

Delrapport år 2 av 3, till Svenska Kennelklubbens och Försäkringsbolaget Agrias Forskningsfond, september 2012, samt ansökan om utökat anslag för år 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@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@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 6
- 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 de flesta tikarna inte kastreras och vi har utförliga hundregister och försäkringsdata att tillgå. Om vi lyckas med att identifiera sjukdomsgener, kan vi med tillämpade avelsprogram få en hundpopulation som har ett effektivt immunförsvar anpassat för komplicerade inflammatoriska sjukdomar och infektioner som pyometra, vilket är mycket fördelaktigt!

Vi har lyckats identifiera pyometra-associerade gener! För att stärka våra fynd ytterligare samlar vi in fler prov att GWA analysera och bearbeta under HT 2012.

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 är 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 807 prover från fall och kontroller inkommit till biobanken och DNA har preparerats. Vi fortsätter med ytterligare provinsamling med tikar som diagnosticerats under 2011-2012, för att utöka andelen fall som skickas för analys, vilket kommer att öka styrkan av våra fynd.

Förändring från originalplanen: Provinsamlingen av kontrollhundar har 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. För projektet innebär detta att provinsamlingen blivit mer omfattande arbetsmässigt och också mer kostsam eftersom fler brev skickats ut och fler

ersättningar betalats ut till provtagande veterinärer även om alla kostnader hållits till en miniminivå. Provinsamlingen har även fått en del medfinansiering från anslag från Formas 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 807 prover blir det 201 750 kr). Detta var inte budgeterat för eftersom den avgiften tillkommit sedan ansökan gjordes.

I nuläget har vi fått in följande prover till biobanken:

Ras	Pyometra	Kontroll
Golden retriever	109	159
Labrador retriever	89	183
Schäfer	92	118
Boxer	8	1
Jämthund	29	0
Gråhund	9	0
Vit älghund	1	0
Westie	9	0

(Totalt: 807 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.

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

Dagsläge: detta mål är också att betrakta som uppnått! Vi följer planen och har analyserat 450 prover med GWA. Dock samlar vi in fler prover för att ytterligare stärka våra fynd. Vi har identifierat 1-3 gener som skiljer sig hos de tikar som diagnosticerats med pyometra jämfört med tikar som inte utvecklat sjukdomen vid 8 års ålder. Vi kan inte avslöja närmare vilka gener det rör sig om (av publikationstaktiska skäl). Vi utför ytterligare GWAs under hösten när kompletterande prover inkommit till biobanken och analyserats med GWA. 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 2 000 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.

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

Detta arbete pågår och vi kommer att fortsätta undersöka funktionen av de gener som vi identifierat. Dessutom samlar vi in livmodervävnad från tikar som opererats för pyometra och friska tikar i efterlöpsperioden för att undersöka genuttrycket av de gener som vi identifierat. Så fort dessa prover samlats in kommer Aime att göra dessa vävnadsanalyser.

Kvarvarande anslag från 2011 på 116 975 kr (se bifogad projektuppföljning) kommer att gå åt för att genomföra Mål 1-3. Provinsamlingskostnader och DNA-preparering av proverna: Den ursprungliga beräkningen gällde enbart en hundras (schäfer) och skulle då även omfatta GWA analysen.

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

Detta kommer att påbörjas så snart vi har kompletterat våra data med de prover som samlas in och analyseras under hösten 2012.

Projektet kommer 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 i anslag för år 3 (2013). Kostnaderna för re-sekvensering och validering av identifierade mutationer kommer att överstiga de ansökta 20 000 kr, och vi ansöker om att utöka detta belopp för år 3 i ansökan nu i samband med att delrapport för år 2 skickas in. Dessutom ansöker vi om anslag för löneomedel för att kunna anställa Aime vidare i projektet halvtid under 6 månader (jan-juni 2013).

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 valdes 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). Kontrollhundarna som är äldre än 8 år och som inte har insjuknat i pyometra, följs och om de insjuknar i pyometra efter provtagning - utesluts de 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).

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

Vi har identifierat gener som är associerade med sjukdomen pyometra. Den genetiska kartläggningen genomfördes med Illumina 170k SNP array. Kompletterande prover (för att stärka våra fynd ytterligare) kommer att skickas in för analys och data bearbetas under hösten 2012.

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

Vi planerar nu att fortsätta att närmare identifiera sjukdomsregionen genom fine-mapping i flera närbesläktade raser. Möjligen kan vi här behöva samla in ytterligare prover från andra hundraser, men vi utgår först och främst från redan insamlade prover och analyserade resultat.

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.

Projektet skulle 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). Dessutom ansöker vi om löneomedel för att kunna anställa vet stud Aime Ambrosen i projektet halvtid under 6 månader (jan-juni 2013), lön motsvarande nybliven doktorand. Vi ansöker härmed om ytterligare anslag 400 000 kr i finansiering för år 3 (2013) i projektansökan.

Aime är huvudansvarig för att analysera resultaten från GWA-analyserna och har finansierat sin lön med stipendium under sommaren 2012 då hon har jobbat heltid med projektet. Under höstterminen 2012 arbetar hon vidare med projektet som examensarbete inom veterinärprogrammet (men denna del av projektet kommer inte att publiceras som examensarbete av publikationstaktiska skäl).

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:

Provtagningen har gått enligt planerna med tillägg av kompletterande prover under hösten 2012. 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 i raserna schäfer, labrador retriever och golden retriever. Utfördes HT 2011.
- Påbörja bearbetning av genome-wide association analysen.

År 2012

- Utföra dataanalyser av resultat från GWA analysen (vet stud Aime Ambrosen). Pågår. Preliminära spännande resultat såhär långt!
- Fortsatt provinsamling av kompletterande pyometra-fall och kontroller.

Ekonomi: På kontot: 116 975 kr

Höstens prover, ca 150:

- 12 500 kr postutskick + 45 000 kr provinsamling (ersättning till veterinärer)
- DNA preparering och Biobanklagring 100 prover: 37 500 kr (250 kr per prov)
- GWA 150 prover: 300 000 kr (2 000 kr per prov). Skickar antal vi har råd med.

Total kostnad 395 000 – vilket innebär att anslag från 2011 kommer att gå åt helt under hösten.

År 2013 (förutsatt att finansiering finns)

- Utföra fine-mapping med flera raser, identifiering av kandidatgener.
- Sekvensering för att identifiera mutationer.
- Manuskript (ca 2-3 st) bearbetas och publiceras, vetenskapliga tidskrifter av hög rank.
- Presentationer på internationella vetenskapliga kongresser (EVSSAR, ECVIM, ECVS).
- Populärvetenskapliga artiklar om studien där resultat presenteras (Svensk veterinärtidning, rasklubbstidskrifter, Uppsala Nya Tidning).

Finansiering 2013 sökes med 400 000 kr: 250 000 kr projektanslag och 150 000 kr lön för vet stud Aime Ambrosen halvtid i 6 mån.