



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

**Fakulteten för veterinärmedicin
och husdjursvetenskap**
Institutionen för husdjursgenetik

Pilotstudie av kandidatgener för inguinalbråck hos häst

Elin Tillnert

*Uppsala
2018*

Examensarbete 30 hp inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2018:61*

Pilotstudie av kandidatgener för inguinalbråck hos häst

Pilotstudy of candidate genes for inguinal hernia in horses

Elin Tillnert

Handledare: Sofia Mikko, institutionen för husdjursgenetik

Examinator: Göran Andersson, institutionen för husdjursgenetik

Examensarbete i veterinärmedicin

Omfattning: 30 hp

Nivå och fördjupning: Avancerad nivå, A2E

Kurskod: EX0752

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2018

Delnummer i serie: Examensarbete 2018:61

ISSN: 1652-8697

Elektronisk publicering: <http://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: Inguinalbråck, pungbråck, NPTX1, ZFPM2, COL23A1, HOXA10

Key words: Inguinal hernia, scrotal hernia, NPTX1, ZFPM2, COL23A1, HOXA10

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för husdjursgenetik

SAMMANFATTNING

Inguinalbråck hos häst är en sjukdom som ses hos både föl och vuxna hästar. Sjukdomen ses främst hos hingstar. Symptomen framträder vanligen som akut kolik pga att tarmslingor glider ner i inguinalkanalen (den öppning som sammanbinder bukhålan med scrotum) och snörs åt. Sjukdomen kräver i vuxen ålder kirurgiska åtgärder. Hur vanlig sjukdomen är hos hästar är svårt att uppskatta då de flesta hingstar kastreras i tidig ålder. Det finns dock belägg för att sjukdomen förekommer i högre frekvens inom vissa raser, såsom arabiskt fullblod, tennessee walking horse, american saddlebred och varmblodstravare (Blikslager, 2010).

Huruvida inguinalbråck är ärftligt hos häst är ej känt. Forskning på andra djurslag, såsom gris och mus, har visat på en signifikant koppling mellan specifika gener och sjukdomen. Syftet med detta examensarbete är att via en kandidatgenstudie analysera om risken för att utveckla inguinalbråck hos häst är associerad till genvarianter i fyra olika kandidatgener. I denna studie har vi fokuserat på svenska varmblodshingstar då en tendens till ökade problem hos denna ras har rapporterats under den senaste tiden.

I studien ingick 207 hästar varav 9 drabbade individer. Genetiska markörer lokaliserades och analyserades inom fyra kandidatgener, *COL23A1*, *HOXA10*, *NPTX1* och *ZFPM2*. Dessa kandidatgener valdes ut då de i kandidatgenstudier på gris visat en signifikant koppling till inguinalbråck. En signifikant genetisk association detekterades i denna studie hos *HOXA10*.

SUMMARY

Inguinal hernia is a disease seen in both foals and adult horses. The disease is most commonly seen in stallions. The symptoms are often acute colic when loops of intestines slip down into the inguinal canal and become strangulated. The treatment of the disease for adult horses is in general surgical. How common the disease is in horses is hard to estimate because the stallions are often castrated at early age. However, there are evidence that the disease occurs at higher rates in certain breeds such as Arabian Horse, Tennessee Walking Horse, American Saddlebred and Standardbred (Blikslager, 2010).

Whether inguinal hernia is genetically inherited in horses is not known. Research in other animal species, such as pig and mice, has shown significant association between specific genes and the disease. The purpose of this study is to investigate genetic association of inguinal hernia with candidate genes in horses. In this study we have focused on the Swedish Warmblood breed because lately a tendency for increased frequency in this breed has been observed.

The study included 207 horses, of where 9 were affected by inguinal hernia. The samples were genotyped for markers in four candidate genes, *COL23A1*, *HOXA10*, *NPTX1* and *ZFPM2*. A significant genetic association was detected in this study to the *HOXA10* gene.

INNEHÅLL

INLEDNING	s. 1
LITTERATURSTUDIE	s. 2
Utvalda kandidatgener för denna studie	s. 3
Single nucleotide polymorphisms, SNPs	s. 3
Mikrosatelliter	s. 3
Mikrosatelliter vs SNPs	s. 4
MATERIAL OCH METODER	s. 4
Population	s. 4
Val av kandidatgener	s. 4
Preparering av DNA	s. 5
PCR amplifikation	s. 5
Sekvensering	s. 5
Statistisk analys	s. 6
RESULTAT	s. 6
Markörer	s. 6
SNPs	s. 7
Mikrosatteliter	s. 8
DISKUSSION	s. 9
KONKLUSION	s. 11
REFERENSER	s. 12
BILAGA 1	s. 15

INLEDNING

Inguinalbråck definieras av att delar av något bukorgan, vanligen jejunum eller ileum, förflyttar sig från bukhålan ner i inguinalkanalen. I de fall då dessa delar passerar den externa inguinalringen och ner i scrotum benämns de som pungbråck (Stashak, 1993). I följande artikel används termen inguinalbråck för att beskriva båda dessa tillstånd.

Inguinalbråck kan ses hos båda könen men uppkommer främst hos unghästar och vuxna hingstar. Sjukdomen ger vanligtvis koliksymptom av varierande grad och behandlas hos vuxna individer i de allra flesta fall genom kirurgi (Stashak, 1993). Den kirurgiska behandlingen av sjukdomen har god prognos och behandlade hingstar kan fortsätta användas i avel (Blikslager, 2010). Det har dock setts en ökad frekvens av inguinalbråck hos vissa raser, ex Tennessee Walking horse och varmblodstravare då dessa raser enligt studier har en vidare inguinalkanal (Blikslager, 2010).

En tendens att inguinalbråck är ett ökande problem hos svenska varmblod, (SWB) har rapporterats. Det har på häst även diskuterats huruvida sjukdomen är ärftlig eller traumatiskt orsakad. Dock har det setts en ökad sjukdomsfrekvens hos vissa hästraser, samt att det finns belägg för ärftlighet hos andra djurslag. Hos ex gris finns det en tydlig ärftlighet av sjukdomen. Detta gör att misstankarna om en ärftlig inverkan hos häst stärks. Enligt djurskyddslagen (SJVFS 2009:28) är det inte tillåtet att avla på individer som har en defekt med stor sannolikhet för nedärvning. Så länge det inte finns något vetenskapligt belägg för ärftlighet är det svårt att stoppa avel med individer drabbade av inguinalbråck. Värdefulla avelshingstar ges i nuläget ofta dispens för fortsatt användning trots att de drabbats av sjukdomen.

Syftet med denna studie är att utvärdera om det föreligger en genetisk bakgrund till inguinalbråck hos häst. Detta genom att undersöka associationen mellan kandidatgener och inguinalbråck.

LITTERATURSTUDIE

När testiklarna vandrar ner från bukhålan genom bukväggen ner till scrotum (pungen) formas en permanent kanal som sammanbinder bukhålan och scrotum, denna benämns inguinalkanalen. Kanalen krymper i vidd efter testiklarnas nedvandring men är fortsatt en svag punkt i bukväggen. Om bukorgan, vanligen tarmslingor passerar ner i kanalen bildas ett inguinalbråck, i de fall då bukorgan vandrar ner så pass långt att blodtillförseln stryps av uppkommer betydande skador i drabbad tarmdel (Sjaastad *et al.*, 2003).

Det är svårt att undersöka prevalensen av inguinalbråck hos häst då sjukdomen främst förekommer hos hingstar och de vanligen kastreras i tidig ålder. I en artikel av Sembrat (1975) påvisades att vissa hästraser så som t ex varmbloodstravare har högre risk att drabbas av inguinalbråck. Högre förekomst av inguinalbråck har även observerats hos vissa nötkreatur och hundraser (Hayes, 1974). Skillnader i prevalens mellan olika raser indikerar att det finns en ärftlig komponent bakom utvecklandet av sjukdomen. Det finns dock inga studier gjorda som påvisar en sådan ärftlighet hos häst.

Det har däremot fastställts att risken att utveckla inguinalbråck är ärftligt hos gris (Vogt & Eilersieck, 1990), människa (Jones *et al.*, 1998) och mus (Lewis *et al.*, 2012).

Grindflek *et al.* (2006) utförde helgenomscanning på grisar och fann flertalet QTL (Quantitative Trait Loci) med stark signifikant koppling till inguinalbråck. Inom dessa QTL låg bland annat kandidatgenerna Insulin-Like 3 (*INSL3*), Mullerian inhibiting substance (*MIS*) och Calcitonin gene related peptide (*CGRP*). I en studie av Zimmermann (1999) visades att *INSL3* har en betydande roll i utvecklingen av det ligament (gubernaculum) som förflyttar testiklarna från bukhålan ner till scrotum hos handjur. Däremot vid utveckling av det honliga könet sker inget uttryck av *INSL3*. I studien av Zimmermann (1999) slog man ut *INSL3* hos hanmöss varav samtliga individer utvecklade bilateral kryptorkism (en åkomma då testikeln under sin utveckling inte fullföljer sin vandring ner till scrotum utan blir kvar antingen i bukhålan eller i inguinalkanalen). I en studie (Koskimies *et al.*, 2002) visades att möss av honkön som exponerades av *INSL3* under fosterstadiet utvecklade ett gubernaculum likt det hanliga könet, samt att äggstockarna vandrade ner och placerade sig ventralt i bukhålan. Studien visade att dessa honor utvecklade bråck i vuxen ålder samt att de bildade ett tunnare bukmuskellager, framförallt i inguinalområdet.

Du *et al.* (2009) har utfört en kandidatgenstudie för inguinalbråck hos gris. Blodprover insamlades från 1467 grisar och genomiskt DNA preparerades och genotypades med SNPs. I studien sågs en signifikant koppling mellan inguinalbråck och följande kandidatgener, *ELF5*, *KIF18A*, *COL23A1* och *NPTX1*.

I en studie av Zhao *et al.* (2009) undersöktes 14 kandidatgener och deras inverkan i utvecklingen av pungbråck hos gris. 1534 grisar ingick i studien och slutsatsen var att kandidatgenerna *HOXA10*, *ZFPM2* och *MMP2* hade en signifikant koppling till utvecklingen av inguinalbråck hos gris.

Utvalda kandidatgener för denna studie

HOXA10, Homeobox A10 är en proteinkodande gen som kodar för transkriptionsfaktorer som deltar i regleringen av den embryonala utvecklingen. *HOXA10* har en bevisad koppling till utvecklingen av kryptorkism hos möss (Rijli *et al.*, 1995).

COL23A1, Collagen, type XXIII, alpha 1 är en proteinkodande gen som är involverad i kollagenmetabolismen och bildar icke-fibrillära kollagener (Banyard *et al.*, 2003). Genen uttrycks främst i huden (Koch *et al.*, 2006) och proteinet är involverad i bildningen av extracellulärt matrix (Banyard *et al.*, 2003). Rubbingar i bildningen av extracellulärt matrix och kollagen har setts kopplat till inguinalbräck (Henriksen *et al.*, 2016).

NPTX1, Neuronal Pentraxin-1 är en proteinkodande gen som endast uttrycks i nervsystemet (Goodman *et al.*, 1996). *NPTX1* har en betydande roll under läkningsprocessen efter nervskador (Scarlatto *et al.*, 2002). Genen har bevisats ha en koppling till Alzheimers sjukdom och det föreslås att *NPTX1* kan användas för att upptäcka nedsatt funktion i synapserna under ett tidigt stadiet av sjukdomen (Ma *et al.*, 2018). I en studie på råttor (Yasuhara *et al.*, 2008) har det även visats att uttrycket av *NPTX1* påverkas av individens östrogennivåer.

ZFPM2, Zinc Finger Protein, FOG family member 2 är en proteinkodande gen. Detta zinc finger protein är en transkriptions-faktor som deltar i regleringen av GATA-proteinernas aktivitet. GATA-proteinerna har en betydande roll i reglering av hematopoesen och cardiogenesen hos däggdjur (Holmes *et al.*, 1999). *ZFPM2* deltar även i regleringen av gonadernas utveckling (Bashamboo *et al.*, 2014). En koppling har setts mellan denna gen och diafragmabräck hos människa (Brady *et al.*, 2014). I en studie (Bashamboo *et al.*, 2014) sågs en koppling mellan mutationer i *ZFPM2* och utvecklingen av testiklarna hos människa samt en koppling till sjukdomen 46XY DSD (Disorders of Sex Development).

Single nucleotide polymorphisms, SNPs

DNA sekvensen hos individer inom samma art har en väsentlig variation dock är denna variation begränsad inom specifika raser så som SWB. Hos människa skiljer vi oss endast i 0,1 procent av sekvensen, varav variationerna till stor del består av skillnader i enstaka nukleotider i en specifik position. Till exempel kan en individ ha basparet A medan en annan har G på samma position i sin genetiska sekvens, i de flesta fall är båda varianterna relativt vanliga inom arten. Det är dessa skillnader mellan individer som kallas single nucleotide polymorphism, förkortat SNPs. Betydelsen av dessa variationer kan vara allt ifrån tysta SNPs, som inte har någon påverkan på fenotypen, till SNPs som kan orsaka eller predisponera sjukdom (Griffiths *et al.*, 2008).

Mikrosatelliter

I genomet finns områden där korta, enkla DNA sekvenser upprepar sig flertalet gånger, det som här skiljer sig mellan olika individer är antalet gånger sekvensen upprepas. Dessa upprepningar kallas VNTRs (variable number tandem repeats). Mikrosatellit markörer bygger på upprepningar av mycket korta sekvenser mellan en till sex nukleotider, vanligast är dinukleotider (ex. 5'-C-A-C-A-3' osv) (Griffiths *et al.*, 2008).

Mikrosatelliter vs SNPs

Mikrosatelliters polymorfism kan uppstå på flertalet sätt, ex genom *replication slippage*, *unequal crossing over*, mutationer som förlänger eller avbryter upprepningen, medan SNPs endast uppstår av punktmutationer. Detta gör att variationer inom mikrosatelliter uppstår mer frekvent än hos SNPs (Gilson *et al.*, 2007).

Fördelar med mikrosatelliter är att de har en stor genetisk variation, de har flertalet alleler vilket ger mycket information per mikrosatellit (Gilson *et al.*, 2007). De är även enkla och relativt billiga att analysera (Ball *et al.*, 2010).

SNPs är bialleliska och ger nästintill alltid endast 2 alleler i resultaten. De har mao inte lika stor genetisk variation och resultaten ger färre alleler än mikrosatelliterna. Det går dock snabbare att hantera resultaten då plattformar för SNPs genotypning är nästintill helt automatiserade. För mikrosatelliter är hanteringen endast delvis automatiserad vilket gör att det kräver mer arbetskraft och därmed tar längre tid. Det innebär även en större risk för mänskliga fel vid analys av resultaten (Slate *et al.*, 2008).

Att en SNPs ger ut mindre information än en mikrosatellit kan kompenseras genom att genotypa ett större antal SNPs (Daniel *et al.*, 2004) ex med hjälp av SNP-chip (Lam *et al.*, 2010). Ett SNP-chip är en liten platta av glas eller silikon varpå utvalda DNA sekvenser fästs, på detta vis kan tusentals SNPs genotypas på samma gång (Lam *et al.*, 2010).

MATERIAL OCH METODER

Population

I studien användes hår och blodprover från 207 hästar (samtliga var SWB) tillgängliga hos Husdjursgenetiska laboratoriet vid institutionen för husdjursgenetik (HGEN), SLU i Uppsala. Användningen av prover har gjorts i samråd med SWB-föreningen. Bland tillgängliga prover fanns 9 drabbade hingstar.

För att kunna se en eventuell nedärvning och utföra en familjebaserad genetisk analys valdes kontroller ut i egenskap av avkommor till de sjuka hingstarna eller om detta ej var möjligt efter den sjuka individens far. I första hand valdes hingstar, i andra hand ston samt valacker. Ett fåtal kontroller valdes ut i egenskap av avkommor till ett specifikt sto, detta sto har inkluderats i studien eftersom hon har två hingst-avkommor som utvecklat inguinalbräck. Som kontroller kördes totalt 197 individer.

Val av kandidatgener

För att finna högtintressanta kandidatgener för pungbräck hos häst gjordes en litteratursökning av funna associerade gener till sjukdomen på andra djurslag. Genom vetenskapliga studier (Du *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2009) som analyserat kandidatgener hos främst gris valdes de kandidatgener med högst signifikant koppling till inguinalbräck ut. Bioinformatisk analys utfördes med hjälp av Ensembl Genome Browser, därigenom lokaliserades motsvarigheten till

de utvalda kandidatgenerna i hästens genom. Redan kända markörer, SNPs och mikrosatelliter, för de utvalda kandidatgenerna hos häst söktes fram i Ensembl Genome Browser. Främst valdes de kandidatgener där kända mikrosatelliter fanns. I andra hand valdes de kandidatgener som innehöll flera SNPs. Hos kandidatgener utvalda för att analyseras via SNPs valdes de områden där SNPs låg tätast i kromosomposition ut för sekvensering.

Preparering av DNA

DNA från hårprover preparerades fram genom att hårrötter klipptes ner i 100µl Chelex 100 Resin (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) och 7µl proteinas K (Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland). Denna blandning inkuberades sedan i 56°C i 60 min och efter det i 95°C i 10 min för inaktivering av proteinas K. DNA isolerades från blodprover genom en DNA preparations robot, QIA symphony (Qiagen, Hilden, Tyskland) enligt standardprotokoll för DNA extraktion från blodprov.

PCR-amplifikation

Primerdesign för *forward* och *reverse* primers utfördes för varje sekvens, och forward-primern fick en M13-tail. Mikrosatelliterna amplifierades och reaktionsprodukterna separerades via agarosgelelektrofores. PCR analysen utfördes i separata brunnar, vardera om totalt 10µl. Fördelning av olika substanser i brunnarna redovisas i Tabell 1.

Tabell 1: Innehåll i mix för PCR-amplifikation av mikrosatelliter

	ZFPM2ms2 µl/prov	NPTX1ms1 µl/prov	ZFPM1ms1 µl/prov	NPTX1ms2
10X PCR buffer	1	1	1	1
MgCl ₂ 25mM	2	2,25	2	2
dNTPs (25mM)	0,1	0,1	0,1	0,1
F primer 10µM	0,1	0,1	0,1	0,1
R primer 10µM	0,5	0,5	0,5	0,5
M13 linker	0,5	0,5	0,5	0,5
AT gold	0,1	0,1	0,1	0,1
ddH ₂ O	4,7	4,45	4,7	4,7
DNA (4ng/µl)	1	1	1	1

Samtliga mikrosatelliter kördes i cykler enligt följande: 95°C i 5 min, 20 cykler i 95°C i 1min, 60°C-0,5°C/cykel i 1 min, 72°C i 30 sek, följt av 35 cykler i 95°C i 1 min, 55°C i 1 min, 72°C i 30 sek och slutligen 72°C i 30 min.

Sekvensering

Primerdesign för *forward* och *reverse* primers utfördes för varje kandidatgen för att amplifiera regioner med kända SNPs. Vardera primer designades med en M13-tail enligt standardprotokoll för BigDye Cycle Sequencing (Life Technologies Corporation, 2011). Använda primersekvenser ses i bilaga 1.

Statistisk analys

P-värde har i denna studie beaktats som signifikant vid ≤ 0.05 . Alla beräkningar har skett enskilt för varje kandidatgen. Beräkningar har gjorts inom varje släktgrupp samt för det totala antalet sjuka gentemot det totala antalet kontroller.

Inom mikrosatelliterna och sekvenserna beräknades skillnaden i allelfrekvens mellan sjuka och kontroller via 2x2table of Cross-Categorized Frequency Data Version 2 mha websidan Vasserstats.net (Lowry). Signifikansen testades med Fisher Exact test (two-strained) på Vasserstats.net. Hos SNPs har utöver detta även de funna genotyperna jämförts mot det totala antalet via 2x2 table. I studien har inga beräkningar utförts på haplotyper pga att det i resultaten ej gick att särskilja de heterozygota individerna. Beräkningar gjordes därav på alla de funna homozygota genotyperna enskilt medan alla heterozygota genotyper fick ingå i en gemensam grupp.

RESULTAT

Markörer

Efter att de mest signifikanta kandidatgenerna valts ut från litteraturstudien söktes motsvarande gener upp i hästens genom. I Tabell 2 visas vilka kandidatgener som valts ut och deras kromosomposition i hästgenomet.

Tabell 2: Utvalda kandidatgener som lokaliserats hos häst

Gen	Gennamn	Gris SSC	Häst ECA	ECA Kromosomposition
<i>HOXA10</i>	<i>Homeobox A10</i>	18	4	58.200.292-58.203.996
<i>ZFPM2</i>	<i>Zincfinger protein FOG family member 2</i>	4	9	50.352.668-50.669.918
<i>MMP2</i>	<i>Matrix metalloproteinase 2</i>	6	3	7.657.421-7.679.523
<i>COL23A1</i>	<i>Collagen, type XXIII, alpha 1</i>	2	14	4.319.016-4.343.909
<i>ELF5</i>	<i>E74-like factor 5</i>	2	12	1.267.583-1.298.167
<i>KIF18A</i>	<i>Kinesin family member 18A</i>	2	7	94.354.515-94.437.670
<i>NPTX1</i>	<i>Neuronal pentraxin I</i>	12	11	2.557.810-2.562.864
<i>INSL3</i>	<i>Insulin like 3</i>	2	21	2.646.466-2.647.154

I sökandet efter kända markörer tittade vi efter mikrosatelliter i varje kandidatgen, detta gav två mikrosatelliter i *NPTX1* genen och två i *ZFPM2* genen, då inga satta namn fanns på mikrosatelliterna döptes dessa till *NPTX1ms1*, *NPTXms2*, *ZFPM2ms1* och *ZFPM2ms2*. Hos de kandidatgener där inga mikrosatelliter hittades valdes SNPs ut. De kandidatgener där vi fann flera SNPs i ett närliggande område så dessa kunde läsas via en sekvensering var *HOXA10* och

COL23A. Inom *HOXA10* fann vi två intressanta områden, därav benämns de i denna studie som *HOXA10_1* och *HOXA10_2*. De markörer som analyserats i studien visas i Tabell 3.

Tabell 3: Lista av analyserade markörer

Gen	Markörnamn	Markörtyp	Genregion	Kromosomposition
<i>HOXA10_1</i>	rs69575838	G/T	Upstream	4:58.205.446
	rs69575840	C/A	Upstream	4:58.205.495
	rs69575838	A/G	Upstream	4:58.205.496
<i>HOXA10_2</i>	rs69575844	A/G	Upstream	4:58.207.132
	rs69575846	C/T	Upstream	4:58.207.243
	rs69575848	C/T	Upstream	4:58.207.390
<i>COL23A1</i>	rs68969633	A/G	Downstream	14:4.347.364
	rs68969634	A/G	Downstream	14:4.347.401
	rs68969635	T/C	Downstream	14:4.347.647
<i>NPTX1</i>	<i>NPTX1ms1</i>	Mikrosat.	Intron	11:2.563.179
	<i>NPTX1ms2</i>	Mikrosat.	Intron	11:2.564.505
<i>ZFPM2</i>	<i>ZFPM2ms1</i>	Mikrosat.	Intron	9:50.541.533
	<i>ZFPM2ms2</i>	Mikrosat.	Intron	9:50.669.227

Vid analys av utvalda markörer erhöles resultat från samtliga SNPs och från mikrosatelliterna *NPTX1ms1* samt *ZFPM2ms2*. Svaga resultat där avläsningen av allel inte kunde tydligt utläsas plockades bort ur studien. Antalet användbara provresultat som erhöles efter analyserna ses i Tabell 4.

Tabell 4: Antal individer med resultat för varje kandidatgen

Gen	Sjuka *	Kontroller
<i>HOXA10_1</i>	9	195
<i>HOXA10_2</i>	9 + (1)	189 + (2)
<i>COL23A1</i>	9	178 + (3)
<i>NPTX1ms1</i>	8 + (1)	168 + (3)
<i>ZFPM2ms2</i>	9 + (1)	180 + (3)

*Siffrorna inom parentes är de individer vars resultat har rekonstruerats mha deras avkommors resultat, då vi i studien inte haft tillgång till dessa individers DNA.

SNPs

Ingen beräkning var möjlig för *HOXA10_1* då ingen variation sågs i någon av dess SNPs, *HOXA10_1* var i denna studie monomorf.

Vid beräkningar på alleller samt genotyper hos *COL23A1* hittades inga signifikanta samband varken inom familjegrupperna eller hos totalantalet sjuka mot kontroller. P-värden för varje allel (totalantalet sjuka mot kontroller) visas i tabell 5 och P-värden för varje funnen genotyp (totalantalet sjuka mot kontroller) visas i Tabell 6.

Hos HOXA10_2 fanns inget signifikant samband vid beräkning av enskilda alleler. Vid beräkning av funna genotyper hos HOXA10_2 sågs en signifikant koppling (P-värde: 0,0182) mellan att vara homozygot AC och utvecklingen av inguinalbräck. Här sågs ett odds ratio på 5,055 och risk ratio på 4,318. Samtliga P-värden ses i Tabell 5 och 6.

Tabell 5: P-värden för alla sekvenserade kandidatgener

Gen	Markör	Allel	Sjuka	Friska	P-värde
<i>COL23A1</i>	rs68969633	A	16	305	0,752
		G	2	55	0,752
	rs68969634	A	16	305	0,752
		G	2	55	0,752
	14:4.347.454	A	1	33	1
		G	17	327	1
rs68969635	T	16	305	0,752	
	C	2	55	0,752	
<i>HOXA10_2</i>	rs69575844	A	7	73	0,0899
		G	13	309	0,0899
	rs69575846	C	9	134	0,472
		T	11	248	0,472

Tabell 6: P-värden för alla sekvenserade genotyper

Gen	Haplotyp	Sjuka	Friska	P-värde
<i>COL23A1</i>	AAGT	14	266	0,792
	GGAC	0	4	1
	GGGC	0	4	1
	Heterozygot 4		86	1
<i>HOXA10_2</i>	AC	4	18	0,0182
	GC	0	14	0,633
	GT	6	170	0,250
	Heterozygot 10		180	0,822

Mikrosatelliter

NPTX1ms1

I familjegrupperna fanns ingen koppling som visade signifikans. P-värden för alleler hos gruppen totalantalet sjuka mot kontroller ses i tabell 7.

Tabell 7: *P*-värden för alla funna alleler hos *NPTX1ms1*

Gen	Markör	Allel	Sjuka	Friska	P-värde
<i>NPTX1</i>	NPTX1ms1	H	2	30	0,644
		I	2	29	0,638
		J	0	4	1
		K	0	5	1
		M	9	182	1
		P	3	87	0,584
		Q	0	1	1
		R	0	4	1

Beräkning av totalantalet homozygota (2 sjuka, 72 kontroller) gentemot totalantalet heterozygota (6 sjuka, 99 kontroller) gav P-värde 0,472.

ZFPM2ms2

Ingen koppling med signifikans funnen varken i familjegrupper eller vid jämförelse hos totalt antal sjuka mot totalt antal kontroller. P-värden för totala antalet sjuka och kontroller ses i tabell 8.

Tabell 8: *P*-värden för alla funna alleler hos *ZFPM2ms2*

Gen	Markör	Allel	Sjuka	Friska	P-värde
<i>ZFPM2</i>	ZFPM2ms2	M	6	83	0,585
		N	3	49	1
		O	3	28	0,389
		P	1	74	0,142
		R	0	32	0,242
		S	3	69	0,759
		T	4	31	0,0960

Beräkning av totalantalet homozygota (0 sjuka, 44 kontroller) gentemot totalantalet heterozygota (10 sjuka, 139 kontroller) gav P-värde 0,120.

DISKUSSION

Då ärftlighet för risken att utveckla inguinalbräck är funnen inom andra djurslag, samt att tidigare studier visat på skillnader i prevalensen mellan olika hästraser, är det troligt att det finns genetiska riskfaktorer för inguinalbräck även hos häst. Skulle studier visa på att så är fallet bör hingstar som har denna sjukdom ej fortsatt användas i avel. Idag har vi flera exempel på avelshingstar som drabbats av pungbräck och efter operativ behandling fortsatt används i avel efter att ha fått godkänt undantag för vidare avel.

I denna studie fann vi en signifikant koppling (P-värde 0,0182) hos *HOXA10_2* för den homozygota genotypen AC vid utveckling av inguinalbräck hos häst. Med ett OR på 4,3 och RR på 5,0 visar detta på att individer med genotypen AC har högre risk att utveckla inguinalbräck gentemot andra individer. Vid beräkningar på alleler hos *HOXA10_2* markör rs69575844 sågs ett P-värde på 0,0899 (OR och RR på ca 2,0 för allel A). Detta P-värde är enligt de kriterier som använts i denna studie ej signifikant men det är mycket möjligt att ett signifikant samband skulle ses här om fler individer hade ingått i studien. Dessa resultat visar på att genen *HOXA10_2* bör räknas som högintressant i vidare forskning angående inguinalbräck och dess eventuella genetiska bakgrund hos häst.

Vi fann i studien även en ny SNP inom *COL23A1* som inte finns rapporterad sedan tidigare, placerad på kromosomposition 14:4.347.454.

I denna studie har vi valt ut kandidatgener baserat på samband som fastställts hos andra djurslag, då inga studier har utförts hos häst. Vi har endast undersökt resultat från markörer i fyra olika kandidatgener, *COL23A1*, *HOXA10*, *NPTX1* och *ZFPM2*. Av fyra mikrosatelliter (*NPTX1ms1*, *NPTX1ms2*, *ZFPM2ms1* och *ZFPM2ms2*) gavs endast resultat från två, *NPTX1ms1* och *ZFPM2ms2*. Av de tre sekvenserade kandidatgenerna, *COL23A1*, *HOXA10_1* och *HOXA10_2*, sågs endast variation inom två (*COL23A1* och *HOXA10_2*). Detta gav ett litet material för resultatberäkning. Endast nio drabbade hästar ingick. Detta är ett mycket litet material för att hitta en genetisk orsak till inguinalbräck då denna åkomma så som de flesta sjukdomar mycket troligt styrs av samverkan mellan flera olika gener.

I denna studie använde vi befintliga hår och blodprover i biobanken hos HGEN och i det materialet fanns endast ett fåtal individer med bekräftade sjukdomsfall. Dock fanns ingen tidsmässig möjlighet att samla in nya prover för att få med flera sjuka individer i studien. I val av kontroller utgick vi ifrån vid HGEN inregistrerade data, så som kön och stamtavla. Vi måste därav räkna med en felmarginal för att hanliga individer kan vara kastrerade utan att det rapporterats in och uppdaterats. Vi vet heller inte helt säkert att ingen av kontrollerna drabbats av sjukdomen utan vår vetskap. Vid denna sjukdom, så som hos de flesta andra, finns möjligheten att individer som ingått i kontrollgruppen kommer att utveckla sjukdomen inom sin livstid. Dessa felmarginaler kan ge en betydande påverkan på slutresultatet. Dock har vi minimerat denna felkälla genom att analysera en stor mängd kontroller gentemot antalet sjuka individer, därav bör en dold affekterad individ i kontrollgruppen inte påverka signifikansnivån nämnvärt då det är en mycket liten andel av totala antalet kontroller.

Resultathanteringen, främst för mikrosatelliter, sker till stor del manuellt varav en möjlig felkälla via mänskliga felbedömningar måste inräknas.

För vidare utredning i ämnet krävs en betydligt större studie som innefattar fler individer med stringent klinisk utvärdering att vara sjuk respektive frisk. En kontrollerad studie som syftar till att utvärdera nedärvningsmönstret för inguinalbräck hos häst är viktigt för att optimalt kunna definiera en förutsättningslös genetisk associationsstudie med en panel av genetiska markörer spridda över hela genomet.

KONKLUSION

I denna studie har vi funnit ett signifikant genetiskt samband med *HOXA10* vid utvecklingen av inguinalbräck hos häst. Dock är detta en liten pilotstudie som behöver konfirmeras och i nuläget inte kan varken bekräfta eller utesluta en genetisk bakgrund till sjukdomen. Då hingstar fortsatt idag ges dispens för fortsatt avel efter att ha drabbats av sjukdomen och kirurgiskt åtgärdats bör detta fortsatt anses som ett högt prioriterat område för vidare forskning.

REFERENSER

- Ball, A.D., Stapley, J., Dawson, A.D., Birkhead, T.R., Burke, T. & Slate, J. (2010). A comparison of SNPs and microsatellites as linkage mapping markers: lessons from the zebra finch (*Taeniopygia guttata*). *BMC Genomics*, 11:e218.
- Banyard, J., Bao, L. & Zetter, B.R. (2003). Type XXIII collagen, a new transmembrane collagen identified in metastatic tumor cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 278 (23):20989-20994.
- Bashamboo, A., Brauner, R., Bignon-Topalonic, J., Lortat-Jacob, S., Karageorgon, V., Lourenco, D., Guffanri, A. & McElreavey, K. (2014). Mutations of the FOG2/ZFPM2 gene are associated with anomalies of human testis determination. *Human Molecular Genetics*, 23 (14):3657-3665.
- Blikslager, A.T. (2010). Ischemic disorders of the intestinal tract. I: Reed, S.M., Bayly, W.M. & Sellon, D.C. (red), *Equine Internal Medicine*. 3. ed. St. Louis: Saunders, 878.
- Brady, P.D., Van Houdt, J., Callewaert, B., Deprest, J., Devriendt, K. & Vermeesch, J.R. (2014). Exome sequencing identifies ZFPM2 as a cause of familial isolated congenital diaphragmatic hernia and possibly cardiovascular malformations. *European Journal of Medical Genetics*, 57:247-252.
- Du, Z.Q., Zhao, X., Vukasinovic, N., Rodriguez, F., Clutter, A.C. & Rothschild, M.F. (2009). Association and haplotype analyses of positional candidate genes in five genomic regions linked to scrotal hernia in commercial pig lines. *Plos One*, 4 (3):4837.
- Föreskrifter om ändring i Djurskyddsmyndighetens föreskrifter (DFS 204:22) om avelsarbete. (2009). Jönköping. (SJVFS 2009:28).
- Gilson, M. & Tassis, A. (2007). Genome analysis: microsatellites or SNPs. *Genetic Engineering & Biotechnology News*, 7 (3). Tillgänglig: <http://www.genengnews.com/gen-articles/genome-analysis-microsatellites-or-snps/1987> [2018-02-03]
- Goodman, A.R., Cardozo, T., Abagyan, R., Altmeyer, A., Wisniewski, H.G. & Vilcek, J. (1996). Long pentraxins: an emerging group of proteins with diverse functions. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, vol. 7 (2):191-202.
- Griffiths, A.J.F., Wessler, S.R., Lewontin, R.C. & Carroll, S.B. (2008). Mapping eukaryote chromosomes by recombination. I: Tenney, S. (red), *Introduction to Genetic Analysis*. 9. ed. New York: W. H. Freeman and Company, 147-152.
- Grindflek, E., Moe, M., Taubert, H., Simianer, H., Lien, S. & Moen, T. (2006). Genome-wide linkage analysis of inguinal hernia in pigs using affected sib pairs. *BMC Genetics*, 7:25.
- Hayes, H.M. (1974). Congenital umbilical and inguinal hernias in cattle, horses, swine, dogs and cats: risk by breed and sex among hospital patient. *American Journal of Veterinary Research*, 35:839-842.
- Henriksen, N.A., Mortensen, J.H., Lorentzen, L., Ågren, M.S., Bay-Jensen, A.C., Jorgensen, L.N. & Karsdal, M.A. (2016). Abdominal wall hernias – a local manifestation of systemically impaired quality of the extracellular matrix. *Surgery*, 160 (1):220-227.
- Holmes, M., Turner, J., Fox, A., Chisholm, O., Crossley, M. & Chong, B. (1999). hFOG-2, a novel zinc finger protein, binds the co-repressor mCtBP2 and modulates GATA-mediated activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 274 (33):23491-23498.

- Jones, M.E., Swerdlow, A.J., Griffith, M. & Goldacre, M.J. (1998). Risk of congenital inguinal hernia in siblings: a record linkage study. *Paediatric and Perinatal Epidemiology*, 12:288-296.
- Koch, M., Veit, G., Stricher, S., Bhatt, P., Kutsch, S., Zhon, P., Reinders, E., Hahn, R.A., Song, R., Burgeson, R.E., Gerecke, D.R., Mundlos, S. & Gordon, M.K. (2006). Expression of type XXII collagen mRNA and protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 281 (30):21546-21557.
- Koskimies, P., Suvanto, M., Nokkala, E., Huhtaniemi, I.T., McLuskey, A. Themmen, A.P.N. & Poutanen, M. (2002). Female mice carrying a ubiquitin promoter-Ins13 transgene have descended ovaries and inguinal hernias but normal fertility. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 206:159-166.
- Lam, C.W., Lau, K.C. & Tong, S.F. (2010). Microarrays for personalized genomic medicine. *Advances in Clinical Chemistry*, 52. doi: 10.1016/S0065-2423(10)52001-8. [2018-02-23]
- Lewis, L.A., Huskey, P.S. & Kusewitt, D.F. (2012). High incidence of scrotal hernia in a closed colony of FVB mice. *Comparative Medicine*, 62 (5):391-394.
- Ma, Q.L., Teng, E., Zuo, X., Jones, M., Teter, B., Zhao, E.Y., Zhu, C., Bilousova, T., Gylys, K.H., Apostolova, L.G., LaDu, M.J., Hossain, M.A., Frautschy, S.A. & Cole, G.M. (2018). Neuronal Pentraxin 1: A synaptic-derived plasma biomarker in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease*, doi: 10.1016/j.nbd.2018.02.014. [2018-03-09]
- Rijli, F.M., Matyas, R., Pellegrini, M., Dierich, A., Gruss, P., Dollé, P. & Chambon, P. (1995). Cryptorchidism and homeotic transformations of spinal nerves and vertebrae in Hoxa-10 mutant mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 92:8185-8189.
- Scarlato, M., Ara, J., Bannerman, P., Scherer, S. & Pleasure, D. (2002). Induction of neuropilins-1 and -2 and their ligands, Sema3A, Sema3F, and VEGF, during Wallerian degeneration in the peripheral nervous system. *Experimental Neurology*, 183:489-498.
- Schaid, D.J., Guenther, J.C., Christensen, G.B., Hebring, S., Rosenow, C., Hilker, C.A., McDonnell, S.K., Cunningham, J.M., Slager, S.L., Blute, M.L. & Thibodeau, S.N. (2004). Comparison of microsatellites versus single-nucleotide polymorphism in a genome linkage screen for prostate cancer-susceptibility loci. *American Journal of Human Genetics*, 75:948-965.
- Sembrat, R.F. (1975). The acute abdomen in the horse epidemiologic considerations. *Veterinary Surgery*, 4:34-39.
- Sjaastad, Ø.V., Hove, K. & Sand, O. (2003). Reproduction. I: Steel, C. (red), *Physiology of Domestic Animals*. 1. ed. Oslo: Scandinavian Veterinary Press, 630-631.
- Slate, J., Gratten, J., Beraldi, D., Stapley, J., Hale, M.C. & Pemberton, J.M. (2008). Gene mapping in the wild with SNPs: guidelines and future directions. *Genetica*, 136:97-107.
- Stashak, T.S. (1993). Inguinal Hernia. I: McKinnon, A.O. & Voss, J.L. (red), *Equine Reproduction*. 1 ed. Philadelphia: Blackwell publishing, 925-931.
- Life Technologies Corporation. (2011) *BigDye Direct Sequencing Kit Protocol*. Part nr. 4458040, rev. C.
- Lowry, R. Website at Vassar College. <http://vassarstats.net>.
- Vogt, D.W. & Eilersieck, M.R. (1990). Heritability of susceptibility to scrotal herniation in swine. *American Journal of Veterinary Research*, 51:1501-1503.

- Wade, C.M., Giulotto, E., Sigurdsson, S. *et al.* (2009). Genome sequence, comparative analysis, and population genetics of the domestic horse. *Science*, 326:865-867.
- Yasuhara, F., Olivera Gomes, G.R., Siu, E.R., Suenaga, C.I., Maròstica, E., Porto, C.S. & Magalhaes Lazari, M. F. (2008). Effects of the antiestrogen fulvestrant (ICI 182,780) on gene expression of the rat efferent ductules. *Biology of Reproduction*, 79:432-441.
- Zhao, X., Du, Z.Q., Vukasinovic, N., Rodriguez, F., Clutter, A.C. & Rothschild, M.F. (2009). Association of HOXA10, ZFPM2, and MMP2 genes with scrotal hernias evaluated via biological candidate gene analyses in pigs. *American Journal of Veterinary Research*, 78 (8):1006-1012.
- Zimmermann, S., Steding, G., Emmen, J.M.A., Brinkmann, A.O., Nayernia, K., Holstein, A.F., Engel, W. & Adham, I.M. (1999). Targeted disruption of the *Insl3* gene causes bilateral cryptorchidism. *Molecular Endocrinology*, 13 (5):681-691.

Bilaga 1.

Primer sekvenser för amplification av microsatelliter

Markör	Kromo- som	Forward primer*	Reverse primer	Referens
NPTX1m1	11	[TGTA AACGACGGCCAGT] TGCAGAAGTAGGTGAGAGGAC	GCACACAGGCAGCTAACAAA	Wade <i>et al.</i> (2009)
NPTX1ms2	11	[TGTA AACGACGGCCAGT] GTGACACTGAGACCTGACCA	GGGTATGATCCGTCTCAGCA	Wade <i>et al.</i> (2009)
ZFPM2ms1	9	[TGTA AACGACGGCCAGT] GGCAGTGGTGATGGCATCTA	GTGTTGCTTCCCTAACTGCA	Wade <i>et al.</i> (2009)
ZFPM2ms2	9	[TGTA AACGACGGCCAGT] TCACTACACAGGACGGTATGT	TAATAGCCCTCCCCTCTCCC	Wade <i>et al.</i> (2009)

*Forward primer med M13 (-21) universal sekvens inom klamrar.

Primersekvenser för SNPs

Gen (kromosom)	Markör	Forward primer* ¹	Reverse primer* ²	Referens
COL23A (2)	rs68969633, rs68969634, rs68969635	[TGTA AACGACGGCCAGT] GCAGGACCAGGGATATCACA	[CAGGAAACAGCTATGACC] GGCAGTGCAGAGAAGTCAAG	Wade <i>et al.</i> (2009)
HOXA10_1 (18)	rs69575838, rs69575838 rs69575838	[TGTA AACGACGGCCAGT] GCCTCATAACAGTCTCAGGA	[CAGGAAACAGCTATGACC] GCCCAAGTGCTGACAAATCA	Wade <i>et al.</i> (2009)
HOXA10_2 (18)	rs69575844, rs69575846, rs69575848	[TGTA AACGACGGCCAGT] GTGTAAGCGTGTGTGGGAAC	[CAGGAAACAGCTATGACC] AAATGGCAAGAGGGAGAGC	Wade <i>et al.</i> (2009)

*¹Forward primer med M13 (-21) universal sekvens inom klamrar.

*²Reverse primer med M13 (-29) universal sekvens inom klamrar.