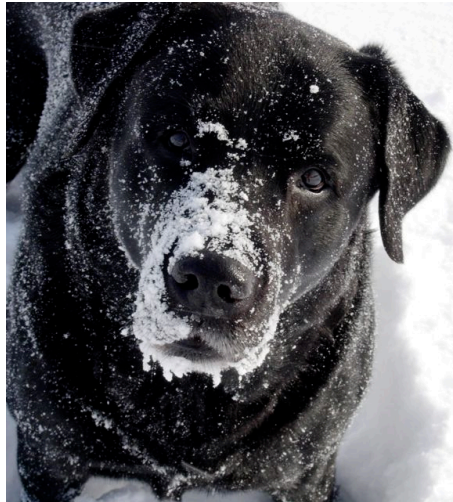


Delrapport och förnyat ansökan av forskningsbidrag hos Svenska Kennelklubbens och Försäkringsbolaget Agrias Forskningsfond, 01 oktober 2015.

Helgenomsekvensering av Hundar:

Identifiering av Sjukdomsorsakande Mutationer och Utvärdering av Konsekvenser för Framtidens Hundavel



<p>HUVUDSÖKANDE:</p> <p>Tomas Bergström, PhD</p> <p>Inst. För Husdjursgenetik Sveriges Lantbruksuniversitet Box 7023, 750 07 Uppsala Tel: +46 18-671997 Mobil: +46 70 6281660 Fax: +46 18-672848 E-mail: Tomas.Bergstrom@slu.se</p>	<p>MEDSÖKANDE:</p> <p>Göran Andersson, PhD, Prof</p> <p>Inst. För Husdjursgenetik Sveriges Lantbruksuniversitet Box 7023, 750 07 Uppsala Tel: +46 18-671997 Mobil: +46 70-380 89 19 Fax: +46 18-672848 E-mail: Göran.Andersson@slu.se</p>
<p>MEDSÖKANDE:</p> <p>Kristina Narfström DVM, PhD, DECVO, Prof em.</p> <p>Department of Veterinary Medicine and Surgery Clydesdale Hall College of Veterinary Medicine University of Missouri Columbia, MO 65211 USA Tel: +46 701759095 FAX: +46 8 622 6054 E-mail: NarfstromK@missouri.edu</p>	<p>MEDSÖKANDE:</p> <p>Kerstin Bergvall DVM, DECVD</p> <p>Inst. För Kirurgi och Medicin Sveriges Lantbruksuniversitet Box 7054, 750 07 Uppsala Tel: +46 18-671365 Mobil: +46 70-781 66 98 Fax: +46 18-672848 Mobil: +46 70-380 89 19 Fax: +46 18-672848 E-mail: Kerstin.Bergvall@slu.se</p>

Delrapport - 2015

Bakgrund

Denna ansökan avser helgenomsekvensering av hundar. Syftet är att använda denna kraftfulla teknik för att identifiera sjukdomsorsakande mutationer och att utvärdera konsekvenserna av att helgenomsekvensering inom en nära framtid sannolikt kommer att vara allmänt tillgänglig för hundägare på samma vis som dagens DNA-tester för enskilda sjukdomar. En central resurs för helgenomsekvensering vid Veterinärmedicinsk och Husdjursvetenskapligt Centrum (VHC) har etablerats. Den har nära koppling till Hundbiobanken (Canine Biobank) och i vår forskning använder vi tillgängliga prover i biobanken. Projektet bedrivs i nära samarbete mellan klinisk och preklinisk forskning både vid SLU och Uppsala universitet och forskningen syftar till att förbättra hundhälsan.

Sammanfattning av projektets målsättningar:

- Bygga upp en "core facilitet" för "Next Generation Sequencing" (NGS) för pre-klinisk och klinisk veterinärmedicinsk forskning på hund vid Veterinärmedicinsk och Husdjursvetenskapligt Centrum (VHC).
- Utnyttja NGS för helgenomsekvensering av hundar för effektiv identifiering av sjukdomsorsakande mutationer.
- Utvärdera hur förändringen från dagens DNA-tester av ett fåtal gener till sekvensinformation från hela genomet kommer att påverka hundaveln i framtiden.
- Initiera en diskussion kring hur dagens lagstiftning, riktlinjer och avelsrådgivning är anpassade för en situation där enskilda hundars hela arvsmassa är känd och hur denna nya kunskap från helgenomsekvensering kan användas för att öka den genetiska variationen hos hundraser och förbättra hundhälsan.

UPPNÅDDA RESULTAT (t o m Sept. 2015)

Som beskrevs i den första delrapporten genomfördes under 2014 en pilotstudie där helgenomsekvensering användes för att identifiera den sjukdomsorsakande genen för den autosomalt recessiva sjukdomen trampdyne-hyperkeratos hos hundrasen kromfohrländer. I studien sekvenserades en familjetrio bestående av en affekterad avkomma och dess friska föräldrar. Eftersom det är en autosomalt recessiv sjukdom kunde vi förutsätta att avkomman skulle vara homozygot för den sjukdomsorsakande mutationen samt att de båda friska föräldrarna var bärare (heterozygoter).

För att kunna genomföra denna pilotstudie konstruerades en avancerad bioinformatik-pipeline bestående av olika datorprogram och databaser vid institutionen för husdjursgenetik. Denna "pipeline" användes för att jämföra hela arvsmassan hos de tre hundarna och identifierade positioner i arvsmassan som uppfyllde villkoret att föräldrarna skulle vara heterozygoter och avkomman homozygot. Studien resulterade i att en mutation i genen *FAM83G* kunde kopplas till

sjukdomen. Resultaten har sammanställts i en vetenskaplig artikel som är under revidering i tidskriften G3 – Genes Genomes Genetics. Pilotstudien visade att helgenomsekvensering av en familjetrio är en kraftfull metod för att identifiering av sjukdomsorsakande mutationer för ärftliga monogena sjukdomar med autosomt recessiv nedärvning.

Då SKK/AGRIA's forskningsfond beviljade vår ansökan beslutade fakulteten för Veterinärmedicin och Husdjursvetenskap (VH) vid SLU att göra en strategisk satsning och medfinansiera uppbyggnaden av en infrastruktur för helgenomsekvensering. En offentlig upphandling av utrustning för Next Generation Sequencing (NGS) slutfördes under hösten 2014 och en Illumina NextSeq500 installerades i början av 2015. Utrustningen har kapacitet att generera över 120 Gb (120 miljarder) sekvensdata på 30 timmar. Om en arvs massa från endast en hund körs på maskinen kan det översättas till att varje position i hundens arvs massa sekvenseras över 40 gånger (40x täckning). I många studier behövs inte fullt så hög täckning av genomet. Det är därför möjligt att sekvensera fler än en hund per körning och på så vis analysera fler hundar.

Under våren 2015 genomfördes den första studien på den nya utrustningen för helgenomsekvensering. Vi valde som första studie att försöka identifiera den bakomliggande genetiska orsaken till en form av retinopati som för några år sedan upptäcktes hos labrador retriever. Vi applicerade en liknande strategi som användes för att identifiera den sjukdomsorsakande genen för trampdyne-hyperkeratos hos kromfohrländerhundar. I studien sekvenserades hela arvs massan hos ett syskonpar labradorer som båda hade diagnostiserats med retinopati samt deras friska föräldrar. Studien ledde till att vi kunde identifiera en tidigare okänd variant (allel) av en gen som stark kandidat för orsaka denna form av retinopati. Vi genomför nu funktionella studier på RNA och proteinnivå för att studera effekten av mutationen.

I slutet av 2014 beviljades vi ett stort forskningsanslag "Identifiering av Gener med Negativ Effekt För Hundars Hälsa: Ett NGS och Bioinformatiskt Ramverk för Hund" från FORMAS som har gjort det möjligt att anställa en doktorand i projektet. Doktoranden, Suvi Mäkeläinen blev antagen den i slutet av september i år och kommer att i sin forskarutbildning att fokusera på helgenomsekvensering och identifiering av sjukdomsorsakande mutationer hos hund.

I vårt ursprungliga forskningsprogram ansökte vi om medel för dels en investering av infrastruktur för helgenomsekvensering och dels för forskningsmedel. Totalt 370 000 kronor per år. Av dessa medel var 250 000 kr / år avsett för infrastrukturen. Under utvärderingen av vår ansökan delades den upp i två delar och ett separat kontrakt skrevs för infrastrukturens satsningen på 750 000 kr (250 000 kr / år i tre år). För den andra delen av ansökan beviljade SKK ett anslag på 100 000 kr. Reagenskostnaden för varje enskilt projekt där vi har tillgång till familjematerial beräknas till mellan 80 000 - 100 000 kronor. Med en nyantagen doktorand är vår bedömning att vi under 2016 kommer att kunna sekvensera och analysera ytterligare tre sjukdomar där vi redan idag har tillgång till familjematerial. I denna förnyade ansökan anhåller vi därför om 300 000 kr.