

Anne-Sofie Lagerstedt

Ordförande i Forskningskommittén

Vitenskapelig sluttrapport, prosjekt N2018-0018,

Identifisere assosierte genregioner og mutasjoner for to nyresykdommer

Frode Lingaas, professor, Veterinærhøgskolen-NMBU, Norge

Populärvetenskaplig sammanfattning

Sykdommer i urinorganer og nyresykdommer er vanlig forekommende sykdommene hos hund i Norden og andre land. Sett over alle raser er det ikke den mest prevalente sykdomsgruppen, men nyresykdommer har en tendens til å være overrepresentert i enkelte raser. Det er også begrensede muligheter til god behandling for kroniske nyrelidelser. Kronisk nyresykdom utvikler seg gradvis og ender i mange tilfeller med redusert livskvalitet og tidlig død og kan derfor ha stor betydning innen i enkelte raser.

Ved forskergruppe for Medisinsk genetik ved Veterinærhøgskolen-NMBU arbeider vi med nyresykdommer i flere hunderaser, men i dette prosjektet har vi hatt hovedfokus på nyresykdommene Collagenofibrotic Glomerulonephropathy (CFGN) og nyreamyloidose (NA). CFGN er en alvorlig nyresykdom som gir progredierende nyresvikt og endestadiumsnyre (End-Stage-Kidney-Diseases; ESKD) hos valper/unge hunder. Den har en ukjent forekomst, men siden den er vanskelig å diagnostisere er det trolig en rekke udiagnostiserte tilfeller som skyldes denne sykdommen. Mange tilfeller vil derfor bare bli definert som nyresvikt/ESKD. Den viser en autosomal recessiv nedarving. Sykdommen nyreamyloidose (NA) har også en familiær opptreden. Sykdommen har vært oppdaget i en god del tilfeller i noen brukshundmiljøer/oppdrett av alaskan husky. Nedarvingen er ikke kjent, men vi tror at NA er bestemt av mutasjoner i ett eller noen få gener.

I undersøkelsene har vi gjennomført både undersøkelser av markører på alle hundens kromosomer (GWAS) og helgenoms sekvensering av en utvalgte hunder med CFGN (Schæferhund og drever i Sverige/Norge), og vi har også sekvensert en rekke alaskan husky i familier med nyreamyloidose. I undersøkelsene av CFGN har vi identifisert et genomisk område som har forandringer som kan ha sammenheng med sykdommen, men vi har ennå ikke sikre funn, da det ser ut til å være flere forandringer i det aktuelle området. Foreløpig finner vi ikke de samme forandringer hos drever med CFGN som hos schæferhund. For å verifisere resultatene trengs det nærmere studier av hvordan mutasjoner i regionen påvirker genfunksjonen. Undersøkelsene av nyreamyloidose hos alaskan husky har foreløpig ikke gitt klare funn etter sekvensering av hunder i familier med affiserte hunder. Vi har en mistanke om at dette kan ha sammenheng med at friske hunder som inngår i undersøkelsen kan ha hatt subklinisk sykdom. For CFGN hos schæferhund håper vi å få sikre resultater i løpet av 2022.

Inledning, bakgrund, syfte och frågeställning

Bakgrunnen for prosjektet er at det er store forskjeller i insidens av nyresykdommer mellom ulike hunderaser. I enkelte hunderaser kan forekomst bli betydelig og oppfattes som et problem. Forekomsten av hunderaser med uvanlig høy insidens tyder på at det i enkelte raser har vært en akkumulering av genvarianter som gir økt risiko for nyresykdom. I noen tilfeller gjør en slik akkumulering. Dette kan selvsagt utgjøre en utfordring for dyrevelferden, men ved høy forekomst er det i noen tilfeller mulig å

finne hvilke gener og genvarianter som gir økt risiko. Da kan det utvikles DNA-tester som kan bidra til redusert forekomst av nyresykdom.

Det er trolig stor variasjon i nedarvingen og i hvilke gener som forårsaker nyresykdommer hos de ulike raser. På nordiske data er det beregnet en insidens av nyresykdommer på 15,8 tilfeller per 10.000 hundeår (Pelander et al. 2015). Raser med høyest insidens er blant annet Berner sennenhund (51 syke/10.000 hundeår), miniature schnauzer, boxer, yorkshire terrier og dalmatiner. Raser med lavest forekomst var blant annet svensk elghund, Siberian husky, Finsk lapphund. For nyre-relaterte dødsfall er det også stor variasjon og her ligger også Berner sennenhund høyt (49 dødsfall/10.000 hundeår), fulgt av shetland sheepdog, flat-coated retriever, boxer og soft coated wheaten terrier. Raser med lavest mortalitet var miniature dachshund (2 dødsfall/10,000 hundeår), fulgt av border terrier and Jack Russell terrier (Pelander et al. 2015).

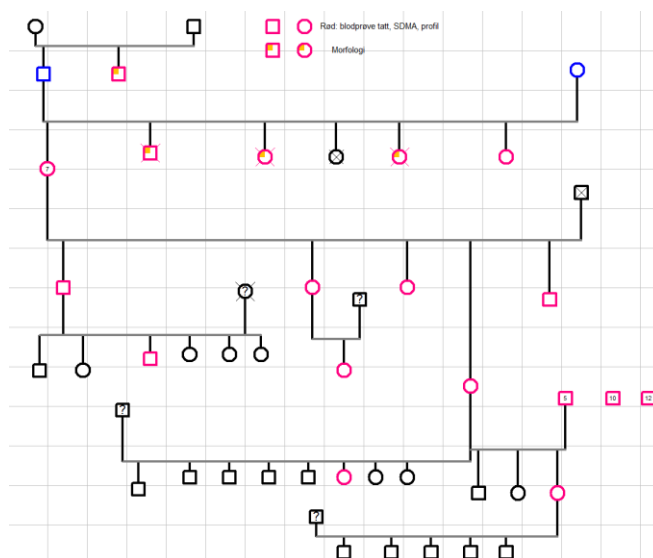
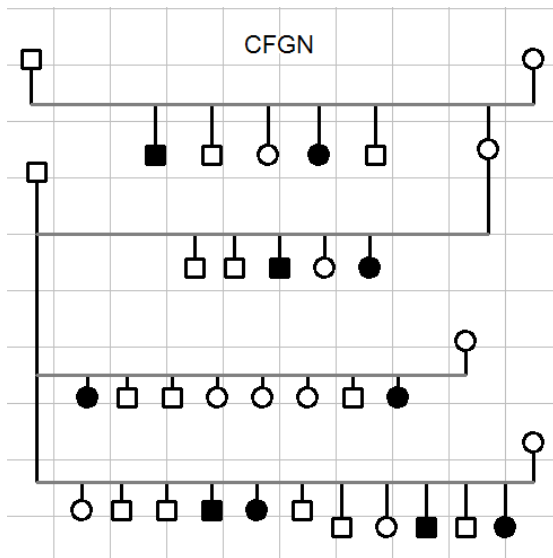
Nyresvikt kan ofte utvikle seg til en «endestadiums-nyre» der hunden til slutt må avlives, uavhengig av den primære sykdomsårsaken. Det er imidlertid en rekke forskjellige primærårsaker til arvelige nyresykdommer. Andre varianter er mistanke om utviklingsfeil, som av noen defineres som «Renal dysplasi» (Picut CA, Lewis RM, 1987) som forekommer hos unge hunder, familiære nefropathier og glomerulopatii (Littman MP, 2018), basalmembrandefekter (Lees GE, 2013), og forandringer i spesifikke celletyper som podocytter (Littman et al, 2013). Det ses også ulike typer av avleiring, f.eks. av immunkomplekser eller ulike typer av kollagen i glomeruli (Gubler et al., 2007, Rørtveit et al, 2012) eller også amyloid (DiBartola et al., 1990, Rivas et al, 1992). Noen primær-årsaker angår utførselsgangene i nyret (tubuli) (Yearley et al., 2014). *Litteraturen viser altså en stor grad av heterogenitet for den primære arvelige årsak for nyresykdommer. Det betyr at forskningen har en stor utfordring med å komme videre i arbeidet med å identifisere gener for de ulike sykdommene.*

I prosjektet har vi ønsket å se om noen regioner på spesifikke kromosomer, er assosiert med sykdommene. I slike regioner der fins genvarianter som er betydelig vanligere hos syke enn hos friske hunder, er det stor sannsynlighet for at en vil finne gener og mutasjoner som er årsaken til sykdom.

Material och metoder

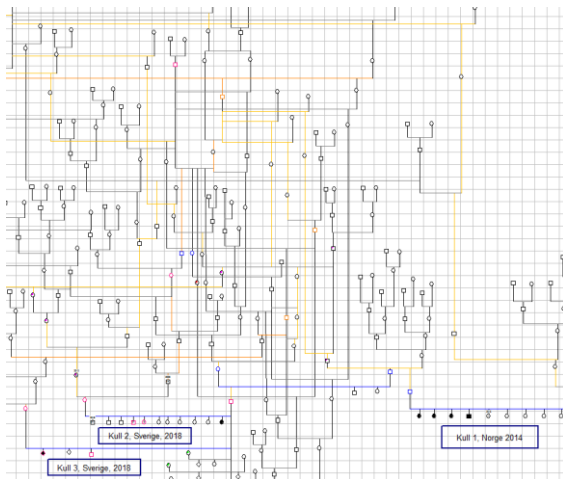
Vi har arbeidet med to nyresykdommer med sannsynlig arvelig bakgrunn og vi har samlet flest mulig prøver for genetiske analyser. For Collagenofibrotic Glomerulonephropathy (CFGN), har vi samlet mange prøver der det tidligere er gjennomført morfologiske studier (Rørtveit et al 2012; Rørtveit et al 2015), samt at vi har utvidet materialet fra CFGN på drever. For nyreamyloidose (NA) har vi mottatt en rekke nye prøver fra oppdrettere som har opplevd problemer med sykdommene. Denne sykdommen har også en familiær opptreden, men arvegangen er uklar.

Deler av familiemateriale for CFGN (til v) og Nyreamyloidose (til h)



Vi oppdaget først et kull med flere tilfeller fra Norge i 2014 og senere to kull fra Sverige, som var er nært beslektet. Fra kullet født i Norge har vi materiale fra 4 syke og flere friske valper samt mor. Utfordringen med de to nye svenske kullene var at alle syke (totalt 7) var døde, slik at vi ikke fikk tak i viktige prøver. Vi fikk likevel tak i noe materiale fra to valper som var obdusert, men dette viste seg å ha for dårlig kvalitet

Deler av stamtavle Drever, som viser 3 affiserte kull;



Metoder

DNA har blitt ekstrahert alle hunder i materialet, og vi har gjennomført både genomiske-analyser med genetiske markører (GWAS) og helgenoms sekvensering av et strategisk utvalg hunder for de to nyresykdommene. Sekvenseringen vil bli gjennomført på Norwegian Sequencing Centre (NSC) i Oslo. De bioinformatiske analysene ble gjennomført på saga.uio.no som er en nasjonal bioinformatikk-ressurs. Sekvens-alignment ble gjort programmet BWA og deretter vil mutasjonsdeteksjon bli gjort ved sk. «best practice» i GATK4. For CFGN har vi hatt en spesiell fokus på en spennende region der det kan ligge viktige gener/mutasjoner, men også øvrige deler av genomet. For amyloidose har vi sett på hele genomet men hatt fokus på 7-10 kandidatgener som tidligere er rapportert å være involvert i nyreamyloidose. Vi vil se etter nye mutasjoner som ikke finnes hos friske hunder. I denne sammenheng har vi brukt en ressurs av

friske hunder fra andre prosjekter for å kontrollere at mutasjonene ikke forekommer hos andre hunder (jfr. Tidligere Agria-prosjekt N2015-0057).

For drever-materialet har vi hatt en lignende framgangsmåte med både genetiske markører og dypsekvensering av deler av familie-materialet.

Resultater

Prosjektet har hatt noe senere framdrift enn ønsket pga utfordringer med laboratorietilgang som delvis skyldtes covid-epidemien og flytting av Veterinærhøgskolen fra Oslo til Ås. Likevel har vi lovende resultater for CFGN hos schæferhund. Vi har en sterk mistanke til hvilket gen som kan være involvert, men det gjenstår en endelig verifisering av resultatene. For CFGN på drever har vi foreløpig ikke funnet noen assosierte mutasjoner, hverken i samme gen som på schæferhund, eller andre steder. Dette kan skyldes at noe av materialet vi mottok fra to syke, obduserte hunder, ikke hadde god nok kvalitet etter sekvensering. Den ene prøven var dessverre degradert (antagelig for gammel før den ble frosset), mens den andre, var fra en paraffinblokk (der DNA var degradert pga formalinpåvirkning). Heller ikke på nyreamyloidose har vi lyktes i å finne mutasjoner som er assosiert med sykdommen. Vi har siden starten av prosjektet, da vi hadde mange rapporter om syke hunder, ikke mottatt flere prøver.

Publisering og diskusjon med slutsatser och praktisk nytta

Selv om prosjektet har blitt noe forsinket, er vi optimistiske og tror at vi vil kunne verifisere resultatene og submittere *resultatene på CFGN* i løpet av vinteren 2022/23. Arbeidet med CFGN på drever og arbeidet med nyreamyloidose vil også fortsette.

Planen er at vi vil sekvensere noen nye hunder fra CFGN (schæferhund) og vi vil også gjøre nye analyser på drever og alaskan husky. Vi vil ha en jevn tilgang av sekvensdata fra nye hunder som vil akkumuleres i vår sekvens-database. Det vil gjøre at muligheten for å finne assosierte mutasjoner for de to sykdommene vil øke. Vi vil i løpet av året ha helgenoms data fra ca 350 sekvenserte hunder, som vil være en viktig ressurs i arbeidet videre. Data i form av sekvenseringsdata fra prosjektene vil fortsatt være tilgjengelig og vil kunne studeres på nytt etter hvert som sekvensdatabasen blir av stadig større verdi. For NA vil vi spesielt ha nytte av sekvensdata fra andre prosjekter der vi har prøver fra alaskan husky i andre sammenhenger.

Den praktiske nytten av prosjektet vil på kort sikt være økt kunnskap om etiologien for nyresykdommen CFGN. Kunnskap om involverte mutasjoner vil både kunne være nyttig i forbindelse med DNA-testing av hunder som skal brukes i avl, men også være nyttig i klinisk praksis og behandling ved en bedre diagnostikk. Vi håper imidlertid at vi også vil kunne gjøre funn på nyreamyloidose etter hvert som vi får en bedre referansedatabase med sekvenser.

Referanser

- Pelander L, Ljungvall I, Egenvall A, Syme H, Elliott J, Haggstrom J. Incidence of and mortality from kidney disease in over 600,000 insured Swedish dogs. *Vet Rec* 2015;176:656.
- Picut CA, Lewis RM. Microscopic features of canine renal dysplasia. *Vet Pathol* 1987;24:156-63.
- Littman MP. Emerging perspectives on hereditary glomerulopathies in canines. *Adv Genomics* 2015:179-88.
- Lees GE. Kidney diseases caused by glomerular basement membrane type IV collagen defects in dogs. *J Vet Emerg Crit Care* 2013;23:184-93.

- Littman MP, Wiley CA, Raducha MG, Henthorn PS. Glomerulopathy and mutations in NPHS1 and KIRREL2 in soft-coated Wheaten Terrier dogs. *Mamm Genome* 2013;24:119-26.
- Gubler M, Heidet L, Antignac C. Alport's syndrome, thin basement membrane nephropathy, nail-patella syndrome and type III collagen glomerulopathy. In: Jennette JL, Schwartz MM, Silva FG, eds. *Heptinstall's pathology of the kidney*. 6th ed. Philadelphia, Pennsylvania: Lippincott Williams & Wilkins, 2007:487-516.
- Rørtveit R, Lingaas F, Bonsdorff T, Eggertsdottir AV, Grondahl AM, Thomassen R et al. A canine autosomal recessive model of collagen type III glomerulopathy. *Lab Invest* 2012;92:1483-91.
- DiBartola SP, Tarr MJ, Webb DM, Giger U. Familial renal amyloidosis in Chinese Shar Pei dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1990;197:483-7.
- Rivas AL, Tintle L, Kimball ES, Scarlett J, Quimby FW. A canine febrile disorder associated with elevated interleukin-6. *Clin Immunol Immunopathol* 1992;64:36-45
- Yearley JH, Hancock DD, Mealey KL. Survival time, lifespan, and quality of life in dogs with idiopathic Fanconi syndrome. *J Am Vet Med Assoc* 2004;225:377-83.
- Rørtveit R, Reiten MR, Lingaas F, Sveri SB, Brech A, Espenes A et al. Glomerular collagen V codeposition and hepatic perisinusoidal collagen III accumulation in canine collagen type III glomerulopathy. *Vet Pathol* 2015;52:1134-41.