

**Refined candidate region for Arthrogyposis multiplex congenita (AMC)
and inheritance of Humpy Back, Splay Leg and AMC-like phenotypes in pigs**

A dissertation submitted to
ETH Zurich

for the degree of
Doctor of Sciences

presented by
Monika Haubitz
Dipl. Natw. ETH Zurich

born 4th of October 1979
citizen of Würenlos, Aargau

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Peter Vögeli, examiner
Prof. Dr. Michael Kreuzer, co-examiner
PD Dr. Stefan Neuenschwander, co-examiner
Dr. med. vet. Xaver Sidler, co-examiner

Summary

In pigs (*Sus scrofa*), arthrogryptic symptoms are caused by environmental and genetic factors. This study presents a monogenetic autosomal recessively inherited Arthrogryposis multiplex congenita (AMC) disease. The symptoms of AMC are persistent flexion of the limbs evident at birth, spinal curvatures and shortening of the lower jaw. The diseased piglets die during the birth process. Apart from AMC, they are full-term piglets of normal size. AMC spread through the Swiss Large White population because of a boar that was widely used for artificial insemination. An experimental herd that had AMC carriers was initiated for research purposes. Sem Genini started the project and mapped *amc* to a region on porcine chromosome 5 (SSC5), between the microsatellite markers *SW152* and *SW904*, a region of 5.15 Mb (Genini 2006). Genini also established the first AMC genotyping test. Several genes in the AMC candidate region have been partially sequenced, in order to identify informative markers and also, eventually, to find the causative mutation. As soon as the porcine SNP chip (with 60'000 SNPs) was available, 16 pigs were analysed. The SNP chip resulted in supplemental informative markers in the AMC candidate region. Pigs from the experimental herd were genotyped with the markers in and around the region of interest. Then, to further refine the AMC candidate region, the haplotypes of informative, possibly recombinant, pigs were determined. By combining the recombined haplotypes found in two pedigrees with recombined pigs, the candidate region could be refined to a 2.32 Mb region between the two SNPs *ALGA0032767* and *DRGA0006010*. The first DNA-based test for AMC included the microsatellite markers *bE77C1SP6* and *SW904*. The improved AMC test used *bE77C1SP6* and *AMC-SNP-1* for commercial breeds and only *AMC-SNP-2* for samples from the experimental herd. After excluding AMC carriers, identified with the test, from commercial breeding in Switzerland, AMC cases decreased significantly. The narrowed AMC candidate region contained only genes mapped on the syntenic region of human chromosome 12 (HSA12q12). Six positional candidate genes could be identified in the narrowed candidate region: *KIF21A*, *ABCD2*, *SLC2A13*, *LRRK2*, *MUC19* and *C12orf40*. Of these candidate genes, gene *ABCD2* has been partially sequenced and sequences variations were identified. However, the causative AMC mutation, *amc*, has not yet been identified.

Humpy back (HB) is an abnormal posture observed in weaned pigs. Affected pigs show thoracic lordosis and lumbar kyphosis that appears at three weeks of age and lasts until four months of age. Diverse cases of kyphotic and lordotic pigs have been described and many differential diagnoses are possible. Our theory was that if HB has a genetic cause, the number of HB pigs should increase or/and the phenotype should be more severe in an inbred herd. To test this theory, we bred a small experimental herd with former HB pigs. The physical condition of the grown HB pigs was characterised by a stiffened back. In general, our pigs were commercially acceptable as far as growth performance and body size. Even with matings of former HB pigs, HB remained rare and about three quarters of the litters were completely healthy. We observed that the HB phenotype was most obvious in the week after weaning, when physical stress was increased. In the last generation, we reached an inbreeding coefficient of 0.5. We analysed the pedigrees of 37 HB piglets born in 65 litters; a total

of 688 piglets were born in the experimental herd. No differences were noted in the occurrence of HB between the more inbred or less inbred litters.

Congenital splay leg (SL) is a common malfunction in the limbs of newborn piglets. Litters of all pig breeds are affected more or less frequently. Physiologically, SL has been described as congenital paresis of the hind limbs, and rarely, also the fore limbs. Several theories about the condition have been confirmed or disproved, depending on breed and test setup. Our theory was that if SL is caused genetically, the number of SL piglets in an inbred herd should increase and/or the phenotype should be more severe. To test the theory, we bred a small experimental herd with former SL piglets. The physical condition of the grown SL piglets was characterised by weak hind limbs, particularly at higher bodyweight, making it difficult to breed with these pigs. In our experimental herd, we produced fully healthy litters, even in matings of former SL piglets. We reached a maximal inbreeding coefficient of 0.46875 in the experimental herd. Altogether, 293 piglets were born in 28 litters. Of these piglets, 39 were SL diseased. There were no significant differences in the occurrence of SL between the more or less inbred litters. Therefore, we excluded a monogenetic inheritance of SL.

In pigs (*Sus scrofa*), arthrogryptic symptoms are caused by environmental and genetic factors. A probably inherited congenital malformation that resembles AMC was examined. The first cases of this AMC-like malformation were identified in a litter analysed with the AMC genotyping test. None of the alleles associated with AMC were found in either the parents or in the litter. This mating was repeated and again a piglet showing the same malformations was born. In addition to the symptoms of AMC (which include persistent flexion of the limbs present at birth, spinal curvatures, shortening of the lower jaw and stillbirth), these piglets presented underdeveloped hips and a malformed skull. Apart from these symptoms, the piglets were full-term and of normal size. For research purposes an experimental herd with littermates of the AMC-like piglets was established. However, due to the physical state and fertility problems, breeding was difficult. Until now, no such piglets have been born at the Chamau experimental research station.

Zusammenfassung

Im Schwein (*Sus scrofa*) können arthrogryposis-artige Symptome durch umweltbedingte oder durch genetische Faktoren ausgelöst werden. In dieser Arbeit wird eine monogenetisch, autosomal rezessiv vererbte Arthrogryposis multiplex congenita (AMC) vorgestellt. Die Symptome von AMC sind angeborene versteifte Gelenke, Rückgratverkrümmung und ein verkürzter Unterkiefer. Die betroffenen Ferkel sterben während ihrer Geburt. Abgesehen von den Missbildungen sind die Ferkel voll entwickelt und weisen ein normales Gewicht auf. Im Bestand des Schweizer Edelschweins breitete sich AMC durch einen Eber aus, der in der künstlichen Besamung eingesetzt wurde. Zu Forschungszwecken wurde eine Zuchtgruppe für AMC etabliert. Das Projekt wurde von Sem Genini begonnen. Er konnte *amc* einer 5.15 Mb Region auf Schweinechromosom 5 (SSC5), zwischen den Mikrosatellitenmarkern *SW152* und *SW904*, zuordnen. Ausserdem entwickelte er den ersten AMC Genotypisierungstest. Mehrere Gene in der AMC-Kandidatenregion wurden teilweise sequenziert, zum einen, um informative Marker zu finden und zum anderen, um die ursächliche Mutation zu identifizieren. Nachdem ein SNP Chip (mit 60'000 SNPs) für Schweine erhältlich war, analysierten wir 16 Schweine aus unserer Versuchsherde. Der SNP Chip lieferte uns zusätzliche informative Marker in der AMC Kandidatenregion. Die Schweine der experimentellen Herde wurden nun mit den Markern in und um die Kandidatenregion genotypisiert. Zur Verkleinerung der Region wurden die Haplotypen von informativen und eventuell rekombinanten Schweinen bestimmt. Für den ersten AMC-Genotypisierungstest verwendeten wir die Mikrosatellitenmarker *bE77C1SP6* und *SW904*. Der verbesserte AMC Genotypisierungstest bestand aus *bE77C1SP6* und *AMC-SNP-1*, welche für Tiere aus der kommerziellen Zucht verwendet werden und *AMC-SNP-2* wird als einziger Marker für die experimentelle Herde verwendet. Durch konsequentes Ausschliessen von AMC-Trägern aus der kommerziellen Zucht konnte die Anzahl der AMC-Fälle in der Schweiz stark reduziert werden. Durch den Vergleich der Haplotypen zweier Stammbäume mit rekombinanten Tieren konnte die AMC Kandidatenregion auf eine Region von 2.32 Mb zwischen den SNPs *ALGA0032767* und *DRGA0006010* eingegrenzt werden. In der AMC-Kandidatenregion befinden sich somit nur noch wenige Gene. Die Region zeigt Syntenie mit dem humanen Chromosom 12 (HSA12q12). Die sechs positionellen Kandidatengene *KIF21A*, *ABCD2*, *SLC2A13*, *LRRK2*, *MUC19* und *C12orf40* wurden in der Region identifiziert. Von diesen Kandidatengenen wurde das Gen *ABCD2* bereits teilweise sequenziert und so wurden Sequenzvarianten identifiziert. Die AMC-auslösende Mutation, *amc*, wurde bis jetzt nicht identifiziert.

Senkrücken (HB) ist eine Körperfehlhaltung, welche bei Absetzferkeln beobachtet werden kann. Zwischen der dritten Woche und dem vierten Monat zeigen betroffene Ferkel thorakale Lordosis und lumbale Kyphosis. Verschiedenste Fälle von Kyphosis und von Lordosis in Schweinen wurden beschrieben mit genau so vielen verschiedenen Diagnosen. Unsere Annahme war, wenn ein HB genetischen Ursprungs ist, sollte die Anzahl Ferkel mit HB in einer Inzuchtherde ansteigen und/oder der Phänotyp sollte sich verstärken. Um diese Frage zu klären, wurde eine kleine Zuchtgruppe mit ehemals von HB Symptomen betroffenen Schweinen

gegründet. Bei ausgewachsenen Tieren zeigte sich noch ein versteifter Rücken aber im Allgemeinen waren unsere Schweine gut in Wachstum und Körpergrösse. Jedoch blieben die HB Fälle selten, auch wenn ehemals Betroffene miteinander verpaart wurden. So gab es auch dann noch viele Würfe ohne jegliche HB Ferkel darin. Der Phänotyp war am deutlichsten in der Woche nach dem Absetzen sichtbar, dann wenn der physische Stress für die Ferkel am grössten war. Am Ende war der Inzuchtkoeffizient in unserer Zuchtgruppe 0.5. Wir werteten die Abstammung von 37 HB Ferkeln aus 65 Würfen aus, im Ganzen wurden 688 Ferkel in der experimentellen Herde erzeugt. Es wurden keine Unterschiede im Auftreten von HB Fällen zwischen den mehr oder weniger ingezüchteten Würfen gefunden.

Kongenitales Ausgrätschen (SL), ist eine häufig Fehlfunktion der Beine bei neugeborenen Ferkeln. Würfe von allen Schweinerassen sind betroffen, manche Rassen mehr, manche weniger. Physiologisch wurde SL als kongenitale Parese der Hinterbeine und seltener auch der Vorderbeine beschrieben. Verschiedenste Annahmen über den Zustand wurden bestätigt und widerlegt, je nach der Rasse und dem Testaufbau. Unsere Annahme war, wenn SL genetischen Ursprungs ist, sollte die Anzahl Ferkel mit SL in einer Inzuchtherde ansteigen und/oder der Phänotyp sollte sich verstärken. Um diese Frage zu klären, wurde eine kleine Zuchtgruppe mit ehemals von SL Symptomen betroffenen Schweinen gegründet. Die ausgewachsenen Tiere zeigten auch weiterhin eine Schwäche der Hinterbeine, ins Besondere bei höherem Körpergewicht, was die Zucht mit diesen Tieren schwierig gestaltete. In der Zuchtgruppe konnten wir vollkommen gesunde Würfe beobachten, obwohl sie aus Paarungen ehemals Betroffener stammten. Schlussendlich erreichten wir einen Inzuchtkoeffizienten von 0.46875 in unserer Zuchtgruppe. Insgesamt wurden 293 Ferkel in 28 Würfen geboren. Von diesen Ferkeln litten 39 an kongenitalem Ausgrätschen. Es wurden keine signifikanten Unterschiede im Auftreten von SL Fällen zwischen den mehr oder weniger ingezüchteten Würfen gefunden. Daher schlossen wir für das kongenitale Ausgrätschen einen monogenetischen Erbgang aus.

Bei Schweinen (*Sus scrofa*) können Arthrogrypose-ähnliche Symptome durch umweltbedingte oder genetische Faktoren induziert werden. Eine womöglich vererbte kongenitale Fehlbildung wurde untersucht, welche grosse Ähnlichkeiten zu AMC aufweist. Die ersten Fälle dieser AMC-ähnlichen Fehlbildung wurden in einem Wurf identifiziert, der zuvor mittels AMC-Genotypisierungstest überprüft wurde. Keines der mit AMC assoziierten Allele wurde gefunden weder in den Eltern noch im Wurf. Die Paarung wurde wiederholt und auch in der Wiederholung wurde ein Ferkel mit den gleichen Missbildungen geboren. Zusätzlich zu den Symptomen von AMC (angeborene versteifte Gelenke, Rückgradverkrümmung, ein verkürzter Unterkiefer und Totgeburt) zeigten diese Ferkel eine unterentwickelte Hüfte und einen fehlgebildeten Schädel. Abgesehen von den Missbildungen sind die Ferkel voll entwickelt und von normalem Gewicht. Zu Forschungszwecken wurde eine Zuchtgruppe mit Wurfgeschwistern dieser AMC-ähnlichen Ferkel aufgebaut. Auf Grund physischer und Fertilitäts-bedingter Gründe, zeigte sich die Zucht dieser Tiere als schwierig. Bis heute gab es keinen Wurf mit diesen missgebildeten Ferkeln auf der Forschungsstation Chamau.