

Agrias och SKKs Forskningsfond
Att. Lena Heimlén

Sluttrapport Agrias och SKKs forskningsfond

Projektets titel och projektnummer

N2016-0031; Identifisering av gener for ataksi og transitional vertebra hos svart elghund

Rapportens författare

Frode Lingaas, prosjektleder

Populärvetenskaplig sammanfattning

Prosjektet har undersøkt to sykdomsproblemstillinger på Norsk Elghund Sort (NES), ataksi og transitional vertebra (TV). For ataksi har vi samlet diagnostiske prøver fra syke hunder og friske kontroller. Gjennom nevrologiske undersøkelser er ataksi hos NES nøye beskrevet. DNA har blitt ekstrahert fra prøvene og prosjektgruppen har gjennomført en helgenoms sekvensering av relevante prøver fra alle tre kull. Deretter har vi identifisert genetiske varianter og sett om noen kan være assosiert med sykdommen. Foreløpig har vi ikke identifisert en enkelt mutasjon som har sammenheng med ataksi hos de syke valpene, men arbeidet vil fortsette og vi håper at vi snart vil identifisere en assosiert mutasjon.

TV er en sykdom som angår hoftelæddet hos hunder. Dette er en sammenvoksing av beinstrukturer i lumbosacral-regionen. Slike forandringer kan diagnostiseres i forbindelse med rutinemessig HD-røntgning av hunder. Prosjektgruppen har diagnostisert en rekke TV-affiserte hunder og hunder uten symptomer. Deretter har vi ekstrahert DNA-materiale fra et stort antall av disse hundene. Vi har så studert genetiske markører som dekker alle hundens gener, og det er gjennomført genetiske analyser for å finne assosierte mutasjoner. Foreløpig analyser har ikke påvist markører som har en sikker sammenheng. Arbeidet vil fortsette for å samle flere hunder med TV fra NES for å få et enda bedre grunnlag for å identifisere assosierte markører.

Inledning, bakgrund, syfte och frågeställning

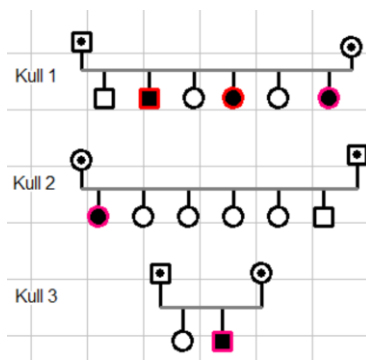
De siste årene har det dukket opp flere tilfeller av ataksi hos 4-5 uker gamle hunder av rasen Norsk Elghund Sort (NES). Dette viste seg særlig som ustøhet i bakparten. Ved 10 ukers alder var de nevrologiske symptomene ganske uttalte. Sykdommen er nylig rapportert fra 3 ulike kull, men sykdommen har også vært studert i rasen på 1970-tallet. Stamtavlestudier viser at sykdommen trolig har en enkel recessiv nedarving. Prosjektgruppen ønsket derfor å undersøke DNA fra syke og friske hunder for å identifisere mutasjonen som er assosiert med sykdommen.

Det har også vært rapportert enkelte tilfeller av stivhet og smerter fra bakparten på enkelte NES. I forbindelse med rutinemessig røntgenundersøkelse ble det ofte oppdaget TV hos NES. Prosjektgruppen ønsket derfor å få mer kunnskap om forekomsten av TV i denne rasen samt å legge til rette for genetiske analyser.

Material och metoder

Ataksi

Hundene gjennomgikk en grundig klinisk/nevrologisk undersøkelse, CT og på grunn av de uttalte kliniske symptomer ble syke valper avlivet av dyrevelferdsmessige årsaker. Det ble foretatt full obduksjon og morfologiske undersøkelser. Blodprøver er samlet inn fra tre kull (se figur under) med opptreden av ataksi. Foreldre, syke og frisk valper har vært undersøkt for kliniske blodparametre og hunder med symptomer har gjennomgått en grundig nevrologisk undersøkelse. DNA er ekstrahert fra alle individer og det er gjennomført helgenoms sekvensering (WGS, whole genome sequencing). Vi har deretter gjennomført genomiske undersøkelser for å finne genetiske varianter assosiert med sykdommen



TV

Basert på et utvalg av hunder der det er gjennomført genetiske diagnostiske analyser, og der eierne har godkjent bruk av prøvene til forskning, har vi studert røntgenbilder tatt i forbindelse med HD-røntging og identifisert hunder med og uten TV. Vi har deretter ekstrahert DNA og gjennomført genetisk typing av genetiske markører (SNPs) fra hele genomet (GWAS, genome wide association study) på et materiale av affiserte og friske prøver (total ca 160 hunder).

Resultat

Ataksi

En samlet klinisk undersøkelse av flere kasus med ataksi har gitt en god klinisk kunnskap om ataksi hos NES. De genetiske undersøkelsene med helgenoms sekvensering har fungert godt og har gitt prosjektgruppen viktig teknisk kunnskap om denne teknologien, og erfaring med å lete etter sykdomsassosierte mutasjoner. Fra alle tre kullene har vi sekvensert foreldre, syke valper og friske kullsøsken. Vi har så gjennomført en såkalt «variant calling» som betyr at vi har leitet etter genetiske varianter («mutasjoner») som er assosiert med ataksi. I materiale et det mye genetisk variasjon og foreløpig har vi ikke identifisert unike mutasjoner som står i sammenheng med

sykdommen alle kasus. Analysene vil imidlertid fortsette og vi forventer at materiale skal være av tilstrekkelig kvalitet til at vi vil kunne nå målet i løpet av 2019.

TV

På grunn av materialets størrelse (stort antall prøver) og struktur, har vi ikke gjennomført WGS, men vi har gjennomført en GWAS-analyse slik det er vanlig på denne typen materialer. Vi har foreløpig ikke identifisert assosierte markører som har en sikker assosiasjon til TV. Vi tror at hovedårsaken til dette skyldes at materiale – dvs. total-antall hunder og antall affiserte – har vært for lite. Vi vil derfor fortsette arbeidet. Det videre arbeidet er allerede i gang og omfatter både diagnostisering av TV på flere hunder som tidligere er røntgenundersøkt for HD og inkludering av DNA-prøver fra disse i studiene. Videre vil vi ha en kontinuerlig oppfølging av nye hunder som blir HD-undersøkt. Vi har innarbeidet en ny applikasjon i NKK, der røntgen-avleserne lett kan registrere TV elektronisk i forbindelse med avlesning av HD-bilder.

Diskusjon med slutsatser og praktisk nytta

Vi har foreløpig ikke identifisert mutasjonen for ataksi og heller ikke funnet sikre assosiasjoner av genetiske markører til TV. Vi er imidlertid meget optimistiske på at vi på relativt kort sikt kan finne mutasjoner for ataksi. Vi har et meget godt samarbeid med raseklubben, og eventuelle nye kasus vil også raskt bli fanget opp og vil kunne bidra til et enda bedre materiale hvis det dukker opp. Men det innsamlede og analyserte materialet burde være et godt grunnlag for videre arbeid og identifisering av en assosiert mutasjon. For rasen NES, som har en tallmessig begrenset størrelse, vil dette ha en stor betydning, da utvikling av en gentest gjør at en kan utnytte en størst mulig bredda av avlsmaterialet uten fare for opptreden av hunder med sykdommen.

For TV kreves et noe større arbeid for å komme i mål. Selv om det er sterke mistanker om at sykdommen er arvelig, bl.a. pga av raseforskjeller, er det ikke gjort veldokumenterte arvbarhetsstudier. Men uansett er dette sannsynligvis en genetisk kompleks egenskap, der det er et større krav til materialstørrelse enn ved sykdommer med enkel arvegang som for eksempel ataksi. Prosjektet har allerede fått en praktisk nytte ved at vi har lagt til rette for elektronisk registrering av sykdommen på alle hunder/raser i forbindelse med HD-røntging. Arbeidet vil også bli videreført og nye analyser vil bli gjennomført etter hvert som flere hunder/prøver blir inkludert i materialet. En identifikasjon av assosiert markører, som kan gi et uttrykk for risiko for sykdommen, vil være av stor praktisk betydning for arbeidet med reduksjon av forekomsten av sykdommen i rasen. En slik test vil, som nevnt i avsnittet under ataksi, også ha betydning for en best mulig utnyttelse av genetisk variasjon i en rase som har en noe begrenset variasjon.

Publikasjoner

Foreløpig er ingen av studiene publisert, men vi håper at vi vil kunne submittere et manuskript angående ataksi i løpet av 2019. Vi vil selvsagt informere forskningsstiftelsen om dette.

Budsjett / regnskap

Det ble bevilget SEK 335.000 (SEK/NOK: 94,5) dvs. 316.575 NOK til prosjektet. Hoveddelen av de bevilgede midler har gått med til dekning av utgifter til genetisk SNP-typing og sekvensering;

Genome wide association (Neogen, 0000213326)	150.000.-
DNA-ekstraksjon	7.000.-
Helgenoms sekvensering, Norwegian Sequencing centre (invoice no 3830241)	160.000.-
Totalt	<u>317.000.-</u>

Oslo 27/1-2019



Frode Lingaas
Professor, prosjektleder