

Abschlussbericht zum Forschungsprojekt:

Gentestentwicklung zur Eradikation der Caroli-Leberfibrose (CLF) beim Freiberger Pferd

1. Darstellung der Forschungsarbeit

Stammbaumanalysen

Durch die gute Zusammenarbeit mit dem Nationalgestüt und dem Freibergerzuchtverband konnten wir die Stammbäume von insgesamt 24 CLF-Fällen rekonstruieren (Abbildung 1). Diese Arbeiten zeigen deutlich, dass der Hengst Elu (02119640001 FM A/F 1964 SBC) Anlageträger für CLF war, denn er hatte ein nachweislich betroffenes Fohlen (Rita, 05519881077 FM A/F 05.02.1988). Da Elu insgesamt etwa 500 Nachkommen hatte, von denen fast 200 wiederum in die Zucht gingen, hat Elu massgeblich zur Verbreitung der CLF-Mutation in der Freibergerpopulation beigetragen. Gleichzeitig zeigt unsere Analyse, dass Elu nicht das Gründertier dieser Erbkrankheit gewesen sein kann, sondern, dass die Mutation einige Generationen vor Elu entstanden sein muss.

Alle betroffenen Fohlen, deren Stammbäume wir rekonstruieren konnten, sind auf den 1929 geborenen Hengst Wigar ingezüchtet. Daher erscheint dieser Hengst im Moment als das wahrscheinlichste Gründertier. Hier muss aber betont werden, dass diese Aussage einer hohen Unsicherheit unterliegt, da so weit zurück natürlich extrem viele Ahnen berücksichtigt werden müssen. Bereits eine einzige falsche Abstammung in den Aufzeichnungen kann dabei zu fehlerhaften Schlussfolgerungen führen.

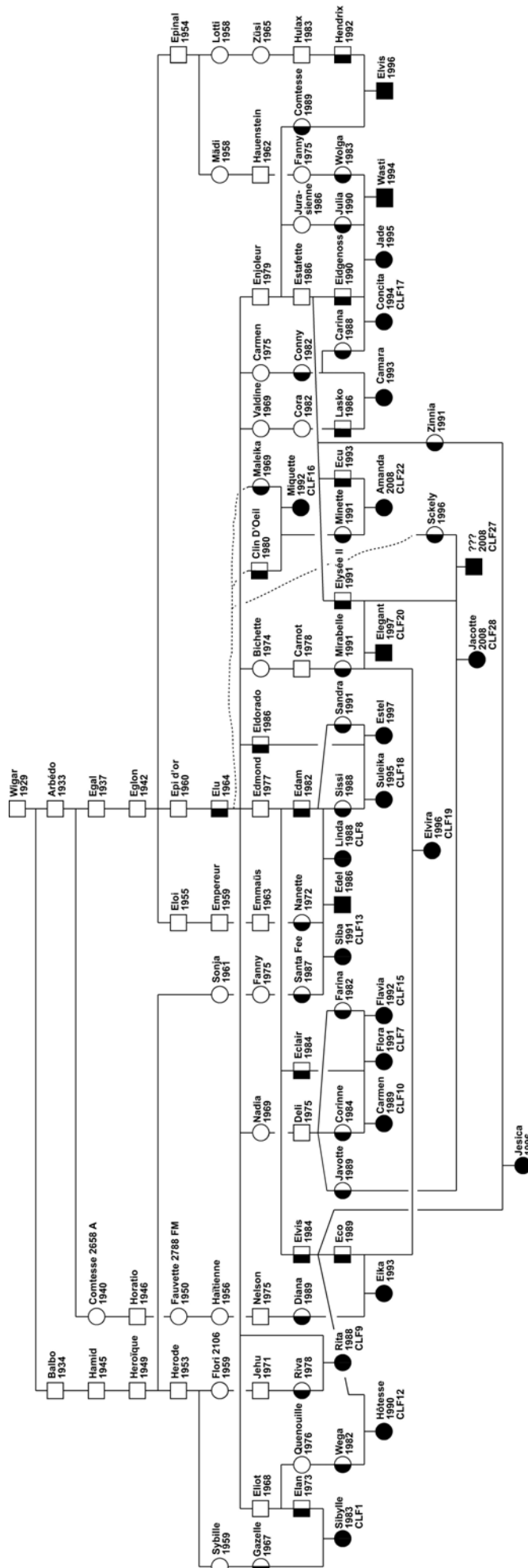


Abbildung 1: Stammbaum der an CLF erkrankten Freiburger Fohlen. Ausgefüllte Symbole repräsentieren erkrankte Fohlen. Betroffene Tiere, von denen eine Probe für die DNA-Analyse verfügbar ist, wurden mit einer "CLF-Nummer" bezeichnet. Offene Symbole repräsentieren nicht-betroffene Pferde. Halb ausgefüllte Symbole repräsentieren obligate Anlageträger, da diese Tiere betroffene direkte Nachkommen hatten. Von insgesamt 24 CLF-Fohlen konnten die Stammbäume ermittelt werden. Alle betroffenen Tiere weisen den 1929 geborenen Hengst Wigar als Vorfahren sowohl in der mütterlichen als auch der väterlichen Seite als Vorfahren auf. Daher erscheint Wigar als das wahrscheinlichste Gründertier. Sollte diese Hypothese zutreffen, dann sind alle nicht betroffenen Tiere in dieser Abbildung Anlageträger für CLF. Der Hengst Elu war ein wichtiger Vererber in der Freiburgerzucht und hat die CLF-Mutation vermutlich weit gestreut. Aus Platzgründen konnten bei drei obligaten Trägern nicht alle relevanten Vorfahren dargestellt werden. Diese drei Tiere gehen alle auf Elu zurück und die Verbindungen sind durch gestrichelte Linien angedeutet. Die Tiere CLF22, CLF27 und CLF28 wurden für die Genotypisierung auf dem SNP-Chip zur Homozygotiekartierung verwendet.

Homozygotie-Kartierung der CLF-Mutation

Wie im Antrag beschrieben wurden drei an CLF erkrankte Fohlen, von denen Blutproben verfügbar waren, auf dem Pferde SNP-Chip genotypisiert (illumina SNP50 equine BeadChip; 54'602 SNPs). Die Genotypen wurden mit dem Programm plink auf ausgedehnte homozygote Bereiche untersucht. Dabei zeigte sich, dass vier ausgedehnte Genomregionen auf den Chromosomen 1, 15, 20 und 23 bei diesen CLF-Fohlen homozygot die gleichen SNP-Allele aufwiesen (Abbildung 2).

Zur weiteren Kartierung wurden für jede der vier identifizierten Regionen mehrere Mikrosatellitenmarker entwickelt. Diese Mikrosatellitenmarker wurden an allen verfügbaren DNA-Proben von CLF-Fohlen sowie an 18 gesunden Freiberger Pferden genotypisiert. Von den meisten der CLF-Fohlen musste die DNA hierzu aus Formalin-fixierten Paraffinblöcken isoliert werden, was bei 23 Proben gelang und recht ordentliche Ergebnisse lieferte. Auf den Chromosomen 1, 15 und 23 zeigten die CLF-Fohlen eine ähnliche genetische Vielfalt wie die Kontrollpferde. Dagegen zeigte die Region auf Chromosom 20 bei den CLF-Fohlen eine wesentlich geringere genetische Vielfalt als die Kontrollpferde. Ein Mikrosatellit in dieser Region war bei allen 23 erfolgreich typisierten CLF-Fohlen homozygot für das gleiche Allel, während nur eines der 18 getesteten Kontrollpferde homozygot war. Die Mikrosatelliten-Analyse ergab letztlich, dass die CLF-Mutation auf dem Pferdechromosom 20 in der Region von 46.237 – 51.027 Mb liegt.

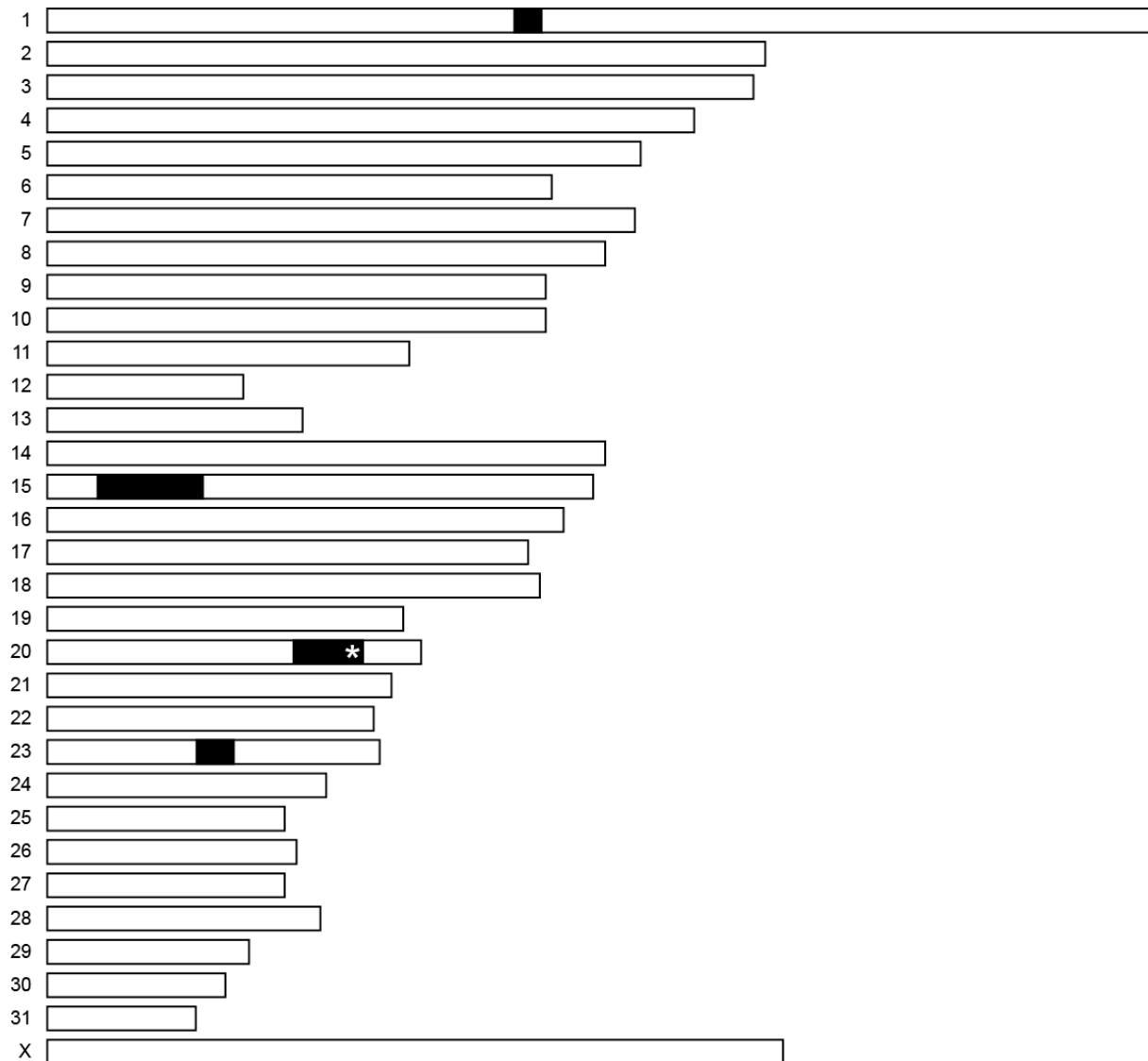


Abbildung 2: Homozygotie-Kartierung der CLF-Mutation. CLF wird monogen autosomal rezessiv vererbt und die betroffenen Fohlen sind alle auf bekannte CLF-Träger ingezüchtet. Daher ist zu erwarten, dass erkrankte Fohlen nicht nur an der ursächlichen Mutation selbst, sondern auch in den benachbarten Genomregionen abstammungsidentische (IBD) Allele im homozygoten Zustand tragen. Für das Experiment wurden drei an CLF erkrankten Fohlen für jeweils 54'602 gleichmässig über das Genom verteilte SNPs genotypisiert. Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung des Pferdegenoms mit 31 Autosomen und dem X-Chromosom. Lediglich vier grössere Genomregionen waren bei den untersuchten Fohlen homozygot. Diese Regionen sind schwarz dargestellt. Diese Regionen wurden mit Hilfe von Mikrosatelliten an ca. 20 weiteren betroffenen Fohlen charakterisiert. Dabei zeigte sich, dass nur die Region auf Chromosom 20 wirklich bei allen an CLF erkrankten Fohlen homozygot war. Das kartierte kritische Intervall umfasst 4.8 Mb ($\approx 0.2\%$ des gesamten Genoms) und ist durch ein Sternchen hervorgehoben.

Untersuchung von Kandidatengen

Das gesamte Genom des Pferds enthält etwa 20'000 Gene. In der fraglichen Genomregion auf Chromosom 20 sind beim Pferd 38 Gene annotiert. Da beim Pferde die Annotation der Genomsequenz relativ viele Fehler enthält, haben wir diese Region des Pferdegenoms mit den Genomen von Mensch und Maus verglichen, um eine möglichst vollständige und richtige Annotation zu erhalten. Unter den Genen dieser Region befindet sich das „Polycystic Kidney and Hepatic Disease 1“ Gen (*PKHD1*). Mutationen in diesem Gen führen zu Zystenbildung in Niere und Leber bei Menschen und Ratten. Je nach Lage der Mutation im Gen gibt es bei den menschlichen Patienten auch solche, bei denen die Zystenbildung praktisch ausschliesslich die Leber betrifft. Aufgrund der starken Ähnlichkeit der Symptome halten wir es für sehr wahrscheinlich, dass eine Mutation im *PKHD1* Gen auch für die Caroli-Leberfibrose bei Freiberger Pferden verantwortlich ist.

Mutationsanalyse des *PKHD1* Gens

Das *PKHD1* Gen ist eines der grössten und kompliziertesten Gene des Genoms. Auf genomischer DNA umspannt es etwa 500 kb. Es gibt verschiedene alternative Transkripte, die auch bei Mensch oder Maus nicht vollständig charakterisiert sind. Beim Menschen sind bis jetzt mindestens 86 verschiedene Exons identifiziert worden. Es ist jedoch auch beim Mensch bis heute nicht klar, wieviele verschiedene Transkripte exprimiert werden. Die meisten Transkripte enthalten etwa 15'000 Nukleotide und kodieren für Proteine mit über 4'000 Aminosäuren.

Über Homologievergleiche zum Menschen haben wir beim Pferd 67 Exons des längsten bekannten offenen Leserahmens identifiziert. Diese Exons wurden zusammen mit flankierenden Bereichen einer Mutationsanalyse unterzogen. Hierzu amplifizierten und sequenzierten wir diese Bereiche an 2 CLF-Fohlen, einem CLF-Träger und einem unverwandten Freiberger Kontrollpferd. Insgesamt fanden wir 113 Variationen in diesen vier Tieren. Von diesen 113 Variationen waren 18 mit dem Phänotyp assoziiert, d.h. die beiden CLF-Fohlen waren homozygot für das abgeleitete Allel, der CLF-Träger war heterozygot und das unverwandte Kontrollpferd war homozygot für das Allel der Referenz-Genomsequenz. Von den 18 assoziierten Polymorphismen lagen 10 in Exons und 6 führten zu Aminosäureaustauschen. Diese 6 nicht-synonymen Polymorphismen wurden an weiteren Tieren genotypisiert (Tabelle 1).

Tabelle 1. Assoziation von sechs *PKHD1* Polymorphismen mit CLF bei ausgewählten Freibergern

Exon	Polymorphismus	Genotyp	CLF betroffen	CLF-Träger	Unverwandte Kontroll-FM
5	c.317A>G p.Glu106Gly	A/A	6	4 2	4
		A/G			9
		G/G			5
18	c.1679G>A p.Arg560Glu	G/G	3	4 2	3
		A/G			8
		A/A			5
32	c.3733G>A p.Glu1245Lys	G/G	3	1	4
		A/G			3
		A/A			3
32	c.4471G>T p.Ala1491Ser	G/G	2	4 2	4
		G/T			11
		T/T			3
37	c.6094C>T p.His2032Tyr	C/C	7	6	10
		C/T			8
		T/T			8
43	c.6872T>A p.Ile2291Asn	T/T	21	6	10
		A/T			8
		A/A			8

Zwei Polymorphismen im *PKHD1* Gen, nämlich c.6094C>T und c.6872T>A, waren auch in der vergrößerten Stichprobe perfekt mit dem CLF-Phänotyp assoziiert (grau unterlegt in Tabelle 1). Diese beiden Polymorphismen wurden daraufhin an weiteren Pferden genotypisiert (Tabelle 2).

Tabelle 2. Assoziation von zwei *PKHD1* Polymorphismen mit CLF

Exon	Polymorphismus	Genotyp	CLF betroffen	CLF-Träger	Kontroll-FM	Kontrollen, andere Rassen
37	c.6094C>T p.His2032Tyr	C/C	7	6	183	39
		C/T			25	9
		T/T				
43	c.6872T>A p.Ile2291Asn	T/T	21	6	354	39
		A/T			42	9
		A/A				

Auch in diesen sehr grossen Kohorten waren die beiden Polymorphismen immer noch perfekt assoziiert. Allerdings fanden wir die mutierten Allele auch bei anderen Pferderassen (jedoch nie im homozygoten Zustand). Wir gehen davon aus, dass die

CLF-Mutation relativ jung ist und nur in der Freiberger-Rasse vorkommen sollte. Daher deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die beiden Polymorphismen mit grösster Wahrscheinlichkeit nicht die ursächlichen Mutationen darstellen. Sie repräsentieren vermutlich stattdessen neutrale DNA-Marker, die im starken Kopplungsungleichgewicht (linkage disequilibrium) mit der kausalen CLF-Mutation stehen.

Ausblick

Da die Caroli-Leberfibrose beim Freiberger Pferd ausschliesslich die Leber und nicht die Niere betrifft, vermuten wir, dass die CLF-Mutation in einem Exon des *PKHD1* Gens lokalisiert ist, welches nur in einem Leber-spezifischen Transkript enthalten ist. Da die Exons und gewebsspezifischen Expressionsmuster der einzelnen *PKHD1* Transkripte nicht vollständig bekannt sind, können wir im Moment auf genomischer DNA nicht weiter nach der ursächlichen Mutation suchen. Dazu müsste das *PKHD1* Gen zuerst vollständig beim Pferd annotiert werden. Wir hoffen, dass dies im Zuge der Fortführung des Pferdegenomprojekts durch die internationale Wissenschaftsgemeinschaft erfolgen wird. Allerdings kann das noch mehrere Jahre dauern.

Ein weiterer Ansatz wäre die Mutationsanalyse statt auf genomischer DNA direkt auf cDNA vorzunehmen. Da cDNA aus mRNA hergestellt wird, welche extrem empfindlich ist und schnell degradiert, benötigen wir dazu jedoch mindestens eine frische Leber von einem an CLF erkrankten Fohlen. Wir haben hierzu Aufrufe an Pferdetierärzte und den Freiberger-Zuchtverband gerichtet, damit uns CLF-verdächtige Fohlen noch vor der Euthanasie oder Schlachtung gemeldet werden.

Obwohl derzeit die ursächliche CLF-Mutation noch unbekannt ist, belegen unsere Daten doch eindrücklich, dass es uns gelungen ist, die Mutation im Genom präzise zu lokalisieren und das vermutlich betroffene Gen zu identifizieren. Die beiden *PKHD1* Polymorphismen in Exon 37 und Exon 43 können für einen Markertest zur Selektion eingesetzt werden. Da der Marker in Exon 37 im Labor schwierig zu typisieren ist, empfehlen wir die Typisierung des c.6872T>A Polymorphismus in Exon 43 als Markertest für CLF beim Freiberger. Unsere Daten weisen darauf hin, dass Pferde, die dort den Genotyp T/T aufweisen, mit allergrösster Wahrscheinlichkeit wirklich frei von der Anlage für CLF sind (Sensitivität nahe 100%). Möglicherweise werden einige wenige Tiere, die im Markertest mit A/T getestet und als CLF-Träger deklariert werden, in Wirklichkeit frei von der Anlage für CLF sein (Spezifität <100%).

Aufgrund des geringen physischen Abstands zwischen dem Marker und der CLF-Mutation von weniger als 0.2 Mb (~0.2 cM) sind jedoch Rekombinationen zwischen Marker und ursächlicher CLF-Mutation extrem unwahrscheinlich. Wir kennen inzwischen die Genotypen vieler bedeutender FM-Hengste und der meisten CLF-Träger der letzten 20 Jahre. Daher erlaubt der Markertest zusammen mit der Pedigree-Information zu testender Tiere eine ausserordentlich hohe Testsicherheit von mindestens 98%.

Umsetzung in die Praxis

Wir bieten den Markertest als Dienstleistung zum Selbstkostenpreis an. Damit können in Zukunft CLF-Träger identifiziert und so Risiko-Anpaarungen zwischen zwei Trägern vermieden werden. Der entwickelte Markertest erlaubt ebenfalls, das schädliche Allel aus der Freiburger-Population zu eliminieren.

Webseiten

Untersuchungsanträge und Informationen für die Allgemeinheit können auf den Webseiten des Instituts für Genetik heruntergeladen werden:

deutsch:

http://www.genetics.unibe.ch/content/dienstleistung/pferd/index_ger.html

englisch:

http://www.genetics.unibe.ch/content/service/horse/index_eng.html

2. Erfolgte Publikationen

1. M Drögemüller, M Welle, R Straub, P-A Poncet, S Rieder, C Drögemüller, T Leeb (2009) Genetische Analyse der kongenitalen Leberfibrose (CLF) mit intrahepatischen Gallengangszysten bei Freiburger Pferden. Poster auf der 4. Jahrestagung Netzwerk Pferdeforschung Schweiz in Avenches, Schweiz, 30.04.2009.
2. M Drögemüller, C Drögemüller, M Welle, R Straub, P-A Poncet, S Rieder, T Leeb (2009) Mapping of Caroli liver fibrosis (CLF) in Franches-Montagnes horses. Vortrag auf dem 8th Dorothy Russell Havemeyer International Equine Gene Mapping Workshop in Ickworth, Grossbritannien, 22. – 25.07.2009.
3. H Hasler, C Flury, S Reist, M Braunschweig, G Dolf, C Drögemüller, M Drögemüller, B Haase, J Klukowska-Rötzler, D Burger, P-A Poncet, S Rieder, T Leeb (2009) Aktuelle Beispiele der Tierzuchtforschung in der Schweiz. *Agrarforschung* 16 (9), S. 336-341. (Übersichtsarbeit)