

Delrapport år 1 av 3, till Svenska Kennelklubbens och Försäkringsbolaget Agrias Forskningsfond, september 2011, samt ansökan om utökat anslag för år 2 och 3.

Studier av ärftlig bakgrund till livmoderinflammation hos hundar

Huvudsökande

- Ragnvi Hagman, Universitetslektor
Inst. för kliniska vetenskaper
Avd. för hund, katt och andra smådjur
Sveriges Lantbruksuniversitet
Box 7054
750 07 Uppsala
Tel: 018-672918
Fax: 018-673534
E-mail: Ragnvi.Hagman@kv.slu.se

Medsökande

- Göran Andersson, Professor
Institutionen för husdjursavel och genetik, SLU
751 24 Uppsala
Tel: 018-4714903
Fax: 018-4714833
E-mail: goran.andersson@hgen.slu.se

Samarbetspartners

- Kerstin Lindblad-Toh, Professor
Uppsala Universitet/Broad Institute, USA
- Anne-Sofie Lagerstedt, Professor
Inst. för kliniska vetenskaper, SLU
- Tove Fall, VMD Post Doc
Karolinska Institutet, Stockholm
- Aime Ambrosen, Veterinärstudent åk 5
- Susanne Gustafsson, Katarina Tengvall m fl i hund-dna projektet (<http://hunddna.slu.se/>)

Ärftlig bakgrund till livmoderinflammation hos hundar

Bakgrund till forskningsprojektet

Varje år drabbas ca 10 000 tikar i Sverige av pyometra (bakteriell infektion i livmodern med inflammation). Enligt resultaten av våra tidigare studier är sjukdomen betydligt vanligare i vissa hundraser, vilket tyder på att det finns en ärftlig bakgrund till sjukdomen. I Sverige har vi unika möjligheter att undersöka den genetiska bakgrunden till livmoderinflammationer, eftersom vi de facto diagnosticerar sjukdomen ofta istället för att kastrera de flesta tikar. Om vi lyckas med att identifiera sjukdomsgener, och att med tillämpade avelsprogram få en hundpopulation som har ett effektivt immunförsvar och anpassat för komplicerade inflammatoriska sjukdomar och infektioner som pyometra, är det mycket fördelaktigt!

Målsättning med projektet

Målsättningen med projektet är att **identifiera ärftliga riskfaktorer för pyometra (livmoderinflammation) hos hundar**. Vi kommer att använda oss av en tvåstegs strategi för att kartlägga gener involverade i sjukdomsutvecklingen. Först utför vi en genome-wide association (SNP-assay, GWA) med en hundras (schäfer) som har låg risk för sjukdomen och två andra som har medel respektive ökad risk för sjukdomen (labrador retriever respektive golden retriever). Efter att ha identifierat regioner i genomet som är associerade med sjukdomen, undersöks dessa regioner mer detaljerat. Detta andra steg (sk. fine-mapping) genomförs med undersökningar av DNA från ytterligare ett flertal närbesläktade hundraser, vilket innebär att vi snabbt kan minska den region i genomet som är aktuell och därefter identifiera sjukdoms-associerade mutationer. Eftersom pyometra är en komplex sjukdom är det möjligt att fler än en gen är inblandad i sjukdomsutvecklingen. När väl en risk-haplotyp eller den aktuella mutationen är identifierad kan genetiska test utvecklas och användas för att designa avelsstrategier för att minska förekomsten av livmoderinflammation i högriskraserna. Dessutom leder denna studie till ökad förståelse för sjukdomsmekanismer och kan ge förslag på nya behandlingsstrategier.

Mål 1: Insamling av DNA-prov från hundar med predisposition för pyometra och kontroller som är skyddade för sjukdomen (inom hundraserna schäfer, golden retriever, labrador retriever).

Dagsläge: Detta mål räknas som uppnått! Vi har jobbat hårt med provinsamlingen och fått stor hjälp av landets veterinärer med provtagningen och mycket positiv respons från hundägare! I särklass var den jämthundsägare som frågade om han genast skulle avbryta jakten för att komma in och ta blodprov! Intresset från veterinärer i andra Europeiska länder har också varit stort och många vill vara delaktiga i projektet och hjälpa till med provinsamling från hundar i sina länder. Dock har vi varit försiktiga än så länge med att involvera fler samarbetspartners innan något behov av detta finns.

I dagsläget har 80 prov från schäfertikar med pyometra (fall) och 114 kontrollhundar inkommit till biobanken och DNA har preparerats. Vi kommer dessutom att kunna använda GWA-data från ett antal schäfer kontroller som redan analyserats och finansierats av ett annat projekt (atopi) så vi kan därmed utöka andelen fall som skickas för analys, vilket kommer att öka styrkan av fynden ifrån de genetiska analyserna.

Förändring från originalplanen: Provinsamlingen av kontrollhundar har behövts utökats till att omfatta förutom schäfrar även raserna labrador retriever och golden retriever. Detta för att få en mer komplett bild av vad som kan orsaka sjukdomen behöver analysera fler raser (för att analyserna ska få mer styrka i resultaten). För projektet innebär detta att provinsamlingen blivit mer omfattande arbetsmässigt och också mer kostsam eftersom fler brev skickats ut, fler ersättningar betalats ut till provtagande veterinärer etc. även om alla kostnader hållits till en

minimnivå. Provinsamlingen har även fått en del medfinansiering från anslag från Formas tilldelat bl. a. Kerstin Lindblad-Toh och Göran Andersson, och har fullt stöd ifrån HundDNA-gruppen avseende allt praktiskt. Biobanken tar numera ut en avgift på 250 kr per prov för att preparera DNA från blodet (totalt för 668 prover blir det 167 000 kr) som inte var budgeterat för eftersom den avgiften tillkommit sedan ansökan gjordes.

I nuläget har vi fått in följande prover till biobanken (prover inkommer fortfarande):

Ras	Pyometra	Kontroll	Ej utredd ännu
Golden retriever	100	107	11
Labrador retriever	75	114	5
Schäfer	80	114	4
Boxer	8	1	0
Jämthund	29	0	1
Gråhund	9	0	0
Vit älghund	1	0	0
Westie	9	0	0

(Totalt: 218 golden, 194 labrador, 198 schäfer, 9 boxer, 30 jämthund, 9 gråhund, 1 vit älghund, 9 westie: 668 prover)

Vi har inte börjat samla in prov från kontrollhundar i övriga raser (boxer, jämthund, gråhund, westie) ännu, utan enbart hundar som diagnosticerats med pyometra. Vad beträffar rasen jämthund så har vi tillgång till GWA-data från ca 100 friska tikar som redan tidigare analyserats för diabetesprojektet (av Tove Fall). Dessa blir sedan klassificerade som fall eller kontroller beroende på om de haft pyometra eller inte.

Enligt våra beräkningar kommer större delen av projektanslaget för 2011 på 400 000 kr att gå åt till provinsamlingskostnader och DNA-preparering av proverna: ursprungliga beräkningen var när det gällde enbart en hundras (schäfer) att kostnaden skulle täcka även GWA analysen).

Mål 2: Att med hjälp av genome-wide SNP mapping identifiera regioner associerade med pyometra.

Enligt planen kommer prover att skickas in för GWA-analys i oktober månad 2011. Det gäller kontroller och fall från raserna schäfer, golden och labrador. Fallen har selekterats så att de är de hundar som insjuknat tidigt i pyometra (< 3 års ålder) som prioriteras. Kostnaden för GWA är i dagsläget ca 2000 kr per analys. Resterande kostnad kommer att täckas upp av anslag från Formas tilldelat bl.a. Kerstin Lindblad-Toh och Göran Andersson tills vi får in ytterligare finansiering för pyometra-projektet.

Vi ansöker om ytterligare anslag och vi ansöker därför för 650 000 kr i finansiering för år 2 (2012) i projektansökan.

Den person som kommer att vara huvudansvarig för att analysera resultaten från GWA-analyserna är vet stud Aime Ambrosen. Hon kommer att söka stipendier för att kunna finansiera sin lön under sommaren 2012 då hon planerar att jobba heltid med projektet. Under höstterminen därefter kommer Aime att arbeta vidare med projektet som examensarbete inom veterinärprogrammet (en del av projektet kommer att publiceras som examensarbete av publikationstaktiska skäl). Susanne Gustafsson som är biobanksansvarig kommer också att hjälpa till med analysarbetet. Katarina Tengvall och Tove Fall har bägge erfarenhet av denna form av analyser och de kommer att vara delaktiga i analysarbetet och handleda Aime och Susanne i det praktiska arbetet.

Mål 3: Mer specifikt kartlägga de genomregioner som associeras med pyometra.

Mål 4: Kandidatgener från de specifikt identifierade sjukdomsassocierade regionerna genomsöks för mutationer.

Projektet kommer sannolikt att behöva utöka perioden av finansiering för att täcka kostnaderna för att uppfylla delmål 3 och 4 under 2013. Som ansökan såg ut när den skickades in sökte vi endast 20 000 kr in anslag för år 3 (2013). Kostnaderna för re-sekvensering och validering av identifierade mutationer kommer att överstiga de ansökta 20 000 kr, och vi kommer att ansöka om att utöka detta belopp för år 3 i ansökan i samband med att delrapport för år 2 skickas in.

Forskningsstudiens design och metoder- en uppdatering

Delmål 1- Insamling av DNA-prov från hundar med predisposition för pyometra och kontroller som är skyddade för sjukdomen

Insamling av DNA-prov från hundar med predisposition för pyometra (diagnostiserade vid tidig ålder) och kontroller som är skyddade för sjukdomen (friska vid hög ålder), 100 i varje grupp, icke-besläktade individer, inom hundrasen Schäfer. Rasen Schäfer har valts ut eftersom den har låg risk för att utveckla sjukdomen, och därtill underlättas provinsamlingen av det stora antalet tjänstehundar tillgängliga för att ingå i studien. Golden retriever och Labrador retriever har valts ut för att den ena rasen har ökad risk för pyometra (golden retriever) men det har inte den andra (labrador retriever) och provinsamlingen av pyometrafall fick antal antal som snabbt närmade sig det önskade 100. Kontrollhundarna >8 år och inte insjuknade i pyometra, kommer att följas under tiden efter provtagning och om de insjuknar i pyometra efter provtagning - kommer de att uteslutas ur kontrollgruppen. Stamtavlor har undersökts och registrerats för att försäkra oss om att inkluderade hundar inte är släkt genom far-eller morföräldrar. Provinsamling pågår successivt från pyometrafall i ytterligare 4 hundraser (gråhund, jämthund, boxer, west highland white terrier) där det behövs minst 50 fall och 50 kontroller i vardera grupp.

Delmål 2: Att med genome-wide SNP mapping identifiera regioner associerade med pyometra.

Vi ämnar identifiera gemensamma haplotyper mellan pyometrafall som ett medel att kunna identifiera gener som associeras med pyometra. Den genetiska kartläggningen kommer att genomföras med Illumina 170k SNP array. Proverna skickas in för analys i oktober månad 2011, och resultaten kommer att bearbetas under 2011-2012.

Delmål 3: Specifikt kartlägga de genomregioner som associeras med pyometra.

Som beskrivet ovan antar vi att närbesläktade hundraser som har ökad benägenhet att utveckla pyometra delar samma sjukdomsallel. Därför planerar vi att identifiera en haplotyp som innehåller en pyometra- orsakande mutation i tre hundraser (Schäfer, Labrador retriever och Golden retriever) med genome-wide association analys och sedan att fortsätta att närmare identifiera sjukdomsregionen genom fine-mapping i flera närbesläktade raser. För att åstadkomma detta krävs prov från 50 fall och 50 kontroller.

Delmål 4: Kandidatgener från de specifikt identifierade sjukdomsassocierade regionerna genomsöks för mutationer.

Analys av möjliga kandidatgener från dessa regioner prioriteras baserat på deras kända funktioner och associationer med inflammatoriska sjukdomar i andra djurslag eller hos människa. Dessa gener och bevarade icke-kodade delar sekvenseras i fall och kontroller för att identifiera sjukdomsassocierade mutationer.

Långsiktigt mål: Att utveckla ett test för bärare av mutation/haplotyp som predisponerar för pyometra så fort som mutationen (haplotypen) har identifierats. Slutligen skulle vi vilja undersöka effekten av den sjukdomsassocierade funktionen av mutationens protein in vitro eller in vivo, om mutationen är reglerande, och se hur den påverkar genuttrycket. Genomiska och funktionella tekniker kan utföras för att definiera genernas roll i immunförsvaret/sjukdomsutvecklingen.

Provinsamling:

Provtagningens tidsram beräknades till ca 6-12 månader, och har hållits. För ytterligare information om provinsamlingen - se hemsidan Hunddna (<http://hunddna.slu.se/>) där projektet är beskrivet. Vi håller också på att utveckla en egen hemsida, men den är inte färdig ännu (www.pyometra.se).

Tidsplan för projektets genomförande

År 2011

- Insamling av DNA-prov från fall- och kontrollhundar i raserna schäfer, golden retriever och labrador retriever, samt ytterligare fyra hundraser där det behövs 50 fall och kontroller från varje ras.
- Provtagning av hundar med pyometra som inkommer till Universitetsdjursjukhuset, SLU, sker kontinuerligt.
- Utföra genome-wide association analys från de första 100 fallen och 100 kontrollerna i raserna schäfer, labrador retriever och golden retriever. Planeras till oktober 2011.
- Påbörja bearbetning av genome-wide association analysen.

År 2012

- Utföra dataanalyser av resultat från genome-wide association analysen (examensarbete av vet stud Aime Ambrosen pågår och beräknas slutföras under HT 2012, som en del av pyometra-projektet).
- Fortsatt provinsamling av pyometra-fall.
- Utföra fine-mapping med flera raser.
- Manuskript skrivs och resultat presenteras på internationell vetenskaplig kongress.
- Ett flertal populärvetenskapliga artiklar skrivs om studien 2012-2014.

År 2013

- Sekvensering för att identifiera mutationer.
- Manuskript (ca 3-4 st.) bearbetas och publiceras.
- Presentationer på internationella vetenskapliga kongresser.
- Populärvetenskapliga artiklar om studien där resultat presenteras.