

# Genetisk studie av en utvecklingsrubbning i extremitetsskelettet (krumma föl) hos shetlandspionny

Projektnummer: H0847211

Beviljat belopp: 675.000 SEK

## Bakgrund

Under de senaste decennierna har ett antal fall av en medfödd utvecklingsrubbning i extremitetsskelettet hos shetlandspionnyer detekterats och diagnostiserats. Defekten är i allra högsta grad ett aktuellt problem inom shetlandspionnyrasen då flera fall har rapporterats även under de senaste åren till Sveriges Shetlandssällskap (SSS) (Kristin Johansson, SSS avelskommitté, muntlig kommunikation). Intresset för shetlandspionnyrasen ökar och de användningsområden som finns för rasen blir alltmer inriktat på tävling, vilket ställer höga krav på hållbarhet och god hälsa.

Defekten yttrar sig i form av att ulna (armbågsbenet, som utvecklas invid underarmsbenet radius) och fibula (vadbenet, som utvecklas invid skankbenet tibia) utvecklas i hela sin längd, i stället för att som normalt till största delen tillbakabildas under fosterutvecklingen. Resultatet blir en felaktig skelettuppbyggnad som i sin tur leder till rörelsestörning och hälta (Thyreen 1994). Utvecklingsrubbningen medför så allvarliga avvikelser att drabbade djur måste avlivas. Fullt utvecklade ulna och fibula är ett exempel på atavism, d.v.s. en återgång till ett tidigare evolutionärt stadium (Hall BK 1995).

De vanligaste kliniska symptomen då ulna och fibula är fullt utvecklade är följande; korta ben, lågrektangulär kroppsbyggnad, inåtvinklade karpalleder, hastrånghet, bockhov, utåttåighet och successivt försämrade onormala rörelser. Symptomen blir värre och värre allteftersom fölet växer och de flesta avlivas under det första halvåret.

Röntgenfynd visar att humerus, radius och tibias tillväxtzoner sluts tidigare än normalt samtidigt som ulnas och fibulas onormala tillväxt gör att de blir längre än respektive rörben. Detta i sin tur leder till knä- respektive hastrång (fransysk) benställning med sneda vinklar i karpus och hasled. Benen under dessa leder blir då roterade utåt med utåttåighet som följd. Den felaktiga belastningen i respektive led gör i sin tur att ledernas småben utvecklas onormalt. De felvinklade benen ger en kraftig rörelsestörning och hälta som tilltar allteftersom fölet växer (Thyreen 1994).

Tidigare studier visar att sjukdomen följer en enkel autosomal recessiv nedärvning (Hermans WA 1970). Med autosomal menas att det defekta anlaget ej är bundet till könskromosomerna. Ett recessivt anlag kommer till uttryck först när det finns i dubbel (homozygot) uppsättning hos individen, det vill säga individen behöver ärva anlaget från både moder och fader för att uppvisa egenskapen. Det är därför mycket svårt att avla bort recessivt nedärvda defekter. Problemet ligger framför allt i svårigheten att identifiera friska anlagsbärare med enkel uppsättning av anlaget (heterozygot).

För att lösa detta har man stor nytta av genetisk analys (DNA test) av avelsdjur. Med hjälp av genetisk analys kan man bestämma både hingstens och stoets genvarianter och på så vis få en mer effektiv selektion av avelsdjur. Inte minst viktigt är att information om ett avelsdjur är bärare av sjukdomsanlag eller inte, kan tas fram när som helst under dess livstid och inte kräver att individen har reproducerat sig.

## Specifik målbeskrivning

Det övergripande målet med denna studie är att identifiera den gen och mutation som reglerar utvecklingen av den ärftliga defekten krumma föl hos shetlandspionny. Detta görs för

att möjliggöra design av ett genetiskt test som kan användas för att påvisa anlaget hos individer som bär på anlaget i enkel uppsättning (dolt anlag) och därmed inte visar några symptom av sjukdomen, samt att diagnosen av en sjuk individ blir mer säker. I den första fasen av denna studie samlade vi in blodprover från defekta hästar, anlagsbärare, samt friska kontroller. I nästa fas genomfördes en omfattande genotypning av individernas hela arvsmassa, som sedan följdes av statistisk analys för att identifiera kromosomregionen och därefter den ansvariga genen.

## **Material och Metoder**

### Hästmaterial

*Material från Sverige:* Vi har analyserat 6 st krumma fall, 18 anlagsbärare (både bekräftade och starkt misstänkta) samt 24 friska kontrolldjur där de allra flesta hästar har sitt ursprung i Sverige. De friska kontrolldjuren består av hingstar som fått många avkommor (vi valde de med flest avkommor som samtidigt fanns blodprov för i SLU's biobank) där vi intervjuat ägarna om avkommornas sjukdomsstatus, för att i möjligaste mån undvika okända anlagsbärare i kontrollgruppen. Vi har även noga tagit del av information om kända sjukdomsbärare från uppfödare för att undvika dessa i kontrollgruppen.

*Material från USA:* Vi har analyserat 8 st krumma fall, 5 bekräftade anlagsbärare och 13 friska kontrolldjur. Materialet kommer ifrån professor Ernie Bailey och hans medarbetare John Ebert, Gluck Equine Research Center, Department of Veterinary Science, University of Kentucky, Lexington, USA.

### Genotypning med SNP chip

Arvsmassan hos hästarna i vårt insamlade hästmaterial har genomsökts med hjälp av ett så kallat Single Nucleotide Polymorphism (SNP)-chip (Illumina Inc.). Genotypningen har utförts på individuella DNA prover. Både svenska och amerikanska djur genotypades med Illumina SNP60K Beadchip.

### Helgenomssekvensering

Vi har även utfört helgenomssekvensering av 6 svenska fall och en pool av 22 svenska kontrolldjur.

### Finmappning av genen

När vi ska finmappa genen har vi stor nytta av de prover som våra samarbetspartners från USA har bidragit med.

## **Resultat**

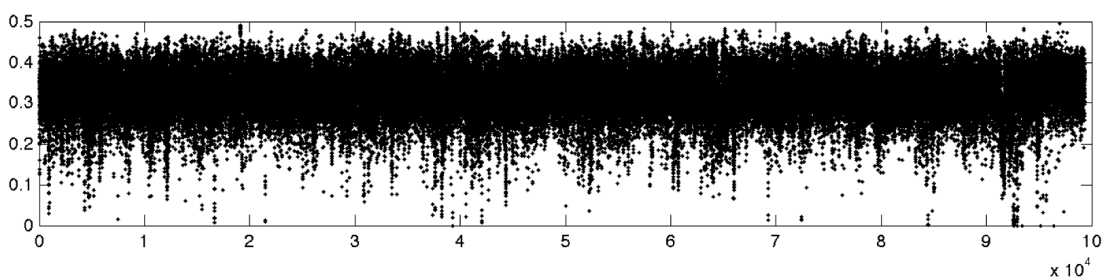
### SNP chip data

Associationsanalys av hela genomet m.h.a. SNP-chip data visar inte på någon signifikant association. Den mest troliga förklaringen till det är att SNP chipet inte täcker in hela arvsmassan. Doktorand Lisa Andersson har gjort de genetiska associationsanalyserna i programmet PLINK. Vi har därför utfört helgenomssekvensering av det svenska hästmaterialet.

### Helgenomssekvensering

De sex krumma fallen indexerades sekvenserades individuellt medan kontrolldjuren sekvenserades i en pool. De första analyserna av helgenomssekvenserna visar på 4 kandidatregioner för defekten krumma föl (Figur 1). Detta visar på fördelen med att leta efter genen för defekten i varje baspar i genomet. Då det kan finnas risk för konkurrens från utländsk forskargrupp väljer vi att här endast presentera att vi funnit fyra kandidatregioner, men inte vilka kromosomer eller var på kromosomerna signalen detekterats. I de identifierade regionerna finns flera kodande gener. Sekvenserna är i nuläget under en mer ingående analys. Forskare Carl-Johan Rubin och doktorand Nima Rafati leder de fortsatta bioinformatiska analyserna i projektet. Bioinformatikerna ingår i professor Leif Anderssons forskargrupp, Inst för Medicinsk Biokemi och Mikrobiologi, Uppsala Universitet. Planen är att Nima Rafati ska utföra studien som en del i sin avhandling. Det finns en stor kompetens av liknande projekt inom forskargruppen och chanserna bedöms goda för att den ansvariga genen ska identifieras.

Figur 1. Homozygotianalys från helgenomssekvensering identifierar fyra kandidatregioner när alla sex krumma föl jämförs. Y-axeln visar heterozygotigrad och X-axeln är platsen längs med genomet.



### **Vikten av ett framtida DNA-test för krumma föl**

Det är mycket svårt att avla bort recessiva defekter eftersom anlaget bärs dolt av heterozygota individer, samt det faktum att endast i genomsnitt var fjärde avkomma till två anlagsbärare blir homozygot och föds med defekten. De metoder som finns – i de flesta fall endast testparningar – är tidskrävande, dyra och etiskt tveksamma (Thyreen 1994). För att minska spridningen av anlaget i Sverige, tas idag konstaterat anlagsbärande hingstar ur avel. Detta görs med stöd av djurskyddslagen för att förhindra att det föds individer som utsätts för lidande. Ett problem är att inte alla uppfödare rapporterar de sjuka fölen. Det kan bero på okunskap eller helt enkelt för att ”mörka” det faktum att en avelsindivid kan vara bärare då detta kraftigt minskar värdet på individen.

### **Informations spridning**

Vår målsättning är att publicera de genetiska resultaten om krummagenen i vetenskaplig tidskrift av hög kvalitet. Vi deltar regelbundet i internationella genetikkonferenser där resultaten kommer att presenteras både muntligt, med abstrakt och poster. Vi tror bland annat att Tidningen Shetlandspönnyn, Sveriges Shetlandssällskaps hemsida, Tidningen Ridsport, HästSverige's hemsida och publicerad egen hemsida och nyhetsbrev från institutionen för husdjursgenetik är lämpliga organ för spridning av information från forskning till fältet, men naturligtvis även i seminarieform vid lämpligt ”hästevenemang” (exempelvis Eurohorse, Hippocampusdagarna eller Hippologenhetens lärardagar vid SLU). Sveriges

Shetlandssällskap och Hästavelserförbundet kommer att hjälpa till med särskilt riktade informationsinsatser när genen blivit identifierad. Information sker också genom [www.hastsverige.se](http://www.hastsverige.se).

#### Genomförd projektförmedling till näringen

1. Lindgren G, Mikko S., Dalin G. 2008. Avlar du på rätt individ? Med fokus på defekten krumma föl hos shetlandspunny. Tidningen Shetlandspunnyn nr 4: 42-43
2. Gabriella Lindgren. 2009. Rapport från SLU's genetiska forskningsprojekt om krumma föl hos shetlandspunny. Tidningen Shetlandspunnyn, nr 3: 7.
3. Muntlig presentation vid Sveriges Shetlandssällskaps höstmöte den 16 nov, 2008. Sofia Mikko presenterar det planerade projektet om krumma föl.
4. Blänkare om projektet om krumma föl på Sveriges Shetlandssällskap's hemsida, 2009. Information om projektet samt efterfrågan om blodprover från drabbade hästar, anlagsbärare, samt friska kontroller.
5. "Fullblodens snabbhet är ett arv från shetland", Tidningen Ridsport, Avel, nr 3, 2012.
6. Ursprunget till snabbhet hos fullblod, intervju i Radio Uppland med Gabriella Lindgren (12-01-26, kl.8.15-8.30, arkivet Radio Uppland).

#### Vetenskapliga publikationer

1. Bower MA, McGivney BA, Campana MG, Gu J, Andersson LS, Barrett E, Davis CR, Mikko S, Stock F, Voronkova V, Bradley DG, Fahey AG, Lindgren G, MacHugh DE, Sulimova G, Hill EW. 2012. The genetic origin and history of speed in the Thoroughbred racehorse. Nat Commun, Jan 24;3:643. doi: 10.1038/ncomms1644.

I denna artikel användes den SNP-chip data från svenskstammade shetlandspunnys som genererats i krummaprojektet för att härleda ursprunget till snabbhet hos fullblod. Man kunde härleda ursprunget till just shetlandspunnyn. För mer info se pressmeddelande från SLU "SLU-forskare fann ursprung till snabbhet hos häst":

<http://www.slu.se/sv/om-slu/fristaende-sidor/aktuellt/alla-nyheter/2012/1/slu-forskare-fann-ursprung-till-snabbhet-hos-hast/>.

2. McCue ME, Bannasch DL, Petersen JL, Gurr J, Bailey E, Binns MM, Distl O, Guérin G, Hasegawa T, Hill EW, Leeb T, Lindgren G, Penedo MC, Røed KH, Ryder OA, Swinburne JE, Tozaki T, Valberg SJ, Vaudin M, Lindblad-Toh K, Wade CM, Mickelson JR. 2012. A high density SNP array for the domestic horse and extant Perissodactyla: utility for association mapping, genetic diversity, and phylogeny studies. PLoS Genet. Jan;8(1):e1002451. Epub 2012 Jan 12.

Anslag från Stiftelsen Hästforskning har bidragit till att jag ökat min kunskap om det SNP-chip som finns utvecklat för häst och dess användning.

3. Jessica L Petersen<sup>1</sup>, James R Mickelson<sup>1</sup>, E Gus Cothran<sup>2</sup>, Lisa S Andersson<sup>3</sup>, Jeanette Axelsson<sup>3</sup>, Ernie Bailey<sup>4</sup>, Danika Bannasch<sup>5</sup>, Matthew M Binns<sup>6</sup>, Alexandre S Borges<sup>7</sup>, Pieter Brama<sup>8</sup>, Artur de Câmara Machado<sup>9</sup>, Ottmar Distl<sup>10</sup>, Michela Felicetti<sup>11</sup>, Laura Fox-Clipsham<sup>12</sup>, Kathryn T Graves<sup>4</sup>, Gérard Guérin<sup>13</sup>, Bianca Haase<sup>14</sup>, Telhisa Hasegawa<sup>15</sup>, Karin Hemmann<sup>16</sup>, Emmeline W Hill<sup>17</sup>, Tosso Leeb<sup>18</sup>, Gabriella Lindgren<sup>3</sup>, Hannes Lohi<sup>16</sup>, Maria Susana Lopes<sup>9</sup>, Beatrice A McGivney<sup>17</sup>, Sofia Mikko<sup>3</sup>, Nicholas Orr<sup>19</sup>, M Cecilia T Penedo<sup>5</sup>, Richard J Piercy<sup>20</sup>, Marja Raekallio<sup>16</sup>, Stefan Rieder<sup>21</sup>, Knut H Røed<sup>22</sup>, Maurizio Silvestrelli<sup>11</sup>, June Swinburne<sup>12,23</sup>, Teruaki Tozaki<sup>24</sup>, Mark Vaudin<sup>12</sup>, Claire M Wade<sup>14</sup>, Molly E McCue. Genetic diversity in the modern horse illustrated from genome-wide SNP data. Inskickat till Genome Research 2012-06-06, OBS konfidentiell information.

I denna artikel användes den SNP-chip data från svenskstammade shetlandsponnys som genererats i krummaprojektet för att detaljerat studera genetisk variation hos många olika hästraser.

4. Jessica L Petersen<sup>1</sup>, James R Mickelson<sup>1</sup>, Aaron K Rendahl<sup>2</sup>, Stephanie J Valberg<sup>1</sup>, Lisa S Andersson<sup>3</sup>, Jeanette Axelsson<sup>3</sup>, Ernie Bailey<sup>4</sup>, Danika Bannasch<sup>5</sup>, Matthew M Binns<sup>6</sup>, Alexandre S Borges<sup>7</sup>, Pieter Brama<sup>8</sup>, Artur de Câmara Machado<sup>9</sup>, Stefano Capomaccio<sup>10</sup>, Katia Cappelli<sup>10</sup>, E Gus Cothran<sup>11</sup>, Ottmar Distl<sup>12</sup>, Laura Fox-Clipsham<sup>13</sup>, Kathryn T Graves<sup>4</sup>, Gérard Guérin<sup>14</sup>, Bianca Haase<sup>15</sup>, Telhisa Hasegawa<sup>16</sup>, Karin Hemmann<sup>17</sup>, Emmeline W Hill<sup>18</sup>, Tosso Leeb<sup>19</sup>, Gabriella Lindgren<sup>3</sup>, Hannes Lohi<sup>17</sup>, Maria Susana Lopes<sup>9</sup>, Beatrice A McGivney<sup>18</sup>, Sofia Mikko<sup>3</sup>, Nicholas Orr<sup>20</sup>, M Cecilia T Penedo<sup>5</sup>, Richard J Piercy<sup>21</sup>, Marja Raekallio<sup>17</sup>, Stefan Rieder<sup>22</sup>, Knut H Røed<sup>23</sup>, June Swinburne<sup>13,24</sup>, Teruaki Tozaki<sup>25</sup>, Mark Vaudin<sup>13</sup>, Claire M Wade<sup>15</sup>, Molly E McCue. Genome-wide analysis reveals selection for important traits in domestic horse breeds. Inskickat till Genome Research 2012-06-06, OBS konfidentiell information.

I denna artikel användes den SNP-chip data från svenskstammade shetlandsponnys som genererats i krummaprojektet för att studera signaturer av selektion i hästens arvs massa. Men denna metod kan man kartlägga viktiga egenskaper hos häst som selekterats för under utvecklingen av rasen, bland annat identifierades samma Gait-lokus som vår forskargrupp identifierat i en annan studie.

#### Referee-granskade abstracts till konferenser

1. Jessica L. Petersen, James R. Mickelson, Lisa S. Andersson, Ernie Bailey, Danika L. Bannasch, Matthew M. Binns, Alexandre Secorun Borges, E. Gus Cothran, Artur da Câmara Machado, Ottmar Distl, Michela Felicetti, Kathryn T. Graves, Gérard Guérin, Telhisa Hasegawa, Bianca Haase, Emmeline W. Hill, Tosso Leeb, Maria Susana Lopes, Gabriella Lindgren, Hannes Lohi, M. Cecilia T. Penedo, Richard Piercy, Knut H. Røed, Oliver A. Ryder, Maurizio Silvestrelli, June E. Swinburne, Teruaki Tozaki, Mark Vaudin, Claire M. Wade, Molly M. McCue. The Equine Genetic Diversity Consortium: an international collaboration to describe genetic variation in modern horse breeds. 9th International Equine Genome Workshop, A Havemeyer Foundation Workshop, July 27-30, 2011, Oak Ridge Conference Center, Chaska, Minnesota, USA. In: 9th Dorothy

Russell Havemeyer Foundation International Equine Genome Mapping Workshop, page 16.

2. Jessica L. Petersen, James R. Mickelson, Equine Genetic Diversity Consortium, Molly M. McCue. Genomic signatures of selection revealed in the modern horse. 9th International Equine Genome Workshop, A Havemeyer Foundation Workshop, July 27-30, 2011, Oak Ridge Conference Center, Chaska, Minnesota, USA. In: 9th Dorothy Russell Havemeyer Foundation International Equine Genome Mapping Workshop, page 15.

## **Projektets deltagare**

Göran Dalin, universitetslektor, docent, enheten för hippologutbildning, SLU. Ansvarig veterinär i krummaprojektet. Göran är bl.a. engagerad som ordförande för Hästkommittén vid VH-fakulteten.

Sofia Mikko, forskare och avdelningschef vid Husdjursgenetiska laboratoriet, SLU.

Gunilla Thyreen, distriktsveterinär i Nyköping. Gunilla har ett intresse för genetik i allmänhet och krumma föl i synnerhet, och gjorde sitt kliniska fördjupningsarbete inom detta ämne 1994.

Lisa Andersson, doktorand, Institutionen för Husdjursgenetik, SLU.

Gabriella Lindgren, universitetslektor, docent, Institutionen för Husdjursgenetik, SLU.

Carl-Johan Rubin, forskare, Institutionen för Medicinsk Biokemi och Mikrobiologi, Uppsala Universitet.

Nima Rafati, doktorand, Institutionen för Medicinsk Biokemi och Mikrobiologi, Uppsala Universitet.

Leif Andersson, professor, Institutionen för Medicinsk Biokemi och Mikrobiologi, Uppsala Universitet.

## **Internationell samverkan**

Ernie Bailey, professor, Gluck Equine Research Center, Department of Veterinary Science, University of Kentucky, Lexington, USA.

John Ebert, Gluck Equine Research Center, Department of Veterinary Science, University of Kentucky, Lexington, USA.

## **Referensgrupp knuten till projektet**

Dan-Axel Danielsson, Svenska Hästavelsförbundet.

Kristin Johansson, Sveriges Shetlandssällskaps avelskommitté.

Magnus Karlsson, Sveriges Shetlandssällskaps avelskommitté.

Ulrika Nordmark, Sveriges Shetlandssällskaps avelskommitté.

Rebecka Svensson, Sveriges Shetlandssällskaps avelskommitté.

## Ekonomisk Redovisning

**Projekt: Krumma föl**

**Projekt nr: H0847211**

**Period: 2009 - 2012-06-30**

### **Intäkter**

Bidrag från Stiftelsen Hästforskning	625,000
då slutrapport godkänts	50,000
<b>S:a bidrag</b>	<b>675,000</b>

### **Kostnader**

Löner	4,697
Traktamenten o bildersättning	4,256
Övriga driftskostnader	4,554
Lab kostnader	289,217
Analysuppdrag (GeneSeek SNP chip, sekvensning mm)	202,659
Datorer (Gabriella, Lisa)	30,763
Fraktkostnad (prover)	6,355
25% OH	132,499
<b>S:a kostnader</b>	<b>675,000</b>