

Slutrapport: Genetiska studier av sommareksem hos islandshästar

Bakgrund och syfte

Sommareksem, eller man- och svansskorv, är en form av överkänslighet mot insektsbett. Sjukdomen förknippats starkt med angrepp av svidknottet *Culicoides*. På Island är sjukdomen ytterst ovanlig vilket antas bero på att svidknottet inte är utbrett i landet. I en studie gjord på hästar i Sverige har en överensstämmelse mellan utbredningen av svidknottet och sommareksem påvisats (Broström et al. 1987). Av de islandshästar som importerats till Sverige från Island får omkring 30 % sommareksem, medan frekvensen hos svenskfödda islandshästar är cirka 8 % (Björdottir et al 2006, Eriksson et al 2008). Sjukdomen medför ett stort lidande för hästen och en ekonomisk förlust för ägaren. Sommareksem visar sig i milda fall som en förtjockning av och klåda i mankam och svansrot. I svåra fall bildas ett vätskande eksem över en stor del av kroppen med påverkan av allmäntillståndet. Utlösandet av den allergiska hudinflammationen är ett komplext samspel mellan arv och miljö. Denna studie har pågått under tre år (2005-2007) med det övergripande syftet att studera den ärftliga bakgrunden till sommareksem hos islandshästar. Projektet kommer att fortsätta under minst 3 år till (2008-2010) med mål att identifiera kromosomregioner och gener som reglerar eksemutveckling.

Projektets målsättning

Målet i den första fasen av denna studie var att samla in kliniska data om sommareksem ifrån ett stort antal islandshästar födda i Sverige. Vi ville även att de kliniska uppgifterna skulle vara graderade med avseende på sjukdomens svårighetsgrad. Ur vårt insamlade dataset ville vi sedan kunna göra två saker; 1) beräkna ärftligheten för sommareksem och 2) identifiera stora halvsyskonfamiljer att användas för att hitta eksemgener. Ifrån de identifierade halvsyskonfamiljerna ville vi sedan samla in hår- och blodprover. Det insamlade hästmaterialet kommer vi att använda både för att studera kandidatgener samt för att göra en omfattande sökning i hela arvsmassan efter gener som reglerar eksemutveckling hos islandshäst. En kandidatgen är en gen som redan blivit associerad till eksemutveckling genom studier av en annan art (exempelvis hos människa, hund eller mus) eller hästras.

Material och metoder

Arvbarhetsskattning av sommareksem

Under år 2005 distribuerade vi en enkät till över 3000 hästägare. Enkäten riktade sig till ägare av islandshästar födda i Sverige år 1991-2001 efter 33 olika hingstar med många avkommor. Enkäten kunde besvaras antingen via brev eller Internet.

Kloning och sekvensering av kandidatgenen SPNIK5

Serinproteasinh inhibitorn som kodas av genen SPINK5 har i flera studier hos människa visats vara associerad till utveckling av allergiskt eksem (Hoffjan and Epplen 2005). Vi har därför klonat och strukturbestämt (antal och längd av exoner/introner) genen hos häst. Detta har vi gjort genom att ta fram cDNA-sekvensen för genen och sedan amplifierat genomiskt DNA med hjälp av PCR. Renade PCR-produkter sekvenserades ifrån båda håll med DYEnamic™ ET dye terminator kit (Applied Biosciences Uppsala, Sweden) och genererades på ett MegaBACE 1000 kapillär instrument

(Amersham Biosciences). Sekvenserna analyserades i mjukvaruprogrammet Sequencher 3.1.1 software (Gene Codes Corporation, Inc, Ann Arbor, MI, USA). SPINK5 resekvenserades sedan hos fem sjuka och fem friska islandshästar för att identifiera singelnukleotidpolymorfier (SNPs eller enkelbasparsvariation) att användas för att testa om association fanns med sjukdomen hos ett större antal individer. Identifierade SNPs genotypades därefter med hjälp av pyrosekvensering (Pyrosequencing Inc.) hos > 250 individer.

Resultat

Arvbarhetskattning

Vi har i en enkätstudie utskickad till över 3000 hästägare samlat in sjukdomsdata från cirka 1800 hästar. Svarefrekvensen på enkäten var ungefär 40%. Graden av eksem registrerades i fyra klasser, från symptomfri till svårt eksem. Frekvensen av sommareksem var 8% och varierade mellan 0-30% för avkomme grupper till olika hingstar. Avkommor efter ston med sommareksem hade i högre grad själva utvecklat eksem. Vi såg inga signifikanta effekter av hästens ålder, däremot fanns en signifikant effekt av region i Sverige och av kön: valacker hade något mer problem än ston.

Av de ca 1800 individerna kvalificerade 1250 att ingå i en statistisk analys för att beräkna arvbarheten för sommareksem hos svenskfödda islandshästar. Arvbarheten för svårighetsgrad av sommareksem beräknades till 0.3 med en så kallad fadermodell. Mottaglighet för eksem hos svenskfödda islandshästar beror således till cirka 30 % på genetiska faktorer.

Insamling av biologiskt material

En förutsättning för att detta projekt ska nå målsättningen och lyckas identifiera de gener som reglerar uppkomst av eksem är insamlingen av hästmaterialet. Vi har genom enkätstudien identifierat 13 halvsyskonfamiljer där sommareksem segregerar. Vi samlat in 251 hårprover ifrån de 13 familjerna (där 12 % har eksem). Förutom det utvalda familjematerialet identifierade enkätstudien ytterligare 71 svenskfödda hästar med eksem. Vår ansträngning att samla in och identifiera blodprover har resulterat i 230 prover ifrån sjuka och friska islandshästar. Ytterligare 36 blodprover härrörande ifrån 17 andra hästraser finns i vår blodbank. Detta är ett tillräckligt antal prover för att utföra så kallade associationsstudier både av kandidatgener och över hela arvsmassan.

Analys av kandidatgenen SPINK5

SPINK5 har genom studier hos människa vistats associera till eksem och kodar för ett protein som heter LEKTI. Proteinet hämmar skadliga främmande ämnen, serinproteaser, som angriper huden. LEKTI antas därför spela en roll för att bibehålla hudens funktion som en skyddande barriär. För att detektera SNPs i SPINK5 resekvenserades hos 12 sjuka och 12 friska islandshästar för hela genen. De identifierade polymorfierna visas i Tabell 1. Totalt har vi sekvenserat 8.2 kilobaser hos ca 18-24 individer. Ungefär 20 % av sekvensen representeras av exoner i SPINK5, resten är intronsekvens.

Tabell 1. Detection av SNPs i SPINK5 med hjälp av re-sekvensering

Exon	Number of SNPs	Position
1	3	-289(A/G), -50(G/T), +6(A/T)
2	0	
3	0	
4	0	
6	2	-394(C/T), -160(C/T)
7	4	-183(G/T), 93(A/G), +90 (C/T), +104(C/T)
8	1	+100(C/T)
9	3	-83(C/T), 82(C/G), +70(A/T)
10	2	45(A/C), +24(C/T)
11	1	+202(C/T)
12	3	-60(C/T), +85(A/G), +113A/G)
13	0	
14	1	+170 (C/T)
15	2	20(A/G), 64(A/G)
16	3	-186(A/G), -56(C/A), -54(C/T)
17	1	-188(A/G)
18	0	
19	0	
20	1	-156(G/T)
21	0	
22	2	-16(A/G), +218(C/G)
23	0	
24	3	-55(A/G), -43(C/T), +125(A/G)
25	3	-124(A/C), -21(C/T), +139(A/G)
26	0	
27	0	
28	3	-124(A/C), -21(C/T), +139(A/G)
29	0	
30	2	-48(C/T), 73(C/G)
32	2	+11(G/T), -113(C/T)
33	1	-64(T/C)

The exons are listed according to their human homologue and the SNPs are named on the basis of their position with respect to the exon. The SNP is positioned within the exon if there is no character in front of the numbers, the number represent the position from the starting base of the exon. Minus indicates that the SNP is 5' to the exon and plus that it 3' to the exon. The number denotes the distance (bp) between the SNP and the 5' and 3' end of the exon respectively.

Fyra av 43 identifierade SNPs i SPINK5 valdes ut för vidare analys hos ett större antal sjuka och friska islandshästar för att utreda om genen associerade till sommareksem eller inte. Totalt genotypades 62 sjuka individer och 220 friska individer för de fyra SNP-markörerna. Genetisk variation i SPINK5 mellan individerna korrelerades med förekomst av sommareksem. Tabell 2 visar genotypningsresultaten för en av de testade SNP-markörerna som ligger i exon 15 position 20.

Tabell 2. Genotypningsresultat av SNP i exon 15 position 20.

Hingst	sjuka			friska		
	CC	CT	TT	CC	CT	TT
1	2	0	0	19	2	2
2	5	0	0	11	0	0
3	4	2	0	17	8	5
4	0	1	0	2	0	0
5	4	0	0	13	2	0
6	2	0	0	2	0	0
7	4	0	0	14	2	0
8	1	0	0	2	0	0
9	2	1	0	14	2	0
10	5	0	0	16	4	0
11	1	0	0	1	0	0
12	1	0	0	6	0	0
13	6	0	0	30	4	0
14	1	2	0	5	1	0
15	3	1	0	15	1	0
16	2	0	0	8	1	0
17	11	0	0	10	1	0
18	1	0	0	0	0	0
	55	7	0	185	28	7

frekvens sjuka CC 0,887

frekvens sjuka CT 0,113

frekvens friska CC 0,841

frekvens friska CT 0,127

frekvens friska TT 0,032

Ingen association till sjukdom kunde påvisas i hästmaterialet för någon av de fyra SNP-markörerna. Studien visar att genen SPINK5 troligen inte har en betydande roll för uppkomst av eksem hos islandshäst.

Diskussion och framtidsplaner

Nästa steg är att påbörja det omfattande arbetet med att ta reda på vilka specifika gener som orsakar eksem. År 2008 planerar vi att göra en omfattande sökning i hela arvsmassan efter gener som reglerar eksemutveckling hos islandshäst. Arvsmassan hos hästarna i vårt insamlade sjukdomsmaterial kommer att genomsökas med hjälp av ett så kallat SNP-chip. SNP-chipet innehåller 50.000 genetiska markörer (avläsningspunkter) väl spridda över alla kromosomerna. De genetiska markörerna kommer att läsas av hos 100 eksemhästar och 100 friska kontroller. Efter en avancerad statistisk analys kan man sedan fastställa vilka avläsningspunkter som associerar till sjukdomen. Därefter går man vidare och tittar på vilka gener som ligger i närheten av de sjukdomsassocierade avläsningspunkterna. SNP-chipet är idag färdigkonstruerat och en första leverans beräknas ske under februari 2008.

När eksemgenerna sedan blivit identifierade blir det möjligt att designa enkla genetiska tester för eksem. Då kan vi ge hästuppfödare den information de behöver

för att bli mer precisa i sitt avelsarbete. 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 kan tas fram när som helst under dess livstid och inte kräver att individen har reproducerat sig. Genetiska tester har störst betydelse för sjukdomsgener. Den höga förekomsten av eksem hos vissa hästraser gör det svårt att exkludera alla sjuka individer för avel. I stället krävs ett mer långsiktigt avelsarbete mot friskare hästar där de allra sjukaste individerna tas ut avel först.

Publikationer

Vetenskaplig tidskrift

1. S. Eriksson, K. Grandinson, W.F. Fikse, L. Lindberg, S. Mikko, H. Broström, R. Frey, M. Sundquist, and G. Lindgren. 2008. Genetic analysis of insect hypersensitivity (summer eczema) in Icelandic horses. *Accepted for publication in Animal*. Preprint inskickat till Peter Kallings, SSH.
2. Andersson LS, S. Mikko, C. Högström, S. Eriksson, K. Grandinson, R. Frey, M. Sundquist, H. Broström, G. Lindgren. Manuskript. Skickar ett preprint till SSH när artikeln har blivit accepterad.

Proceedings och konferensabstrakts vid vetenskapliga konferenser

1. The 8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production (WCGALP), August 13-18, 2006, Belo Horizonte, MG, Brazil; **Katja Grandinson**. Grandinson, K., Lindberg, L., Eriksson, S., Mikko, S., Broström, H., Frey, R., Sundquist, M. & Lindgren, G. 2006. Genetic parameters for allergic eczema in Icelandic horses. Proceedings of the 8th WCGALP. Belo Horizonte, Brazil, CD-ROM communication no. 08-04.
2. The 21st Annual Congress of the European Society of Veterinary Dermatology (ESVD) and of the European College of Veterinary Dermatology (ECVD), Lisbon, Portugal, 7-9 September 2006; **Hans Broström**. Abstrakt.
3. The European Association for Animal Production (EAAP), 24-28th of September 2006, Potsdam, Germany; **Katja Grandinson**. Abstrakt.

Examenarbeten

1. Lisa Andersson. SPINK5 as a candidate gene for summer eczema in horses. SLU. 10-veckors arbete.
2. Lisa Andersson. Genetic analysis in the horse: summer eczema and Dun coat color (two separate investigations). Uppsala Universitet. 20-veckors arbete.

Övrig resultatföredling till näringen

Populärvetenskapliga presentationer vid "hästevenemang" eller artikel i hästtidning

1. Hästmagazinet (Juni 2005).
2. Tidningen Ridsport (augusti 2005 samt mars 2006).
3. Häst2006, mars, Västerås; presentation av **Louise Lindberg** (examenarbetare arvbarhet) och **Sofia Mikko**. 2800 personer besökte Häst2006.
4. Hippocampus lunchseminarium 5 april, 2006; **Louise Lindberg**.
5. Hippocampusdagarna 25-26 april, 2006; **Susanne Eriksson**. Abstrakt och muntlig presentation.
6. Svenska islandshästföreningens (SIF) avelsmöte, 4-5 november, 2006, Solbacka; **Susanne Eriksson**.
7. **Eriksson S**. 2007. Varför får hästar sommareksem? Shetlandspönnyn vol 1 44-45
8. **Marie Sundqvist**. 2007. Rapport från eksemstudien. Islandshästen nr 6: 29.
9. **Hans Broström**. Muntlig presentation vid Häst2007, Kunskapsdagar & mäsas i Västerås 9 - 11 mars 2007. Rubrik: "Knölar, krustor, hårlösa fläckar, mugg, klåda och infektioner i huden hos häst".
10. **Hans Broström**. Föreläsning. Djurgymnasiet, Stockholm 10/12 -07 under rubriken "Hudproblem på häst".

Presentationer på websidor

1. Hippocampus: <http://hippocampus.slu.se/>.
2. Svenska Islandshästförbundet: <http://www.icelandichorse.se>.
3. Forskningsgruppens egna websidor:
<http://www.imbim.uu.se/forskning/lindgrenresearch.html>
<http://www.anst.uu.se/gabrlind/>
4. Information om sommareksemprojektet finns på Horse Genome Project:
<http://www.uky.edu/Ag/Horsemap/welcome.html>

Forskargruppen planlägger att göra en ny egen forskningshemsida vid SLU under 2008.

Projektets deltagare

Lisa Andersson, doktorand, Husdjursgenetik, SLU

Hans Broström, docent och universitetslektor, Kliniska vetenskaper, SLU

Susanne Eriksson, forskarassistent, Husdjursgenetik, SLU

Rebecka Frey, leg vet, internationell avelsdomare och hudkonsult, Norsholms djursjukhus, Norrköping

Katja Grandinson, forskarassistent, Husdjursgenetik, SLU

Gabriella Lindgren, forskarassistent, Husdjursgenetik, SLU

Sofia Mikko, forskare och ledare av Husdjursgenetiska laboratoriet, SLU.

Marie Sundquist, med dr, leg läk, överläkare Kalmar länsjukhus.

Referenser

Björnsdóttir S., Sigvaldadóttir J., Broström H., Langvad B., Sigur_sson A. (2006) Summer eczema in exported Icelandic horses: influence of environmental and genetic factors *Acta Vet Scand* 26:48:3.

Broström H., Larsson Å., Troedsson M. (1987) Allergic dermatitis (sweet itch) of Icelandic horses in Sweden: an epidemiological study. *Equine Vet J* 19:229-36.

Hoffjan S., Epplen J. (2005) The genetics of atopic dermatitis: recent findings and future options. *J Mol Med* 83:682-692.

S. Eriksson, K. Grandinson, W.F. Fikse, L. Lindberg, S. Mikko, H. Broström, R. Frey, M. Sundquist, and G. Lindgren. 2008. Genetic analysis of insect hypersensitivity (summer eczema) in Icelandic horses. *Accepted for publication in Animal*.