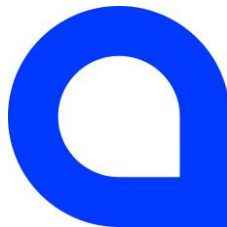


Leitin að erfðapáttum bóggreppu
Fyrsti áfangi 2021-2022



Lokaskýrsla til fagraðs í sauðfjárrækt. Verkefnisstjóri: Charlotta Oddsdóttir. Höfundar skýrslu: Charlotta Oddsdóttir (Keldur), Eyþór Einarsson (RML), Sæmundur Sveinsson (Matís)

Útgefandi: Tilraunastöð Háskóla Íslands í meinafræði að Keldum, Keldnavegi 3, 112 Reykjavík.

Efnisyfirlit

Leitin að erfðabáttum bógreppu - lokaskýrsla	2
Ágrip	2
Inngangur	2
Bógreppa í íslensku sauðfé	2
Arfgengir gallar í beinmyndun hjá dýrum	3
Efniviður og aðferðir	5
Sýnataka	5
Skoðun, krufning og meðhöndlun lambahræja	5
Einangrun erfðaefnis og arfgerðargreining	5
Ætternisgreining	6
Niðurstöður	6
Meinafræðigreining á beinum	6
Arfgerðargreining	10
Umræður	10
Lokaorð og áframhaldandi rannsóknir	11
Heimildir	11

Leitin að erfðapáttum bógkreppu- lokaskýrsla

Skýrsla þessi er fyrsti áfangi rannsóknar á bógkreppu í samstarfi Matís, RML og Tilraunastöðvar HÍ í meinafræði að Keldum.

Ágrip

Bógkreppa er erfðagalli sem virðist vera bundinn við íslenska sauðfjárstofninn og allar rannsóknir benda til að þetta sé víkjandi galli í einu geni. Erfiðlega hefur gengið að losna við gallann úr hjörðum hér á landi og nokkur dæmi þess að hrútar hafa valist inn á sæðingastöðvarnar sem reynast arfberar. Markmið þessa verkefnis var að kortleggja svæðið sem veldur bógkreppu, lýsa meinafræði gallans og þróa erfðapróf sem hægt er að nýta til að finna arfblendna einstaklinga í hjörðum. Arfgerðargreining var framkvæmd á 79 gripum. Nothæfar niðurstöður úr arfgerðargreiningu fengust úr 75 gripum. Þar á meðal voru 20 bógkreppulömb, 20 arfberar og 35 heilbrigðir einstaklingar. Bógkreppusýnin komu frá 8 búum. Fimm af bógkreppulömbunum voru einnig krufin til þess að lýsa meinafræði gallans og áhrifum hans á beinvöxt. Tölfræðileg úrvinnsla leiddi í ljós arfhreina setröð á svokölluð PAR svæði á X-litningi sem virðist fylgja svipgerð og væntanlegri arfgerð, þ.e.a.s bógkreppulömbin voru með tvö eintök af setröðinni sem veldur gallanum og foreldrar þeirra greindust með eitt eintak. Þessi setröð inniheldur fjögur gen en að minnsta kosti tvö þeirra hafa hlutverki að gegna í beinvexti og því mikilvægt að rannsaka þau frekar. Af þessum fjórum genum er mest vitað um SHOX genið en stökkbreytingar í því hafa verið tengdar ýmsum svipgerðum beinrangmyndunar. Ekki tókst að þróa einfalt erfðapróf til að greina arfblendna einstaklinga í þessum fasa verkefnisins en vonir eru bundnar við að hægt verði að nýta setröðina til að finna arfblendna einstaklinga með erfðagreiningum og er sú vinna í fullum gangi.

Inngangur

Þegar sótt var um styrk til þess að leita að erfðapáttum bógkreppu árið 2021 hafði þegar safnast efniviður frá búum þar sem bógkreppa er þekkt og talin eiga sér sameiginlega uppsprettu. Safnað hafði verið vefjasýnum til arfgerðargreiningar, heilum hræjum lamba með bógkreppu og ættartré gripa á búunum greind.

Meginmarkmið rannsóknarinnar var að staðsetja svæði í erfðamengi sauðfjár þar sem gen fyrir bógkreppu er að finna. Í því skyni átti að:

1. lýsa meinafræði bógkreppu hjá lömbum og bera saman við þekktu galla af svipuðum toga í erlendum sauðfjárkynjum
2. kortleggja gen sem líkleg eru til þess að valda gallanum í einstaklingum sem eru heilbrigðir arfberar og einstaklingum sem fæðast með gallann
3. þróa einfalt greiningarpróf sem nýta mætti til að leita að erfðagallanum í sæðingahrútum sem og öðrum gripum.

Bógkreppa í íslensku sauðfé

Arfgengur víkjandi erfðagalli sem nefndur er bógkreppa hefur þekkt í íslensku sauðfé í áratugi. Helstu einkenni bógkreppu eru stuttir, snúnir og/eða skekktir framfætur. Flest bógkreppulömb geta ekki stigið í framfætur og komast því ekki á legg (Oddný Steina Valsdóttir, 2005). Ekki hefur tekist að útrýma bógkreppu með hefðbundnum aðferðum og reglulega koma upp dæmi um gallann þó tíðni hans sé talin lág í landinu.

Arfgengir gallar í beinmyndun hjá dýrum

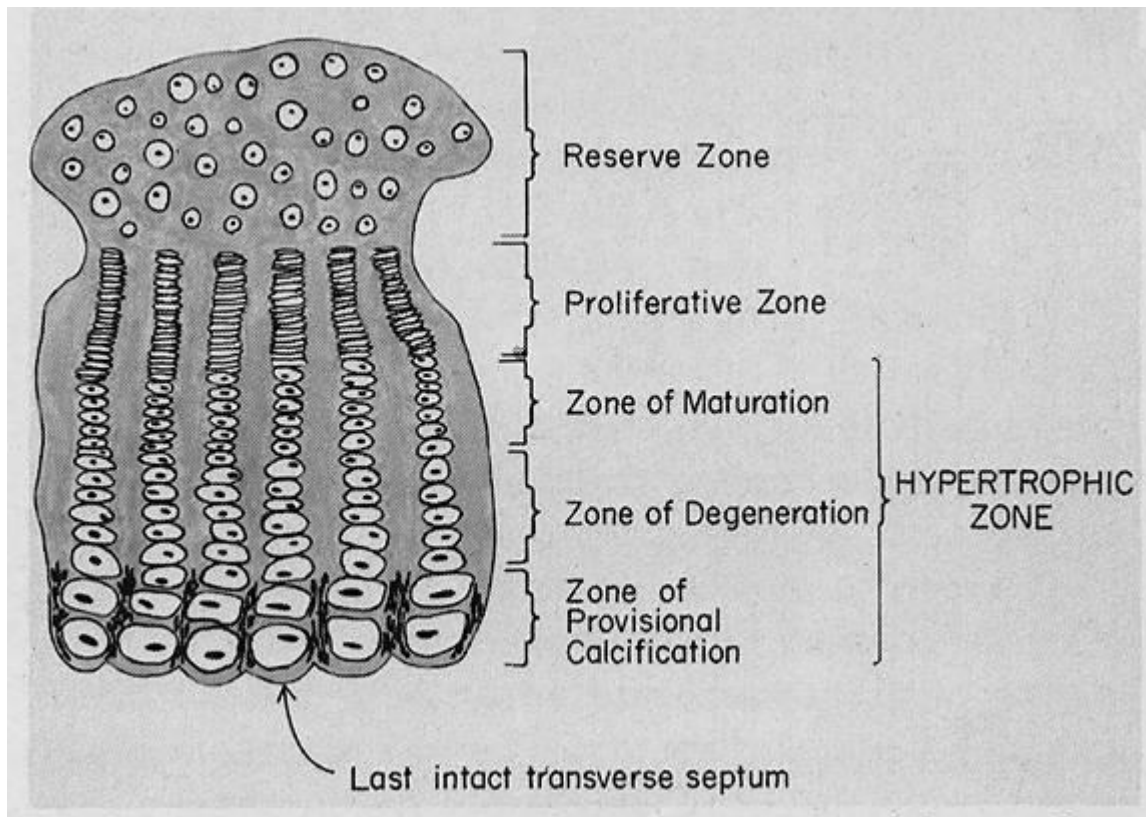
Ýmsum arfgengum göllum á beinvexti hefur verið lýst hjá búfé. Beinvöxtur langra beina fer fram með beinýmyndun úr brjóski, svokölluðum vaxtarlínunum í báðum endum beinanna (Brighton 1978). Brjóskrumurnar raðast skipulega í svæði innan vaxtarlínanna (biðsvæði (reserve), fjölgunarsvæði (proliferative) og stækkunarsvæði (hypertrophic). Innan stækkunarsvæðis fer fram, í þessari röð: þroskun (maturation), hrörunn (degeneration) og byrjandi kölkun (provisional calcification), sjá mynd 1. Með því að skoða þessar vaxtarlínur og svæði innan þeirra má gera sér grein fyrir því hvar gallinn í beinvexti er.

Arfgenga galla í beinmyndun má flokka í a) bein- og brjóskrangvöxt (osteochondrodysplasia) og b) beinarangmyndun (dysostosis) sem getur gefið upplýsingar um það hvaða ferlar hafa farið úrskeiðis í myndun og vexti beinanna (Mundlos og Olsen 1997a). Dysplasia felur í sér galla í beinvef almennt og veldur almennum dverg vexti einstaklings. Dysostosis hefur ekki áhrif á beinvef almennt og þar með ekki öll bein, og veldur því ekki almennum dverg vexti þar sem önnur bein eru eðlileg. Í mörgum tilfellum er beinrangmyndun í stökum beinum tilkomin vegna stökkbreytinga í umritunarþáttum (transcription factors) eða boðefnum (signalling molecule). Röng myndun á frumlimum á fósturstigi (anlage) getur valdið slíkum rangmyndunum. Umritunarþættir eru mikilvægir í réttri myndun beinanna (Mundlos og Olsen 1997). Lýst hefur verið heilkennum þar sem beinin eru mismikið aflöguð innan sama einstaklings, svo sem Kniest dysplasia hjá mönnum (Mundlos og Olsen 1997b) og Ellis-van Creveld heilkenni hjá nautgripum (Muscatello o.fl. 2015).

Osteogenesis imperfecta (OI) er hópur sjúkdóma sem finnast hjá mörgum dýrategundum og einkennast af brothættum beinum vegna stökkbreytinga í þeim genum sem stýra myndun á kollageni I sem er helsta stoðefni beinvefjar (Thompson o.fl. 2008). Hjá sauðfé erfist sjúkdómurinn oftast á ríkjandi hátt, sem afleiðing af stökkbreytingu í forstigi sáðfrumna og getur þannig valdið hrinu tilfella hjá afkvæmum heilbrigðs hrúts (Thompson o.fl. 2008). Þannig eru heilbrigð afkvæmi slíks hrúts ekki arfberar gallans. Alvarleiki sjúkdómsins getur verið mismikill, yfir í að lömb drepist í burði vegna áverka á beinum, húð og augu geta einnig verið óeðlileg. Í sauðfé með OI eru öll bein óeðlilega mynduð.

Beinkröm er langoftast næringartengd, en þó hefur verið lýst tilfelli arfgengrar beinkramar. Hún kom fram í lömbum sem urðu til við fósturvís aflutninga í Nýja-Sjálandi 2007 og þykir líklegast að um víkjandi erfðir sé að ræða. Lömbin fæddust eðlileg en fóru að sýna einkenni beinkramar á fyrstu mánuðum ævinnar (Thompson o.fl. 2008). Rannsóknir á blóðsýnum úr þessum lömbum benda til þess að um sé að kenna skorti á eðlilegu svari marklíffæra við D-vítamíni. Vefjaskoðun á slíkum beinum leiðir í ljós þykkun á svæðinu undir vaxtarlínunum, með eyjum af brjóski innan um beinvefinn (Dittmer o.fl. 2016).

Brjóskrangvöxtur (chondrodysplasia) hefur áhrif á lengdarvöxt beina í útlimum, hrygg og andliti. Í mörgum tilfellum kemur fram dergvöxtur, og í mjög alvarlegum tilfellum geta fæðst ólífvanleg afkvæmi, svo sem hjá nautgripum (Agerholm o.fl. 2016). Nokkrum heilkennum með mismunandi arfgerðir hefur verið lýst hjá nautgripum en þau fela í mörgum tilfellum í sér breytingar á kollageni II og öðrum efnem sem mynda stoðefni beinvefjarins (Agerholm o.fl. 2016). Í þessum galla sjást gjarnan miklar breytingar á mjúkvæfjum einnig. Agerholm o.fl. (2016) lýstu sjálfsprottinni stökkbreytingu í kímfrumum ræktunarnauts sem erfðist ríkjandi. Brjóskrangvöxtur kemur reglulega upp í nautgripum á Ástralíu, sem telst vera næringartengdur og veldur bjögun á vaxtarlínunum í fram- og afturlimum, meðal annars þunnu og óreglulegu stækkunarsvæði (McLaren o.fl. 2007).



Mynd 1 Skýringarmynd af vaxtarlínu langra beina. Neðst á myndinni tekur við beinvefur. Brjósfrumurnar raðast skipulega í svæði innan vaxtarlínanna (biðsvæði (reserve), fjölgunarsvæði (proliferative) og stækkunarsvæði (hypertrophic) sem felur í sér þroskun (maturation), hrörnun (degeneration) og byrjandi kölkun (provisional calcification). Mynd frá Brighton (1978). Structure and function of the growth plate. Clinical Orthopedics and Related Research (136), 22-32.

Heilkenni köngulóarlamba (Spider lamb syndrome) orsakast af brjóskrangvexti en lýsir sér í óvenjulöngum útlimum, hryggskekkju, afmynduðum rifbeinum og bringubeinum. Einnig eru þessi lömb mögur og vöðvarýr (Beever o.fl. 2006). Gallinn erfist með jafnríki (co-dominant) og veldur truflun í vaxtarþáttaviðtaka 3 (FGFR3) sem hefur það hlutverk að hemja brjósfrumuskiptingar í vaxtarlínunum og þannig takmarka lengd beinanna. Fyrir vikið verða vaxtarlínur frumuríkari, sérstaklega í fjölgunar- og vaxtarsvæðum brjósfrumnanna, og uppstilling frumnanna verður óreiðukennd (Beever o.fl. 2006).

Rangvöxtur sem lýst hefur verið í brasilísku feldfé (Cabugi heilkenni) erfist líklega með takmörkuðu ríki og hefur í för með sér dvergöxt og vansköpun á höfuðkúpu (Dantas o.fl. 2014). Í Texel fé hefur verið lýst brjóskrangvexti í lömbum sem virðast eðlileg við burð en sýna sig svo fljótlega að vera dvergvoxin, gleiðfætt og úthaldslítill (Thompson o.fl. 2005). Í þeim lömbum var barkinn þröngur og þykkveggja, rof í liðbrjóski í útlimum og í öllum brjóskefjum sást óregluleg uppstilling brjósfrumna sem ýmist voru of stórar eða samanskroppnar. Þetta þótti því bera öll einkenni brjóskrangvaxtar sem erfist með víkjandi erfðum.

Í lýsingum á Ellis-van Creveld heilkenni hjá kálfum kemur fram að einungis bóg- og lærleggir en engin hinna beinanna í útlimum sýndu breytingar. Vefjaskoðun sýndi að í vaxtarlínunum var hvíldarsvæði mikið stækkað, fjölgunarsvæði þynnra en vanalega og brjósfrumur röðuðu sér ekki í súlur. Einnig sáust brjóskeyjar í beinvef (Muscatello o.fl. 2015). Heilkennið erfist með víkjandi erfðum og orsakast af breytingum á hlutverki kollagenanna II og X í stoðvef vaxtarlínanna.

Efniviður og aðferðir

Í verkefninu var lögð áhersla á rakningu ætta sem lágu bakvið bógreppulömb og voru valin bú sem höfðu sameiginlega ættfeður sem þótti auka líkur á því að um sama erfðagalla væri að ræða. Sýnum úr bógreppulömbum og foreldrum þeirra var safnað á árunum 2018 til 2022. Sýnin komu frá Álftharhóli í Landeyjum, Brúnastöðum í Flóa, Böðvarshólum á Vatnsnesi, Eystri-Leirárgörðum í Leirársveit, Hafrafellstungu í Öxarfirði, Hrafnkelsstöðum í Hrunamannahreppi, Presthólum í Öxarfirði og Skipholti í Hrunamannahrepp.

Sýnataka

Bógreppulömb sem aflífuð höfðu verið fljótlega eftir burð voru ýmist varðveitt heil eða eyru tekin. Bændur geymdu slík sýni frosin þar til þau voru send að Keldum eða Matís. Sýni úr lifandi gripum voru tekin með AllFlex töng sem tekur afklippur úr eyra, 3 mm í þvermál og sem varðveittar eru í etanóli.

Skoðun, krufning og meðhöndlun lambahræja

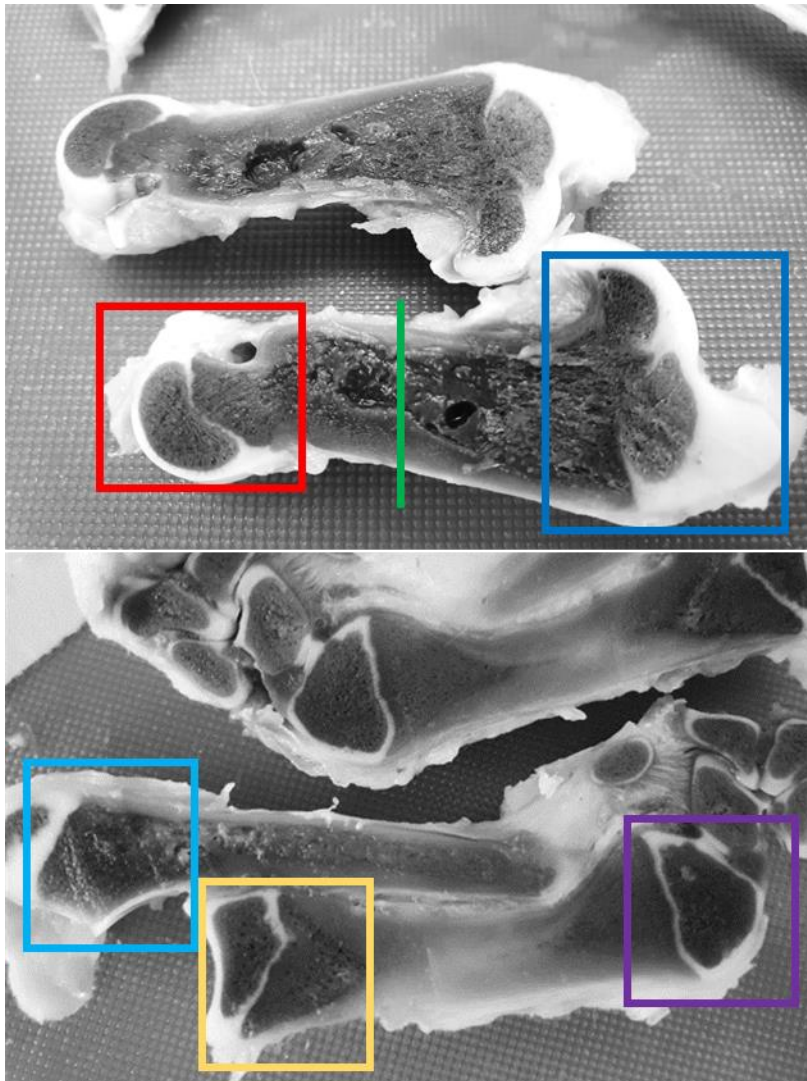
Í þessum áfanga verkefnisins voru hræ bógreppulamba röntgenmynduð á höfuðkúpu og strekktum framfótum bæði frá hlið (*mediolateral*) og beint ofan frá (*dorsopalmar*), og sköpulagi framfóta lýst stórsætt. Eftir það voru framfætur losaðir frá skrokki, fláðir og beinin hreinsuð gróflega af vöðvum og sinum. Á lömbum sem krufin voru í nóvember voru fætur fjarlægðir áður en kom til röntgenmyndunar, og einungis fæturnir myndaðir. Þetta gaf mun betri myndir en þegar allur skrokkurinn var myndaður.

Eftir röntgenmyndun voru beinin lögð í formalín án þess að þau væru skilin að, það er herðablað (*scapula*), bógleggur (*humerus*), sveif (*radius*) og öln (*ulna*), og framfótarbein (*metacarpus*) og klaufir. Beinin lágu í sex vikur í formalíni og voru eftir það losuð hvert frá öðru og lögð í maurasýru til afkölkunar sem tók tvær vikur.

Teknir voru bútar úr bólegg, öln og sveif á völdum stöðum (mynd 2) til vefjavinnslu. Vefjasneiðar voru skornar 2,5 µm að þykkt, litaðar með HE-litun.

Einangrun erfðaefnis og arfgerðargreining

Erfðaeefni úr lambahræjum var einangrað á rannsóknastofu Matís í erfðafræði en sýni úr lifandi gripum voru tekin í tvíriti í Allflex túbur. Sbeadex Livestock DNA Purification Kit frá LGC var notað við einangrun á erfðaeefni. Annað eintakið er geymt á Matís og hitt sent til Ag-Research til úrvinnslu. Foreldragreiningum var beitt til að staðfesta faðerni í þeim sýnum þar sem faðerni var ekki talið öruggt (Sæmundur Sveinsson o.fl. 2021). Arfgerðagreining var framkvæmd á tvenns konar genaflögum hjá Ag-Research. Öll sýni voru greind á AgR Ovine 60Kplus (AgR flaga), sem inniheldur um 60.000 erfðamörk. Þau sýni sem virkuðu á AgR flögunni voru greind á mun stærri flögu, svokallaðri Ovine Infinium® HD SNP BeadChip (HD flaga), sem inniheldur um 600.000 erfðamörk. Leitað var að arfhreinum runum (*Runs of homozygosity*) í erfðamengjum gripanna. Aðferð sem nefnist kortlagning arfhreinna (*Homozygosity Mapping*) var beitt til að finna arfhreina runu í bógreppulömbum og foreldrum þeirra, sem frábrugðin er þeim viðmiðunarsýnum sem greind voru (Alkuraya 2010). Tilgátan var sú að arfhreina svæðið, sem inniheldur erfðagallann, eigi sameiginlegan uppruna. Þar sem erfðagallinn sem veldur bógreppu er talinn vera bundinn við íslenskt fé, mátti búast við að arfhreina svæðið í kringum stökkbreytinguna væri talsvert stórt, þar sem svæðin eru einungis brotin upp við endurröðun milli litninga í rýriskiptingu kynfruma.



Mynd 2 Skurður á beinum framfóta til vefjavinnslu. Bógleggur (Liðkefli, miðleggur, liðkúla), öln (olnbogahöfuð), sveif (Liðflötur fjær, liðflötur nær).

Ætternisgreining

Þegar lömb með bógkreppu voru valin inn í verkefnið var horft til þess að lömbin væru frá búum þar sem bógkreppa væri þekkt og eða hefðu tengingu við þekktu bógkreppugjafa. Þetta var gert til þess að reyna að tryggja að lömbin væru raunverulega með erfðagallann bógkreppu en ekki aðra tilfallandi vansköpun. Í gagnasafninu eru undirhópar af lömbum sem tengjast í gegnum sameiginlega ættfeður sem eru taldir hafa dreift bógkreppu. Nánast öll bógkreppulömb í gagnasafninu sem hægt var að rekja nægilega langt aftur var hægt að rekja í þá Stakk 79-975 eða Hyl 75-947 frá Berghyl en þeir voru fyrstu sæðingastöðvahrútarnir sem bendlaðir voru við að dreifa bógkreppu.

Niðurstöður

Meinafræðigreining á beinum

Í mars 2022 voru tekin til skoðunar hræ af tveimur hrútlömbum frá Eystri-Leirargörðum sem fæðst höfðu vorið 2018 og verið geymd við -20°C síðan þá. Lömbin voru röntgenmynduð á framfótum og höfuðkúpu og sköpulagi framfóta var lýst stórsætt. Röntgenmyndir sýndu eðlilega höfuðkúpu og því

ekki um að ræða transeyði og snúna fætur (líklegast annar arfgengur galli en bógreppa, Oddný Steina Valsdóttir 2005).



Mynd 3. Framfætur úr tveimur bógreppulömbum, hrútum fæddum vorið 2018 á E-Leirargörðum. Stærstu vöðvar og sínar hafa verið fjarlægð en beinin ekki skilin að. Ekki er unnt að rétta meira úr liðunum en sést á myndinni. Fæturnir á myndinni til vinstri eru úr lambi 1 og á þeirri hægri úr lambi 2

Lamb 1: Svartfleckóttur lítill hrútur. Ekki var unnt að rétta úr framhnjám, olnbogum eða bóglið. Klaufir krepptar við klaufhvarf og snúna þannig að klaufbotnar sneru saman (*supinatory rotation of distal limbs*, mynd 3). Þrátt fyrir að framfætur væru teygðir eins vel og unnt var fyrir röntgenmyndum var greinilegt að sjá að olnbogaliður var í um 90° krepptu og ekki var unnt að rétta framhné að fullu (mynd 4). Greinilegt var að snúningur á klaufum kom frá framhné þar sem framnésbeinin sást í *dorsopalmar* stöðu en ekki *mediolateral* stöðu eins og efri bein.

Lamb 2: Svartfleckóttur nettur hrútur, eilítið stærri en lamb 1. Ekki var unnt að rétta úr framhnjám, olnbogum eða bóglið. Klaufir voru meira krepptar við klaufhvarf en á lambi 1 og snúna með klaufbotnana saman (mynd 2). Þrátt fyrir að framfætur væru teygðir eins vel og unnt var á röntgenmyndum er greinilegt að sjá að axlarliður réttist ekki, olnbogaliður er í um 90° krepptu og ekki er unnt að rétta framhné að fullu (mynd 5). Sama sást og á lambi 1, að snúningur sem á klaufum var um framhnéð.



Mynd 5. Röntgenmynd af vinstri framfæti hrúts með bóggreppu. Ekki var unnt að rétta betur úr fótleggnum. Olnbogaliður er u.þ.b. 90° krepptur og framhné réttist ekki að fullu. Enn fremur er snúningur um framhné sem veldur því að klaufir snúa botnunum saman.



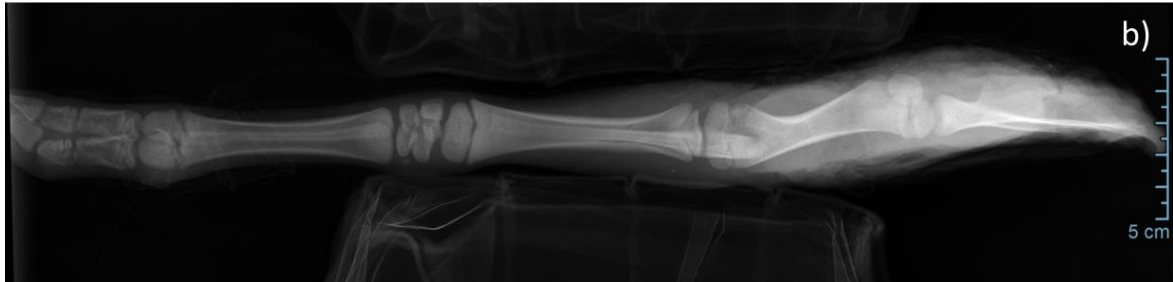
Mynd 4. Röntgenmynd af vinstri framfæti hrúts með bóggreppu. Ekki var unnt að rétta betur úr fótleggnum. Bógliður réttist mjög illa, olnbogaliður er u.þ.b. 90° krepptur og framhné réttist ekki að fullu. Enn fremur er snúningur um framhné sem veldur því að klaufir snúa botnunum saman.

Í nóvember 2022 voru krufin þrjú lömb til viðbótar, sem höfðu fæðst um vorið og verið sett í frysti.

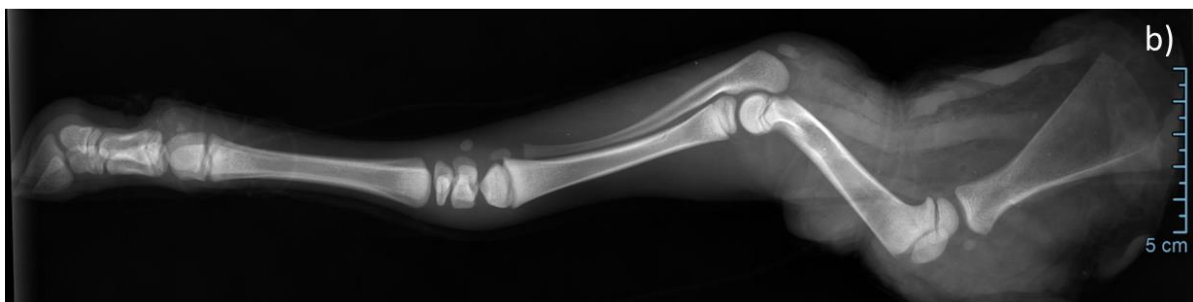
Lamb 3: Hvítur hrútur (3,65 kg) frá Skipholti í Hrunamannahrepp. Hann var með snúna, kreppta framfætur en afturfætur réttust eðlilega. Klaufbotnar framfóta snerust hvor að öðrum.

Lamb 4: Hvítur hrútur (4,27 kg) frá Hrafnkelsstöðum var með snúna, kreppta framfætur en afturfætur réttust eðlilega. Klaufbotnar framfóta snerust hvor að öðrum. Röntgenmyndir sýndu óskýrar vaxtarlínur, þykk og stuttaraleg bein og snúning um framhné (mynd 6a og mynd 7a).

Lamb 5: Hrútur (2,8 kg) frá Hafrafellstungu sem barst til krufningar af öðrum orsökum en bóggreppu. Framfætur voru eðlilega skapaðir og teknir sem samanburðarsýni. Röntgenmyndir sýndu skýrar vaxtarlínur og auðveldara reyndist að teygja að fullu úr liðum (mynd 6b). Framfótur þessa lambs reyndist lengri en fótur lambs 4 sem þó var 1,5 sinnum þyngra. Greinilegt var að ekki var snúningur um framhné (mynd 7b)



Mynd 6. Röntgenmyndir af framfótum tveggja lamba teknar ofan frá (Dorsopalmar, DP) af strekktum fótum. Lamb 4 (a) var 4,27 kg hrútur með bógkreppu. Á myndinni sjást þykk og stuttaraleg bein (bógleggur, sveif og öln) auk snúnings á framhné. Einnig eru vaxtarlínur í beinendum óskýrar. Lamb 5 (b) var 2,8 kg hrútur með eðlilega skapaða fætur. Herðablað, bógleggur, sveif og öln eru lengri og grennri en í lambi 4 auk þess sem vaxtarlínur eru skýrari.



Mynd 7. Röntgenmyndir af framfótum tveggja lamba teknar frá hlið (Mediolateral, ML) af strekktum fótum. Lamb 4 (a) var 4,27 kg hrútur með bógkreppu. Á myndinni sjást þykk og stuttaraleg bein (bógleggur, sveif og öln) auk snúnings á framhné, sem veldur því að sjónarhorn á legg og klaufir er því sem næst dorsopalmar (sjá 5b). Vaxtarlínur í beinendum eru skýrari en á DP sjónarhorni, en eru óskýrari í bóglegg, sveif og öln en á lambi 5. Lamb 5 (b) var 2,8 kg hrútur með eðlilega skapaða fætur. Herðablað, bógleggur, sveif og öln eru lengri og grennri en í lambi 4 auk þess sem vaxtarlínur eru skýrari.

Vefjaskoðun á lömbum 1 og 2 sýndi að beinvefur í öln og sveif virtist ekki óeðlilegur. Í bóglegg var brjósk í vaxtarlínunum (við liðkúlu og liðkefli) raskað á nokkrum stöðum. Brjóskfrumur sáust sums staðar ekki stafla sér, þar með var ekki vöxtur á þeim stað og á einu svæði virtist vera drep. Þéttbein virtist þykkara

öðrum megin í lengdarsneið en hinum megin, eins og sást einnig á röntgenmynd. Í bóglegg úr lambi 1 var vaxtarlína liðkúlu ekki jöfn, og í miðri vaxtarlínunni var hún svo þunn að hún virtist rofin. Þar sem vaxtarlínan var þykkari virtust brjósfrumur raða sér á óreiðukenndan hátt. Í vaxtarlínu liðkeflis var svipuð óregla, þar sem sást vefjauki af völdum frumufjölgunar í brjóskinu. Einhverjar af þessum breytingum gætu hafa orsakast af meðhöndlun sýnanna, til dæmis því að beinin hafi frosið, en einnig er mjög erfitt að skera beinvef án þess að nokkur bjögun verði á sýnunum. Einnig kom í ljós að nauðsynlegt væri að skoða til hliðsjónar bein úr nýfæddu lambi sem ekki bæri gallann.

Í vefjasneiðum úr lömbum 3 og 4 virtust vaxtarlínur í öln og sveif eðlilegar en í bóglegg voru vaxtarlínur sums staðar þynnri þar sem biðsvæði var mjög þunnt. Einnig voru brjósfrumusúlur styttri en í lambi 5, sem var ekki með bógkreppu. Vefjauppbygging sást ágætlega í þessum sýnum, en enn var þó spurning hvort það myndi bæta gæðin að rannsaka bein sem ekki höfðu frosið.

Arfgerðargreining

Vorið 2022 tókst að arfgerðargreina DNA sýni úr 75 íslenskum sauðkindum á HD og 65K flögum, af 79 sýnum sem send höfðu verið. Gripirnir tilheyrðu fjórum hópum:

- Bógkreppulömb (arfhreinir einstaklingar): 20 gripir
- Samanburðargripir (ekki af bógkreppuættum): 23 sæðingahrútar
- Arfblendnir gripir (foreldrar bógkreppulamba): 20 gripir
- 12 gripir, með óþekktu stöðu hvað varðar bógkreppuerfðir

Erfðagreiningar á AgR og Ovine Infinium HD SNP BeadChip gengu mjög vel og ljóst er að flögurnar virka vel til erfðagreiningar í íslenska sauðfjárstofninum. Þegar niðurstöður arfgerðargreininga lágu fyrir, buðu vísindamenn Ag-Research fram aðstoð sína við tengslaggreiningar og kortlagningu á genagallanum. Niðurstöður greininga á arfhreinum runum og kortlagning þeirra benda sterklega til þess að genið, sem veldur gallanum, sé staðsett á svokölluðu PAR svæði á X-litningi. PAR svæðið er óvenjulegt að því leyti að það hagar sér erfðafræðilega eins og hefðbundinn litningur og getur endurraðast við Y-litninginn. ROH greiningin afmarkaði svæði á X-litningi sem inniheldur fjögur skilgreind gen.

Eitt þeirra gena er afar áhugavert í þessu samhengi. SHOX, en tiltekinn víkjandi galli í þessu geni hjá mönnum veldur misþroska í beinum í handleggjum. Þar að auki er þekkt að stökkbreytingar í SHOX valdi ofvexti í tilteknum vöðvum. Hvort tveggja stemmir við bógkreppu.

Umræður

Fram kom í svörum samstarfsfólksins hjá Ag-Research skar eitt svæði á X-litningi sig úr í samanburði milli einstaklinga með og án bógkreppu, en það svæði inniheldur fjögur nafngreind gen. Eitt af þessum genum hefur verið rannsakað mun meira en hin, þ.e. SHOX (*short stature homeobox*) genið. SHOX á þátt í Leri-Weill heilkenni hjá mönnum sem orsakast af stökkbreytingu sem finnst á kynlitningum (ýmist X eða Y). Um er að ræða brjóskrangmyndun í fjærenda sveifarbeins, en þessi galli er aðeins á afmörkuðu svæði vaxtarlínunnar sem veldur því að lengdarvöxtur stöðvast á því svæði og heldur áfram annars staðar í beinendanum (Munns o.fl. 2001). Svipaður galli vegna stökkbreytingar í SHOX þekkt hjá Hjaltlandssmáhestum sem eru með óeðlilegan vöxt á öln og sveif (Rafati o.fl. 2016). Í vefjaskoðun á vaxtarlínunum einstaklinga með heilkennið sjást stuttar, ósamhliða súlur brjósfrumna á stækkunarsvæði, auk þess sem fjölgunarsvæði virðist þynnra en eðlilegt er og brjóskeyjar sjást í beinvefnum næst vaxtarlínunni (Munns o.fl. 2001). SHOX genið stýrir myndun prótína í beinmyndandi frumum en einnig í trefjakímfrumum og vöðvafrumum (Oliveira & Alves 2011). Einnig er samspil milli

SHOX og gensins FGFR3 sem tengist köngulóarlambaheilkenninu hjá sauðfé (Beever o.fl. 2006), og vísbendingar eru um að SHOX geti ýmist hamið eða hvatt tjáningu FGFR3 gensins, eftir aðstæðum (Oliveira & Alves 2011). Í heilbrigðum einstaklingum bælir SHOX tjáningu FGFR3 í framlimum (öln og sveif, *mesomelic*), en SHOX tjáning er mun minni í upplimum (bóglegg, *rhizomelic*). Þannig myndi skortur á SHOX auka hlutfallslega FGFR3 tjáningu í sveif og öln og flýta fyrir lokun vaxtarlína og stytta framliminn, en slík stytting á framlimum veldur dvergvexti í Turner heilkenni hjá konum. Áhrifin á upphandlegginn (bóglegginn) eru minna áberandi í slíkum tilfellum þar sem SHOX hefur minni áhrif á það bein. Í bógleggnum er tjáning FGFR3 hins vegar meira áberandi en í öln og sveif og þannig myndu vaxtarlínur lokast fyrr í bógleggnum þegar tjáning FGFR3 er aukin, og leiða til styttingar á þessu beini (Oliveira & Alves 2011). Hjá mönnum finnst SHOX skortur frekar hjá kvenkyni en karlkyni, en okkar efniviður er ekki til þess fallinn að greina leitni í annað kynið frekar en hitt, bæði vegna fárra sýna og vegna þess hvernig sýni eru valin til greininga.

Út frá þessu virðist mögulegt að SHOX genið leiki hlutverk í bógkreppu þó margt sé ólíkt með henni og beinmyndun í Turner heilkenni hjá mönnum. Það gæti hugsast að það eigi sér stað aukning á FGFR3 í þessum lömbum. Það eru þó heimildir fyrir því að stökkbreytingar í SHOX geninu geti valdið ólíkum svipgerðum og ekki er hægt að útiloka neitt að svo stöddu.

Hin genin sem einnig voru grunsamleg hjá bógkreppueinstaklingum eru ásamt SHOX innifalin í svokölluðu *critical interval* á X-litningi einstaklinga með Turner heilkenni. Þau eru minna rannsökuð en það hefur verið sýnt fram á að PPP2R3B er tjáð í brjóskmyndandi vefjum og vöðvatrefjum á fósturskeiði og stökkbreyting í því geni getur valdið hryggskekku í arfhreinum zebráfiskum (Seda o.fl. 2023).

Lokaorð og áframhaldandi rannsóknir

Mikilvægur áfangi náðist í þessu verkefni, þó ekki hafi tekist að þróa einfalt erfðapróf sem getur greint arfblanda einstaklinga og staðfest hvort vansköpuð lömb séu með bógkreppu. Á PAR svæði X-litnings var greind arfhrein runa sem passaði við erfðir bógkreppu, þ.e.a.s. bógkreppulömb bera tvö eintök og foreldrar báru eitt eintak. Framhaldsrannsókn er þegar í gangi til að kanna hvort þessi arfhreina runa, eða setröð (*haplotype*), nýtist til greiningar á gallanum. Enn fremur heldur þróun einfaldara erfðaprófs áfram. Erfðamörkin sem greina þessa setröð verða sett á næstu útgáfu AgR flögunnar (AgR Ovine 60Kplus). Þessi flaga er mikið nýtt til kynbóta, t.d. í Nýja-Sjálandi, þar sem erfðamengisúrval er nýtt til kynbótastarfs. Aðferðarfræðin nefnist setraðapróf (e. *haplotype test*) og er henni talsvert beitt í kynbótastarfi. Nærtækasta dæmið eru setraðagreiningar í PrP-príon geni í tengslum við næmni gagnvart riðu. Setraðapróf hafa verið nýtt til greininga á víkjandi erfðagöllum í sauðfé (Tetens o.fl. 2007). Setraðapróf eru þó að sumu leyti takmörkuð, þar sem þau byggja á tengslum erfðamarka við erfðagallann en ekki greiningu á sjálfri stökkbreytingunni sem veldur erfðagallanum. Þessi tengsl geta verið rofin með nýjum stökkbreytingum eða endurröðun milli litninga. Þessi próf eru ekki fullkomin, oft talað um að hægt sé að nota þau með 95% öryggi. Matís býr yfir tækjabúnaði og færni til framkvæma erfðagreiningar á genaflögum. Ef ekki tekst að finna stökkbreytinguna sem veldur bógkreppu og þróa einfalt erfðapróf til greininga á arfblandnum gripum á næstu misserum, er sá möguleiki fyrir hendi að Matís bjóði upp á setraðagreiningar og noti til þess uppfærða AgR flögu. Þrátt fyrir að slíkt próf sé ekki 100% öruggt væri það mikil framför í baráttunni gegn bógkreppu.

Heimildir

Agerholm JS, Menzi F, McEvoy FJ, Jagannathan V & Drögemüller C (2016). Lethal chondrodysplasia in a family of Holstein cattle is associated with a *de novo* splice site variant of COL2A1. *BMC Veterinary Research* 12:100. DOI: 10.1186/s12917-016-0739-z

Alkuraya F (2010) Autozygome decoded. *Genet Med* 12: 765–771. <https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e3181fbfcc4>

Beever JE, Smit MA, Meyers SN, Hadfield TS, Bottema C, Albretsen J & Cockett NE (2005). A single-base change in the tyrosine kinase II domain of ovine FGFR3 causes hereditary chondrodysplasia in sheep. *Animal Genetics* 37, 66–71

Brighton CT (1978). Structure and function of the growth plate. *Clinical Orthopedics and Related Research* 136, 22-32.

Dantas FPM, Medeiros GX, Figueirido APM, Thompson K & Riet-Correa F (2014). Skeletal dysplasia with craniofacial deformity and disproportionate dwarfism in hair sheep of Northeastern Brazil. *Journal of Comparative Pathology* 150, 245-252.

Dittmer KE, Morley ER & Smith RL (2016). Skeletal deformities associated with nutritional congenital rickets in newborn lambs, *New Zealand Veterinary Journal*, DOI: 10.1080/00480169.2016.1241165

McLaren PJ, Cave JG, Parker EM & Slocombe RF. (2007). Chondroplastic calves in Northeast Victoria. *Veterinary Pathology* 44, 342-354.

Mundlos S & Olsen BR (1997a). Heritable diseases of the skeleton. Part I: Molecular insights into skeletal development-transcription factors and signaling pathways. *The FASEB Journal* 11, 125-132.

Mundlos S & Olsen BR (1997b). Heritable diseases of the skeleton. Part II: Molecular insights into skeletal development-matrix components and their homeostasis. *The FASEB Journal* 11, 227-233.

Muscatello LV, Benazzi C, Kittmer KE, Thompson KG, Murgiano L, Drögemüller C, Avallone G, Gentile A, Edwards JF, Piffer C, Bolcato M & Brunetti B (2015). Ellis–van Creveld syndrome in Grey Alpine Cattle: Morphologic, immunophenotypic, and molecular characterization. *Veterinary Pathology* 52(2), 957-966. DOI: 10.1177/0300985815588610

Oliveira CS & Alves C (2011). The role of the SHOX gene in the pathophysiology of Turner syndrome. *Endocrinology and Nutrition* 58(8), 433-442. DOI:10.1016/j.endonu.2011.06.005

Rafati N, Andersson LS, Mikko S, Feng C, Raudsepp T, Pettersson J, Janecka J, Wattle O, Ameer A, Thyreen G, Eberth J, Huddleston J, Malig M, Bailey E, Eichler EE, Dalin G, Chowdary B, Andersson L, Lindgren G & Rubin C-J (2016). Large deletions at the SHOX locus in the pseudoautosomal region are associated with skeletal atavism in Shetland ponies. *Genes, Genomes, Genetics* 6(7), 2213-2223. DOI: 10.1534/g3.116.029645

Seda M, Crespo B, Corcelli M, Osborn DP & Jenkins D (2023). A CRISPR/Cas9-generated mutation in the zebrafish orthologue of PPP2R3B causes idiopathic scoliosis. *Scientific Reports* 13(1). DOI: 10.1038/s41598-023-33589-y

Sæmundur Sveinsson, Eypór Einarsson, Davíð Gíslason (2021) Matís skýrsla. <https://doi.org/10.5281/zenodo.5212916>.

Tetens J, Ganter M, Müller G, Drögemüller C (2007) Linkage mapping of ovine microphthalmia to chromosome 23, the sheep orthologue of human chromosome 18. *Investigative ophthalmology & visual science* 48, 3506-3015.

Thompson KG, Piripi SA & Dittmer KE (2008). Inherited abnormalities of skeletal development in sheep. *The Veterinary Journal* 177, 324-333.