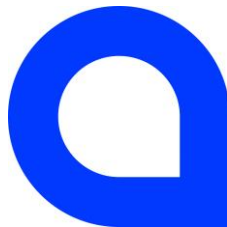


Þróun erfðaprófs til greininga
á arfberum bógkreppu
Annar áfangi 2022-2023

2024



Lokaskýrsla til fagráðs 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

Þróun erfðaprófs til greininga á arfberum fyrir bógreppu - lokaskýrsla	2
Ágrip	2
Inngangur	2
Aðferðir	3
Sýnasöfnun og um gögnin	3
Arfgerðargreining	3
Niðurstöður	4
Meinafræðigreining	4
Arfgerðargreining	4
Umræður og ályktanir	5
Heimildir	6

Þróun erfðaprófs til greininga á arfberum fyrir bógkreppu- lokaskýrsla

Skýrsla þessi nær yfir annan áfanga 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 erfiðlega hefur gengið að losna við úr hjörðum hér á landi. Fengist hafa styrkir úr þróunarfé sauðfjarræktar til rannsókna og þróunar á erfðaprófi fyrir gallanum. Í fyrsta áfanga verkefnisins tókst ekki að þróa einfalt erfðapróf til að greina arblendna einstaklinga. Hins vegar leiddi sú rannsókn í ljós arfhreina setröð á svokölluð PAR svæði á X-litningi sem virðist fylgja svipgerð og væntanlegri arfgerð. Þannig voru bógkreppulömb 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. Í áfanga II sem er sagt frá í þessari skýrslu var lögð áhersla á að nýta setröðina til að finna arblendna einstaklinga með erfðagreiningum. Þróunarfé sauðfjarræktar er þakkaður styrkur við þessar rannsóknir.

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. Í fyrsta áfanga náðist sá árangur að borin voru kennsl á arfhreina setröð á PAR svæði X-litnings sem virtist fylgja svipgerð bógkreppunnar. Mikilvægt er að rannsaka þau fjögur gen sem finnast innan þessarar setraðar. Í öðrum áfanga var áfram unnið að því að þróa einfalt greiningarpróf með því að nýta þekkinguna á þessari setröð. Meginmarkmiðið var þróa setraðapróf (e. haplotype test) til að bera kennsl á erfðagallann í sæðingahrútum sem og öðrum gripum. Til þess að auka við, og bæta nákvæmni efniviðsins í rannsókninni voru tvö undirmarkmið:

1. Að kortleggja gen sem líkleg eru til þess að valda gallanum í einstaklingum sem eru heilbrigðir arfberar og einstaklingum sem fæðast með gallann. Stefnt var að heilraðgreiningu á bógkreppulömbum og foreldrum þeirra til að reyna að finna og skilgreina genið sem gallinn er staðsettur í.
2. Að lýsa meinafræði bógkreppu hjá lömbum sem hafa ættartengsl við þekktar arfbera og bera saman við þekktar galla af svipuðum toga í erlendum sauðfjarkynjum

Bæði undirmarkmiðin kröfðust þess að nákvæmari (út frá skyldleika) og betri (hræ lamba sem ekki höfðu verið fryst) efniviður myndi safnast. Raðgreiningargögn og betri lýsingar á vefjameinafræði auka líkurnar á því að skilgreina stökkbreytinguna sem veldur bógkreppu nógu nákvæmlega til að geta þróað einfalt erfðapróf til skimunar. Hræ lamba undan Viðari, sem fæddust vorið 2022 á tveimur búum á Suðurlandi, voru röntgenmynduð og krufin (sjá niðurstöður í lokaskýrslu fyrsta áfanga verkefnisins, Charlotta Oddsdóttir o.fl. 2023). Þó svo að sú greining hafi verið hluti af öðrum áfanga verkefnisins, hafa niðurstöður hennar þegar verið birtar í lokaskýrslu fyrsta áfanga verkefnisins, þar sem tímarammi áfanganna skaraðist.

Aðferðir

Sýnasöfnun og um gögnin

Sýnum úr bógreppulömbum (sjá aðferð í Charlotta Oddsdóttir o.fl. 2023) hefur verið safnað til erfðagreiningar frá vorinu 2018 og enn bættist í gagnasafnið vorið 2022 í kjölfar tilkynninga um að hrúturinn Viðar 17-844 gæfi erfðagallann. Í sýnasafninu sem sent var til Nýja-Sjálands í fyrsta áfanga verkefnisins eru sýni úr 23 bógreppulömbum frá 8 búum. 18 af þessum sýnum tengjast en 5 þeirra eru ekki með þekkt ættartengingu við önnur tilfelli, en bógreppa þekkt á viðkomandi búi. Í gagnasafninu er það tilgreint hvaða fjölskyldu lömbin tilheyra en stærsti hópurinn (þessi 18 sýni) rekur ættir til ærinnar Seinlátrar 72-500 frá Berghyl sem var móðir þeirra Hyls 75-947 og Stakks 79-975.

Í fyrsta áfanga fengust niðurstöður úr sýnum 80 gripa sem voru sýni úr bógreppulömbum, foreldrum þeirra og sýni úr sæðingastöðvahrútum sem nýtt voru sem viðmiðunarsýni. Þessi sýni voru nýtt til að hanna fyrsta prófið. Síðan þá (fram til 1. des 2024) hafa verið greind til viðbótar 269 sýni sem gefið hafa niðurstöður. Því er heildarfjöldi sýna sem hafa verið greind m.t.t. bógreppu 349. Myndarlegur styrkur fékkst frá Matvælasjóði sumarið 2023 til bógreppu rannsókna, sem útskýrir þennan mikla fjölda sýna sem greind voru í verkefninu.

Þessum sýnum má skipta í eftirfarandi flokka:

Tafla 1. Skipting sýna í sýnasafni eftir því hvernig gripir flokkast samkvæmt væntingum um niðurstöðu greiningar.

Staða sýnis	Fjöldi sýna
Líklega arfhreinir gripir. Sýni úr lömbum með misgreinileg einkenni bógreppu	55
Gripir sem geta verið arfblandnir fyrir bógreppu. Hafa gefið vansköpuð lömb eða eru skyldir gripum sem talið er að beri bógreppu	176
Gripir sem ólíklegt er að beri gen fyrir bógreppu	118
Alls	349

Af þeim gripum sem hér eru flokkaðir sem hugsanlega arfblandnir eru 109 sem ekki hafa gefið vansköpuð lömb en náskyldur ættingi hefur reynst gefa bógreppu. Af þessum 109 eru 92 gripir afkomendur sæðingahrútsins Viðars 17-844. Af þeim 118 sýnum sem eru úr gripum sem ólíklegt er að beri bógreppu eru 86 sýni úr sæðingahrútum.

Arfgerðargreining

Líkt og í fyrri áfanga verkefnisins, voru sýnin greind með tvöskonar genaflögum hjá Ag-Resarch í Nýja-Sjálandi: 1) AgR Ovine 60Kplus (AgR flaga) og Ovine Infinium HD SNP BeadChip (HD flaga). AgR flagan inniheldur um 60.000 erfðamörk en HD flagan er umtalsvert stærri og greinir um 600.000 erfðamörk. Erfðamörkin sem greind voru á þessum tveimur genaflögum voru notuð til að kanna hversu vel setröðin, sem skilgreind var í fyrri áfanga verkefnisins (Charlotta Oddsdóttir o.fl. 2023), rímar við svipgerð og væntanlega arfgerð erfðapáttar bógreppu (sjá Töflu 2). Ef setröðin fylgir væntanlegum erfðum erfðavísisins sem veldur bógreppu, er hægt að nýta hana til að finna arfblandna gripi. Slíkt próf nefnist setraðapróf (haplotype test). Slíkt próf byggja á því að spá fyrir um

tiltekna eiginleika út frá greiningu fjölda erfðamarka, í þessu tilfelli greininga á genaflögu (SNP-Chip). Reiknuð er út tiltekin samsetning samsæta sem getur, með 90-95% nákvæmni, spáð fyrir um ákveðna svip- eða arfgerð. Starfsmenn AG-Resarch ætla því að nýta þau erfðafræðilegu gögn sem þegar hafa verið framleidd til að hanna setraðapróf fyrir bógkreppu. Slíkt próf yrði ágætis viðbót í verkfærakistu sauðfjárræktenda og ráðunauta hér á landi.

Niðurstöður

Meinafræðigreining

Eins og kemur fram hér að ofan hefur meinafræðileg greining þegar verið birt á efniviðnum sem var unninn fyrir þennan styrk (Charlotta Oddsdóttir o.fl. 2023). Vefjaskoðun benti til þess að breytingar væru greinilegrí í bólegg en í neðri beinum framfóta. Fólust breytingarnar í skipan brjósksfrumna í vaxtarlínunum, þykkt og skýrleika vaxtarlína og mögulega í utanfrumuefninu líka. Ekki er þó hægt að útloka að breytingar séu til staðar í öln og sveif, enda er stórsætt útlit þeirra óeðlilegt í samanburði við heilbrigð lömb.

Kom berlega í ljós að safna þyrfti og vinna hræ sem ekki hefðu frosið, bæði af bógkreppulömbum og heilbrigðum lömbum. Slíkur efniviður safnaðist vorið 2024 og verður greining á þeim efniviði unnin sem hluti af verkefni sem styrkt var af Matvælasjóði sumarið 2023.

Arfgerðargreining

Arfgerðagreiningar liggja fyrir úr alls 349 einstaklingum. Í töflu 2 er yfirlit yfir allt sýnasafnið út frá því hvernig niðurstöður greininga passa við væntingar. Með væntingum er átt við hvernig svipgerð einstaklinga og ætterni passar við niðurstöður úr greiningum á setróðinni sem talin er innihalda erfðagalla sem veldur bógkreppu.

Tafla 2. Yfirlit yfir samræmi milli væntinga um niðurstöður og niðurstöðu úr bógkreppugreiningu.

Niðurstöður – samræmi við væntingar	Fjöldi sýna	Hlutfall sýna
Niðurstaða samkvæmt væntingum	196	56%
Niðurstaða getur staðist	133	38%
Niðurstaða kemur á óvart	19	5%
Niðurstaða getur tæplega staðist	1	0,3%
Alls	349	100%

Niðurstaða samkvæmt væntingum eru þá sýni úr lömbum sem talið er nokkuð öruggt að séu með bógkreppu og þau reynast arfhrein. Einnig sýni úr gripum sem gefið hafa bógkreppu og reynast arfblendnir eins og talið var. Þá eru hér einnig sýni úr gripum sem ekki hafa tengingu við þekktu bógkreppugjafa og er því talið líklegt að þeir beri ekki erfðagallann. Hér eru m.a. reyndir sæðingahrútar.

Í flokknum „niðurstaða getur staðist“ eru lömb sem sýndu vansköpun sem þó er ekki hægt að fullyrða að sé bógkreppa og í flestum tilfellum voru þau ekki með ættartengingu við þekkta bógkreppugjafa. Flokknum tilheyra einnig foreldrar slíkra lamba. Hér eru einnig gripir sem hafa ættartengsl við bógkreppugjafa eins og Viðarsafkomendur sem ekki kemur á óvart að séu ýmist arfblendnir eða að þeir eigi að vera lausir við erfðavísa fyrir bógkreppu.

Í flokknum „niðurstaða kemur á óvart“ eru 6 sæðingahrútar sem ekki er vitað um að hafi gefið bógkreppu sem reynast arfblendnir fyrir bógkreppu samkvæmt prófinu. Þá eru hér niðurstöður sem eru á skjön við það sem ætlað var s.s. að fullorðinn gripur sem hefur þá væntanlega verið með mjög lítil eða engin sjáanleg einkenni geti verið arfhreinn fyrir bógkreppu eða að lömb sem eru vansköpuð geti verið arfblendin eða greinst neikvæð fyrir bógkreppu þrátt fyrir að foreldri sé arfblendið.

Í flokknum „niðurstaða getur tæplega staðist“ er einn gripur. Það er hrútur sem greinist ekki með erfðavísa fyrir bógkreppu en á fleiri en eitt afkvæmi sem reyndust með bógkreppu, auk annarra afkvæma sem reynast arfblendin. Það stenst því ekki að hrúturinn sé án bógkreppuerfðavísa.

Umræður og ályktanir

Í um 95% tilfella er niðurstaða úr bógkreppuprófinu í takt við það sem við má búast. Þau 19 tilfelli sem koma á óvart geta skýrst af nokkrum mismunandi þáttum. Í einhverjum tilfellum gæti það verið vegna villu í skráningum, sem ekki er hægt að útiloka en víða í ferlinu er mögulegt að verði ruglingur á sýnum eða upplýsingum þeim tengdum. Þá er ekki hægt að útiloka að fleiri en eitt gen stjórní þessum erfðagalla og hér sé hugsanlega bara verið að vinna með eitt þeirra. Það gæti leitt til þess að gripur greinist arfhreinn þó hann sé talin heilbrigður og hafi verið settur á eða að hann hafi gefið bógkreppu, sé því í raun arfblendinn en greinist hér án bógkreppuerfðavísa. Þá má líka velta fyrir sér hvort einkennin geti verið svo misgreinileg að þó hér væri aðeins einn erfðavísir að verki, séu til gripir sem eru arfhreindir en sýni svo væg einkenni að þeir veljist til ásetnings.

Í heildina eru niðurstöður þó í samræmi við væntingar þar sem aðeins 5% sýna koma á óvart eða virðast ekki geta staðist. Það er ljóst að prófið er ekki 100% öruggt en ef ætla má að öryggið sé á bilinu 95% til 100% þá er mikill akkur í því að geta nýtt þetta próf til að draga verulega úr líkum á því að bógkreppu sé dreift með kynbótum. Setraðapróf eru talsvert nýtt í kynbótum í búfjárrækt og er öryggi þeirrar setraðar sem skilgreind hefur verið í þessu verkefni á pari við önnur setraðapróf (Ben Braiek o.fl. 2021; Al-Khudhair o.fl. 2024). Erfðapróf sem greina sjálfan orsakavaldinn af erfðagalla eru augljóslega ákjósanlegri. Oft á tíðum er vinnan við að finna sökudólginn gríðarlega tímafrem og því praktískt að nota setraðapróf í millitíðinni. Arfgerðagreiningar eru enn fremur ekki nægjanlegar einar og sér til að finna erfðabátt sem veldur erfðagalla. Í þessu tilfelli bendir allt til þess að erfðavísi eða erfðavísa sem valda bógkreppu sé að finna á PAR svæði á kynlitningum (X og Y). Nákvæm staðsetning innan PAR svæðisins er hinsvegar óljós. Eina leiðin til að þrengja leitarsvæðið er að halda áfram greiningum á bógkreppulömbum og foreldrum þeirra. Endurröðun litninga við rýriskiptingu, sem gerist við myndun kynfruma, brýtur upp setraðir í erfðamenginu. Því er ekki útilokað að þróa megi nákvæmara erfðapróf í framtíðinni, ef rannsóknum verður haldið áfram.

Heimildir

Al-Khudhair A, VanRaden PM, Null DJ, Neupane M, McClure MC, Dechow CD (2024). New mutation within a common haplotype is associated with calf muscle weakness in Holsteins. *Journal of Dairy Science*. 107:3768-79.

Ben Braiek M, Fabre S, Hozé C, Astruc JM, Moreno-Romieux C (2021). Identification of homozygous haplotypes carrying putative recessive lethal mutations that compromise fertility traits in French Lacaune dairy sheep. *Genetics Selection Evolution*. 53:41.

Charlotta Oddsdóttir, Eyþór Einarsson og Sæmundur Sveinsson (2023). Leitin að erfðabáttum bógreppu: Fyrsti áfangi 2021-2022. Lokaskýrsla til fagráðs í sauðfjárrækt. Útgefandi: Tilraunastöð Háskóla Íslands í meinafræði að Keldum. <https://keldur.is/sites/keldur.is/files/2024-12/Lokask%C3%BDrsla%20B%C3%B3greppa%20%C3%A1fangi%20I.pdf>