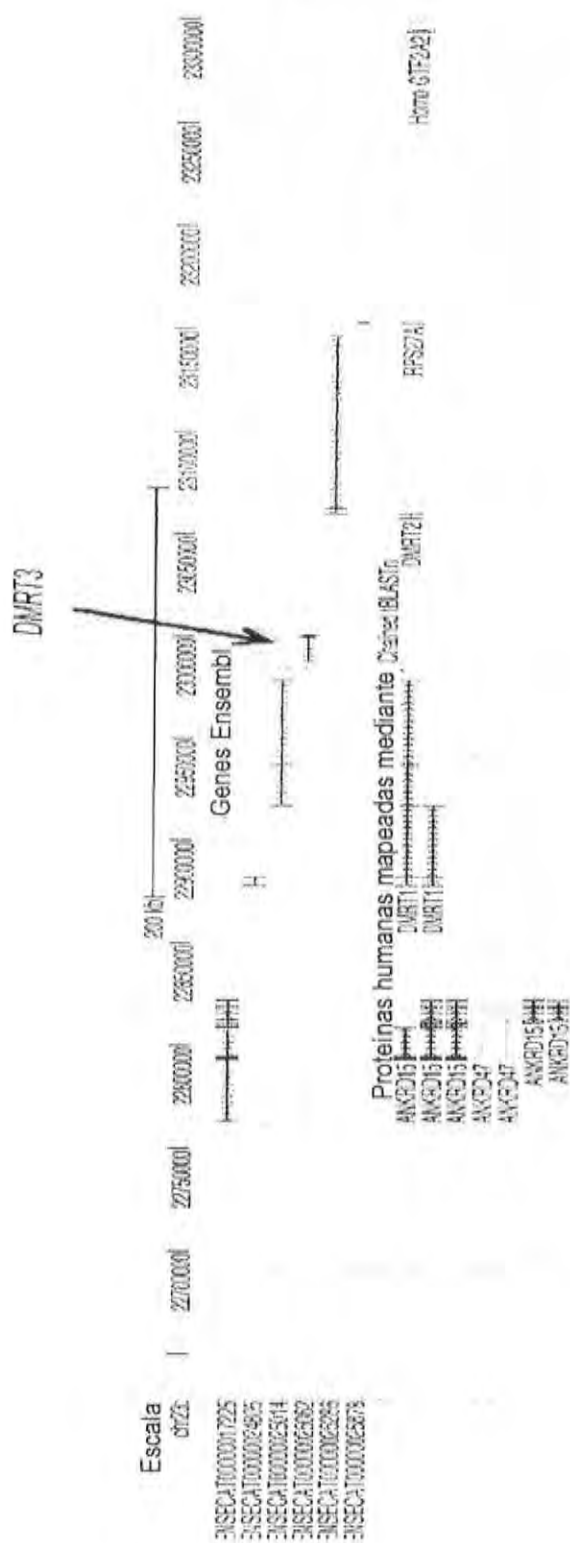


Figura 3

	301										
	A	A	D	R	T	S	A	E	P	E	S
De tipo natural	GCC	GCC	GAC	CGA	ACT	<u>TCG</u>	GCA	GAG	GAG	CCC	GAG AGC
	A	A	D	R	T	Terminación					
Mutante	GCC	GCC	GAC	CGA	ACT	<u>TAG</u>	GCA	GAG	CCC	GAG	AGC

Figura 5

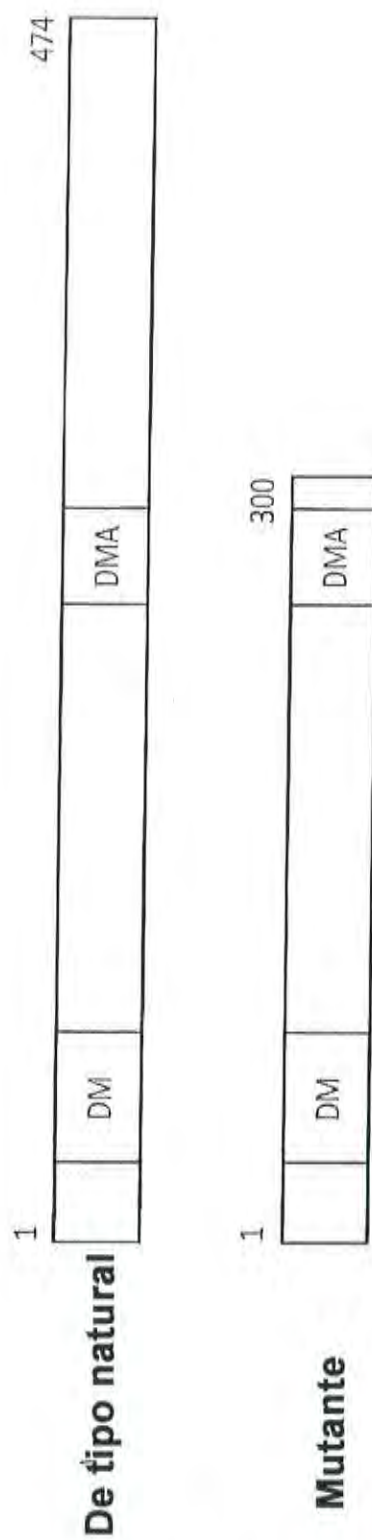


Figura 6

DMRT3 WT	X		X	X		X	X	X	X
DMRT3 MUT		X	X		X	X	X	X	
Ac anti-MYC					X		X	X	
Ac anti-DMRT3				X		X		X	
Oligonucleótido frío									X

