

Diss. ETH Nr. 9846

**Diagnose der Halothanempfindlichkeit des Schweines
durch die Identifizierung von Polymorphismen
im Gen eines Kalziumfreisetzungskanals
mit molekulargenetischen Methoden**

ABHANDLUNG
zur Erlangung des Titels
DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN
der
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE
ZÜRICH

vorgelegt von
ROGER BOLT
Dipl. Ing.-Agr. ETH
geboren am 30. Juni 1962
von Zürich und Nesslau(SG)

Angenommen auf Antrag von
Prof. Dr. G. Stranzinger, Referent
PD Dr. P. Vögeli, Korreferent
Dr. H. R. Fries, Korreferent

Zürich 1992

Zusammenfassung

Das Schweinestressyndrom (PSS) ist eine Erbkrankheit. Sie verursacht für den Züchter und die Fleischindustrie grosse Verluste durch vorzeitige Tierabgänge und schlechtere Fleischqualität. Das PSS wird durch einen autosomalen Genort (Halothanlocus) mit den Allelen N und n kontrolliert. PSS positive Tiere konnten bis anhin mit dem Halothantest erkannt werden. Trägertiere jedoch mussten in aufwendiger Nachkommenprüfung und Haplotypisierung mit Markerloci identifiziert werden.

Beim Menschen wurde im Zusammenhang mit der Narkose ein ähnliches Syndrom beobachtet. Es wurde als maligne Hyperthermie (MH) bezeichnet. Es kann während und nach der Narkose zum Tod des Patienten führen. Durch die Aehnlichkeit der MH und dem PSS wurde das Schwein als Tiermodell für die Ergründung der MH beim Menschen eingesetzt.

Die Ursache für die MH/PSS scheint ein Defekt des Ca^{2+} Freisetzungsmechanismus im Sarkoplasmatischen Retikulum der Skelettmuskulatur zu sein. Beim Schwein konnte in einem Kandidatengen für die MH/PSS, dem Kalziumfreisetzungskanal Gen (CRC), eine enge Beziehung zwischen der Aminosäuresubstitution Arginin durch Cystein und der MH/PSS nachgewiesen werden. Die Aminosäuresubstitution beruht auf einem Austausch des C Nukleotides durch ein T Nukleotid an der Position 1843 (Fujii et al., 1991). Die Kausalität der MH/PSS beim Schwein scheint durch diese Mutation gegeben.

In dieser Arbeit wurde die Kopplungsbeziehung der C zu T Punktmutation mit der MH/PSS beim Schweizerischen Veredelten Landschweines, der UFA90 Rasse und weiteren, verschiedenen ausländischen Landrassen überprüft. Dabei konnte die gemeinsame Segregation des T Nukleotides der Punktmutation mit dem HAL^N , bez. des C Nukleotides mit dem HAL^N bestätigt werden. Im weiteren konnten durch die Bestimmung der genomischen Sequenz am 3' Ende des CRC Genes 6 Exone lokalisiert werden. In einem Intron wurde dabei ein polymorpher Mikrosatellit mit 5 Allelen (1:148bp; 2:136bp; 3:128bp; 4:96bp; 5:142bp) entdeckt. Segregationsanalysen zeigten, dass das T Nukleotid der Punktmutation immer mit dem Allel 4 des Mikrosatelliten erscheint.

Insgesamt wurden Familien mit 553 Tieren untersucht. Von 392 Schweinen ist die Halothanreaktion bekannt. Davon sind 68 Tiere halothanpositiv. Mit Ausnahme von einem Tier, sind diese Tiere alle homozygot für das T Nukleotid der Punktmutation und für das Mikrosatellitenallel 4. Nur 3 Tiere, die nicht auf den Halothantest reagierten, sind homozygot für das T Nukleotid der Punktmutation und für das Mikrosatellitenallel 4.

Summary

Porcine stress syndrome (PSS) is a heritable skeletal muscle disorder which causes economic losses for breeders and thus reduced available to the pork industry. PSS is theoretically controlled by an autosomal locus called Halothane (HAL), with the two alleles N and n. Homozygous n/n animals are recognizable by the *in vivo* halothane test. Heterozygous animals are detected by progeny testing and by additional haplotyping of linked markers.

A similar disease occurs in man in conjunction with a narcotic treatment known as malignant hyperthermia (MH). Because of the similarity of the two diseases, MH and PSS, the pig has become an excellent animal model for investigation of MH in man.

The primary etiology of MH/PSS is a defect in the Ca²⁺ triggering mechanisms in the sarcoplasmic reticulum in skeletal muscle. In the gene for a calcium release channel (CRC), an amino acid substitution from Arginin to Cystein at position 615 caused by a point mutation from the nucleotide Cytosine (C) to the nucleotide Thymine (T) was found to be the causal mutation for MH/PSS in pigs.

In this work, studies between the C to T mutation and the halothane genotype and the haplotype of the halothane linkage group (S-HAL-PHI-H-A1BG-PGD) has been performed in different families of European Landraces. Cosegregation of the T and C nucleotide with the HALⁿ and HAL^N allele was confirmed. The genomic sequence for the 3' end of the CRC gene revealed 6 exons. In one of the introns a microsatellite (MBCRC1) with 5 alleles (1:148bp; 2:136bp; 3:128bp; 4:96bp; 5:142bp) was detected. Segregation analysis showed that the C to T mutation was linked with the MBCRC1⁴ allele.

In summary, a total of 553 pigs were examined. The halothane reaction was performed on 392 animals and 68 were found to be halothane sensitive. All halothane positive pigs, with the exception of one, were found to be homozygous for the T nucleotide mutation and for the MBCRC1⁴ allele. Of the 324 halothane negative animals only 3 were homozygous T/T and 4/4.