

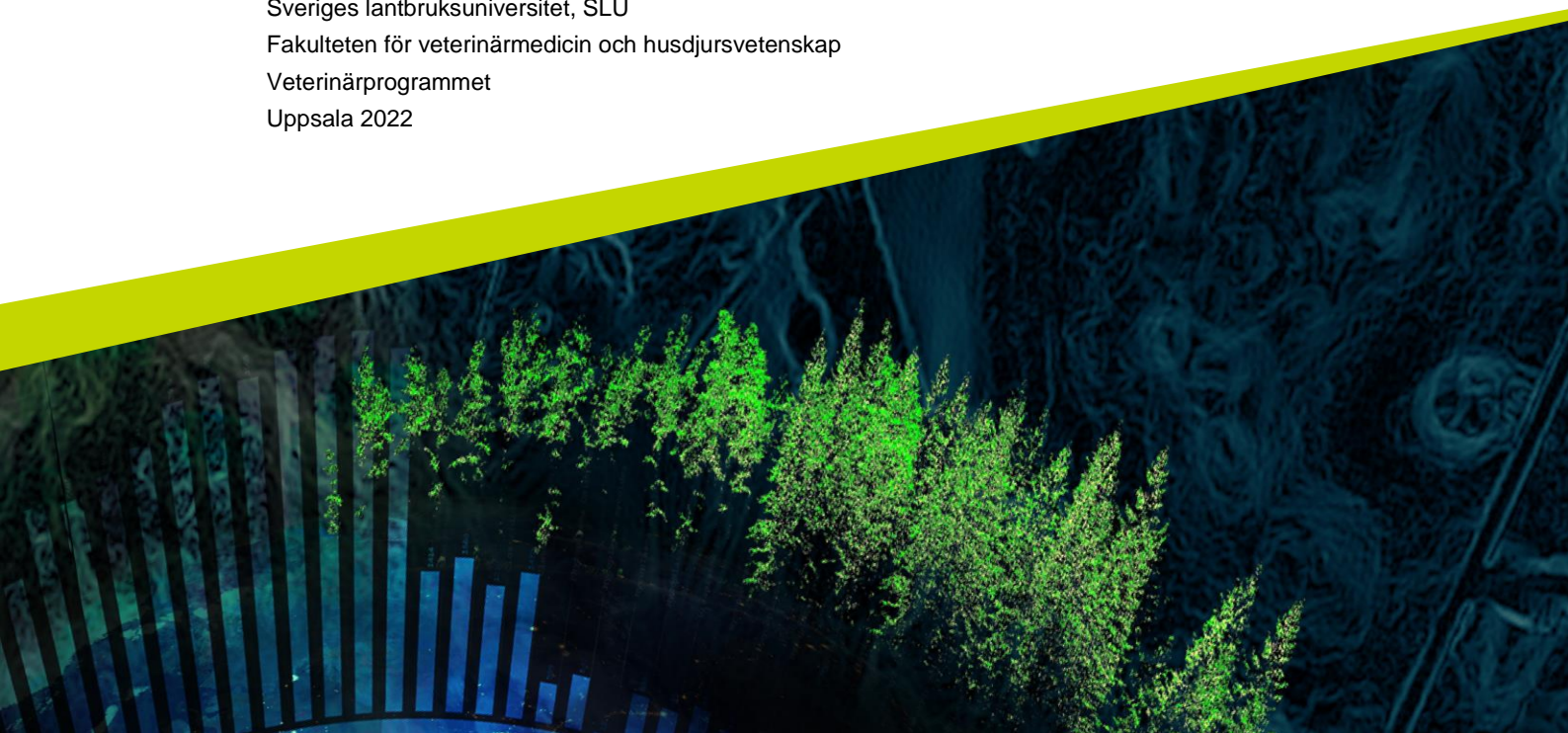


Studier av genetisk bakgrund till nedsatt spermiekvalitet hos berner sennenhundar

*Identification of genetic factors causing decreased semen quality in
Bernese mountain dogs*

Martin Kläschen

Självständigt arbete • 30 hp
Sveriges lantbruksuniversitet, SLU
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Veterinärprogrammet
Uppsala 2022



Studier av genetisk bakgrund till nedsatt spermiekvalitet hos berner sennenhundar

Identification of genetic factors causing decreased semen quality in Bernese mountain dogs

Martin Kläschen

Handledare: Bodil Ström Holst, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för kliniska vetenskaper
Bitr. handledare: Göran Andersson, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för husdjursgenetik
Examinator: Patrice Humblot, Sveriges lantbruksuniversitet, institutionen för kliniska vetenskaper

Omfattning: 30 hp
Nivå och fördjupning: A2E
Kurstitel: Självständigt arbete i veterinärmedicin
Kurskod: EX0869
Program/utbildning: Veterinärprogrammet
Kursansvarig inst.: Institutionen för kliniska vetenskaper

Utgivningsort: Uppsala
Utgivningsår: 2022

Nyckelord: Berner sennen, fertilitet, spermiekvalitet, spermiemorfologi, kandidatgener, *DNAH1*, *ARCM2*, RNA

Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för kliniska vetenskaper

Publicering och arkivering

Godkända självständiga arbeten (examensarbeten) vid SLU publiceras elektroniskt. Som student äger du upphovsrätten till ditt arbete och behöver godkänna publiceringen. Om du kryssar i **JA**, så kommer fulltexten (pdf-filen) och metadata bli synliga och sökbara på internet. Om du kryssar i **NEJ**, kommer endast metadata och sammanfattning bli synliga och sökbara. Fulltexten kommer dock i samband med att dokumentet laddas upp arkiveras digitalt.

Om ni är fler än en person som skrivit arbetet så gäller krysset för alla författare, ni behöver alltså vara överens. Läs om SLU:s publiceringsavtal här:

<https://www.slu.se/site/bibliotek/publicera-och-analysera/registrera-och-publicera/avtal-for-publicering/>.

JA, jag/vi ger härmed min/vår tillåtelse till att föreliggande arbete publiceras enligt SLU:s avtal om överlåtelse av rätt att publicera verk.

NEJ, jag/vi ger inte min/vår tillåtelse att publicera fulltexten av föreliggande arbete. Arbetet laddas dock upp för arkivering och metadata och sammanfattning blir synliga och sökbara.

Sammanfattning

Syftet med denna studie var att undersöka möjliga ärftliga faktorer till nedsatt spermiekvalitet hos berner sennenhundar i Sverige. I tidigare morfologiska studier av sperma från berner sennenhundar konstaterades att de har ett förhöjt antal svansdefekter jämfört med normalvariation för hundar. Utifrån detta valde vi att undersöka gener involverade i bildningen av spermiers flagell i en kandidatgenapproach. Eftersom det finns få studier inom detta område hos hund valde vi ut kandidatgener som visats orsaka svansdefekter hos möss och människor, dessa var Dynein Heavy Chain 1 (*DNAH1*) och Armadillo Repeat Containing 2 (*ARMC2*). Vi begränsade undersökningen till att undersöka exon 73 i *DNAH1* och exon 4, 8, 10, 16 & 17 i *ARMC2* med PCR och Sangersekvensering från åtta hanhundar av rasen berner sennen. För PCR-sekvensering använde vi genomisk DNA från helblod. Från 91 av totalt 96 PCR-sekvenser var resultaten av god kvalitet och kunde analyseras. Från tre individer erhöles specifika PCR-produkter från antingen forward eller reverseprimern, och från en individ erhöles ingen produkt från exon 16 från *ARMC2* genen. Inga mutationer som setts i dessa gener hos möss och människor med astenozoospermi kunde ses hos dessa hundar.

För att undersöka om det är möjligt att relatera mängden mRNA från utvalda gener till spermiekvalitet från fryst och färsk sperma analyserades färsk och fryst sperma från en beagle samt fryst sperma från en berner sennenhane. RNA extraherades med och utan tillsats av Ribonukleas (RNas) inhibitor och RNA Integrity Number (RIN) värdet med och utan denna tillsats jämfördes. Kvaliteten på RNA isolatet utvärderades med hjälp av en Agilent Tapestation, som bestämmer ett RIN-värde på en skala mellan 1 och 10. I studien erhöles det högsta RIN värdet på 5,8 när färsk sperma analyserades med tillsats av RNas inhibitor. Det lägsta RIN värdet var 2,7 vilket erhöles när fryst sperma analyserades från en berner sennen men som fick RNas inhibitor tillsatt vid analys, och från färsk sperma utan tillsats av RNas inhibitor. Detta var endast en pilotstudie på totalt 3 prover för att utvärdera metodens effektivitet att utvinna RNA från spermier. Vi kontrollerade också kvaliteten på färsk vs fryst sperma för att få information om metodens effektivitet.

Ytterligare studier behövs för att finna den genetiska bakgrunden till nedsatt spermiekvalitet hos berner sennenhundar. Slutsatsen från vår studies andra del är att det sannolikt går att optimera RIN värdet från hund spermier genom att modifiera protokollet och att det går att använda RNA från hund spermier för att studera och vidare analysera genuttryck från intressanta gener.

Nyckelord: Berner sennen, fertilitet, spermiekvalitet, spermimorfologi, kandidatgener, *DNAH1*, *ARMC2*, RNA

Abstract

The purpose of this study was to investigate possible hereditary factors for impaired sperm quality in Bernese Mountain Dogs in Sweden. In previous morphological studies of semen from Bernese Mountain Dogs, it was found that they have an increased number of tail defects compared to the normal variation for dogs. Based on this, we chose to examine genes involved in the formation of the sperm flagella using a candidate gene approach. Because there are few studies within this area in dogs, we selected candidate genes that have been shown to cause tail defects in mice and humans, these were Dynein Heavy Chain 1 (*DNAH1*) and Armadillo Repeat Containing 2 (*ARMC2*). We limited the study to examining exon 73 in *DNAH1* and exons 4, 8, 10, 16 & 17 in *ARMC2* using PCR and Sanger sequencing from eight male Bernese Mountain dogs. For PCR sequencing, we used whole blood genomic DNA. From 91 of a total of 96 PCR sequences, the results were of good quality and could be analyzed. From three individuals specific PCR products were obtained from either forward or reverse primer, and from one individual no product was obtained from exon 16 of the *ARMC2* gene. None of the exons that have been described to harbour mutations in these genes in mice and humans with asthenozoospermia were shown to have mutations in these dogs.

To investigate whether it is possible to relate the amount of mRNA expressed from selected genes to sperm quality from frozen and fresh semen, fresh and frozen semen from a beagle and frozen semen from a male Bernese Mountain Dog were analyzed. RNA was extracted with and without the addition of RNase inhibitor and the RNA Integrity Number (RIN) values obtained with or without this addition were compared. The quality of the RNA isolate was evaluated using an Agilent TapeStation, which determines a RIN value on a scale between 1 and 10. In the study, the highest RIN value of 5.8 was obtained when analyzing fresh semen with the addition of RNase inhibitor. The lowest RIN value was 2.7, which was obtained when analyzing frozen semen from a Bernese Mountain Dog but which had RNase inhibitor added during the RNA preparation, and from fresh semen without added RNase inhibitor. This was only a pilot study of a total of 3 samples to evaluate the method's effectiveness in extracting RNA from sperm. We also checked the quality of fresh vs frozen semen to get an idea of the effectiveness of the method.

Further research is needed to find the genetic background to decreased sperm quality in Bernese Mountain Dogs. The conclusion from our second part of the study is that it should be possible to optimize the RNA preparation protocol to obtain better quality of RNA with increased RIN value from dog sperm and to use RNA prepared from dog sperm to evaluate gene expression of interesting genes.

Keywords: Bernese Mountain Dog, fertility, sperm quality, sperm morphology, candidate genes, *DNAH1*, *ARCM2*, RNA

Innehållsförteckning

Förkortningar	9
1. Inledning	11
2. Litteraturoversikt	12
2.1. Fruksamhetsproblem	12
2.1.1. Onormal löpningscykel	12
2.1.2. Ofullständig parning eller parning vid fel tidpunkt	12
2.1.3. Abort	13
2.1.4. Kryptorkism	13
2.1.5. Prostataproblem	13
2.1.6. Spermakvalitet	13
2.2. Spermatogenes	14
2.3. Spermimorfologi	15
2.4. Avvikelser i spermaproduktionen	16
2.4.1. Azoospermi och oligozoospermi	16
2.4.2. Astenozoospermi/astenospermi och nekrozoospermi/nekrospermi ...	17
2.4.3. Teratozoospermi/teratospermi	17
2.4.4. Kompensatoriska defekter och icke-kompensatoriska defekter	18
2.5. MMAF (multipla morfologiska abnormala spermieflageller)	19
2.6. Genetisk variation	19
2.6.1. Kandidatgener	20
2.6.2. <i>DNAH1</i>	21
2.6.3. <i>ARMC2</i>	21
2.7. Polymerase Chain Reaction (PCR)	22
2.7.1. Primers	23
2.8. RNA	24
3. Material och metod	25
3.1.1. Utvalda hundar till kandidatgenapproach	25
3.1.2. Provinsamling	26
3.1.3. Spermaanalyzer	26
3.1.4. Utvalda kandidatgener	26
3.1.5. Exklusionskriterier	27

3.1.6.	Preparation av genomiskt DNA	27
3.1.7.	Sanger-sekvensering	27
3.1.8.	Studie 2 RNA extraktion	28
3.1.9.	Spermahantering inför RNA-analys	29
3.1.10.	RNA extraktion från färsk och fryst sperma	29
3.1.11.	Förvaring och kvalitetskontroll av RNA prover	29
3.1.12.	Databaser	30
4.	Resultat.....	31
4.1.1.	Sekvensdata från <i>DNAH1</i> genen.....	31
4.1.2.	Sekvensdata från exon 8 på <i>ARMC2</i> genen	32
4.1.3.	Sekvensdata från exon 16 på <i>ARMC2</i> genen	33
4.1.4.	Sekvensdata från exon 17 på <i>ARMC2</i> genen	34
4.1.5.	Sekvensdata från exon 10 på <i>ARMC2</i> genen	35
4.1.6.	Sekvensdata från exon 4 på <i>ARMC2</i> genen	36
4.1.7.	Kvalitet av extraherad RNA från färsk och fryst sperma.....	37
5.	Diskussion.....	38
	Referenser.....	40
	Tack	45
	Populärvetenskaplig sammanfattning	46

Förkortningar

<i>DNAH1</i>	Dynein Heavy Chain 1
<i>ARMC2</i>	Armadillo Repeat Cointaining 2
<i>MMAF</i>	Multiple Morphological Abnormalities of the sperm Flagella
<i>PCR</i>	Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribonukleinsyra
RNas	Ribonukleas

1. Inledning

Sedan 1998 har Svenska Sennenhundklubben (SShK) årligen sammanställt kullstatistik (Svenska Sennenhundklubben u.å.). Statistiken förs över samtliga fyra hundraser som ingår i klubben, grosser schweizer sennenhund, appenzeller sennenhund, entlebucher sennenhund och berner sennenhund. År 2019 var 199 grosser schweizer sennenhundar registrerade i Sverige i svenska Jordbruksverkets hundregister, 27 appenzeller sennenhundar, 54 entlebucher sennenhundar och 4734 berner sennenhundar. (Jordbruksverket u.å.). Mellan år 2011 och 2015 var dräktighetsstatistiken från SShk 69 % baserat på inrapporterade kullar och parade tikar som ej blivit dräktiga (Svenska Sennenhundklubben u.å.). Följande citat kommer från Rasspecifik avelstrategi (RAS) berner sennen (Svenska Sennenhundklubben 2018):

”Detta (reproduktionsproblem) är ett viktigt område att undersöka vidare då risken att trenden med små kullar fortsätter och på sikt minskar avelsbasen betydligt och med det den genetiska variationen.”

Vidare påpekas det i RAS att sjukdomar med genetisk koppling som exempelvis histiocytärt sarkom och andra tumörer och skelettsjukdomar som höftledsdysplasi och armbågsdysplasi blir svårare att få ned eller behålla på en lägre nivå, reproduktionsproblem förhindrar avel på utvalda djur.

En av de viktigaste egenskaperna vid avelsarbete är individens reproduktionsförmåga. Nedsatt fertilitet och infertilitet försvårar självklart avelsarbetet. Fertilitet påverkas av flera faktorer hos både hanhunden och tiken. I en tidigare studie har spermiekvaliteten hos berner sennen visats vara nedsatt, med en förhöjd andel spermier med defekta svansar. I denna studie undersöktes genetiska faktorer som kan orsaka nedsatt spermiekvalitet hos berner sennenhundar. Då få studier har gjorts inom detta område utfördes en kandidatgenapproach baserad på kunskap om två gener där mutationer har orsakat nedsatt spermiekvalitet hos såväl människa som mus. I studien extraherades också RNA från hundspermier för att undersöka om det går att preparera RNA av tillräckligt hög kvalitet för att framöver kunna kvantifiera mRNA från en eller flera utvalda gener genom Realtids PCR och relatera den mängden mRNA mot stabilt uttryckta housekeeping gener.

2. Litteraturöversikt

2.1. Fruksamhetsproblem

Fruksamhetsproblem kan bero på faktorer hos honan hanen eller på en kombination av de båda föräldrarna. Fruksamhetsproblem hos tik kan bero på onormal löpningssykel, ofullständig parning och aborter. Hanlig infertilitet kan bero på nedsatt spermakvalitet med flera bakomliggande orsaker.

2.1.1. Onormal löpningssykel

En normal hund ska genomgå sin första löpning före två års ålder och därefter genomgå nya löpningssyklar med ca 4–10 månaders intervall (Johnston 1991). Orsaker till primärt persisterande anöstrus kan vara ovariektomi, ovariehysterektomi, iatrogena hormonstörningar, kongenitala hormonstörningar och avvikande reproduktionsorgan. Vissa tikar kan ha ägglossning utan att uppvisa typiska karaktäristiska beteenden och tecken associerade med löpning, s.k. tysta löp. Vid sekundär persisterande anöstrus har det gått >18 månader sedan den sista löpningen, orsaker till detta kan vara infektioner, metaboliska störningar och äggstockstumörer.

2.1.2. Ofullständig parning eller parning vid fel tidpunkt

Denna kategori rymmer orsaker till att parningen inte kommer till stånd på grund av smärta/obehag för tiken, t.ex. för att tiken är dominant och vägrar att låta sig bestigas av hanhunden, att omgivningen är stressande, eller på grund av vaginal tvärvägg eller nybildningar i vagina (Themes 2016). Parningsproblem som orsakas av hanen kan bero på att denna är för rädd eller oerfaren för att initiera parningen. En annan orsak kan vara att han inte ejakulerar den spermierika fraktionen.

Parning vid fel tidpunkt i cykeln är en vanlig orsak till utebliven dräktighet (Hase *et al.* 2000). För att inte missa den optimala tidpunkten för befruktning kan man mäta progesteronnivåerna i blodet. Tiken har en preovulatorisk progesteronstegring vilket är anledningen till att man mäter progesteronhalterna i blodet för att uppskatta den bästa tiden för parning.

2.1.3. Abort

Det finns flera patologier som kan orsaka abort hos hund, t.ex. virusinfektioner, trauma, endokrina störningar och läkemedel (Verstegen *et al.* 2008).

En subklinisk inflammation av livmoder kan förhindra en dräktighet trots att både tiken och hanen tidigare varit fertila (Carmichael & Kenney 1968; Hensel *et al.* 2018). Bakteriella infektioner t.ex. brucellos orsakad av *Brucella canis* kan också orsaka aborter.

2.1.4. Kryptorkism

Kryptorkism innebär att en eller båda testiklarna är belägna i bukhålan eller i inguinalkanalen. Båda testiklarna ska vandra ned vid ca 10 dagars ålder men inguinalringen sluts fullständigt först vid ca 6 månaders ålder (Romagnoli 1991). Testiklar belägna i skrotum är ca 4-5°C kallare än testiklar i bukhålan vilket är optimalt för spermatogenesisen (Moon *et al.* 2014). Om testiklarna är belägna i bukhålan så leder den högre temperaturen till skadliga effekter på spermatogenesisen. Därför är bilateralt kryptorkida hanar som regel sterila medan unilateralt kryptorkida hundar fortfarande kan producera fertiliseringsdugliga spermier.

2.1.5. Prostataproblem

Hundar har endast en accessorisk könskörtel, prostatan. Sjukdomar såsom benign prostatahyperplasi, prostatit, abscesser och cystor är vanligt förekommande hos intakta hanhundar, och tycks förekomma oftare hos de större hundraserna (Freshman 2001). Omkring 80 % av intakta hanhundar över 5 år har benign prostatahyperplasi, ett tillstånd som ökar risken för prostatit. Många hundar med kronisk prostatit har inga tydliga tecken på sjukdom, men infektion i prostata kan spridas till bitestiklarna och testiklarna. Spermimotoiliteten kan försämrans av onormal prostatavätska.

2.1.6. Spermakvalitet

Spermakvalitet är relaterad till funktionen hos testiklarna, bitestiklarna och prostatan (Holst *et al.* 2012). Infektion av hanhundar med *B. canis* kan orsaka epididymit och prostatit. Kronisk inflammation kan orsaka unilateral och/eller bilateral testikelatrofi och infertilitet. Sjukdomen upptäcktes första gången i Sverige 2010 och bakterien är inte endemisk i Sverige.

Analys av spermakvaliteten kan exempelvis utföras vid utvärdering av en hanhund inför planerat avelsarbete (Althouse *et al.* 2015). Vid en andrologisk undersökning ingår anamnes, signalement, klinisk undersökning samt analys av ett spermprov från hunden. Spermprov från hund samlas vanligen via manuell manipulation

gärna i närvaro av en tik som löper. Ejakulatet undersöks sedan både makroskopiskt och mikroskopiskt. Vid den makroskopiska undersökningen beaktas parametrar som volym och färg, medan den mikroskopiska undersökningen beaktar koncentration, motilitet och morfologi. Dock så är vetskapen om i vilken grad spermakvalitet kan förutspå eller korreleras med fertilitet i dagsläget begränsad. I en studie av (Sacke 2008) kunde endast 50-60 % av variationen inom hanlig fertilitet beräknas genom undersökning av spermernas egenskaper. Till skillnad från andra arter, finns det endast ett fåtal genetiska studier över nedsatt hanlig fertilitet hos hundar (Marelli *et al.* 2020).

2.2. Spermatogenes

Spermatogenes är en kontinuerlig process där haploida spermatozoer utvecklas från stamceller i testikelns *Tubuli seminiferi* (Chłopik & Wysokińska 2020). Spermatogenesen kan delas in i tre stadier: spermatocytogenes, spermiogenes och spermiering. När hanhunden genomgår könsmognad prolifererar och differentierar spermatogonier från stamceller till färdiga spermier. Spermatogonier är diploida celler, dvs innehåller två uppsättningar kromosomer och betecknas $2n$. Ena kromosomuppsättningen har ärvts från modern och den andra från fadern. Spermatogonien genomgår mitos och bildar två typer av celler, en ny spermatogonie och en primär spermatocyt. Den primära spermatocyten genomgår två stadier av meios (meios I och II) för att ge upphov till två stycken sekundära spermatocyter och slutligen fyra stycken haploida spermatider (se bild 1). Spermatiderna genomgår slutligen en mognadsprocess kallad "spermiogenes". Under denna process genomgår spermatiden flera viktiga morfologiska utvecklingssteg för att slutligen bilda en mogen spermatid. Den mogna spermatiden avgår från sertolicellen i en process kallad spermiering och transporteras till bitestikeln för fortsatt mognad för att slutligen bli en mogen spermie.

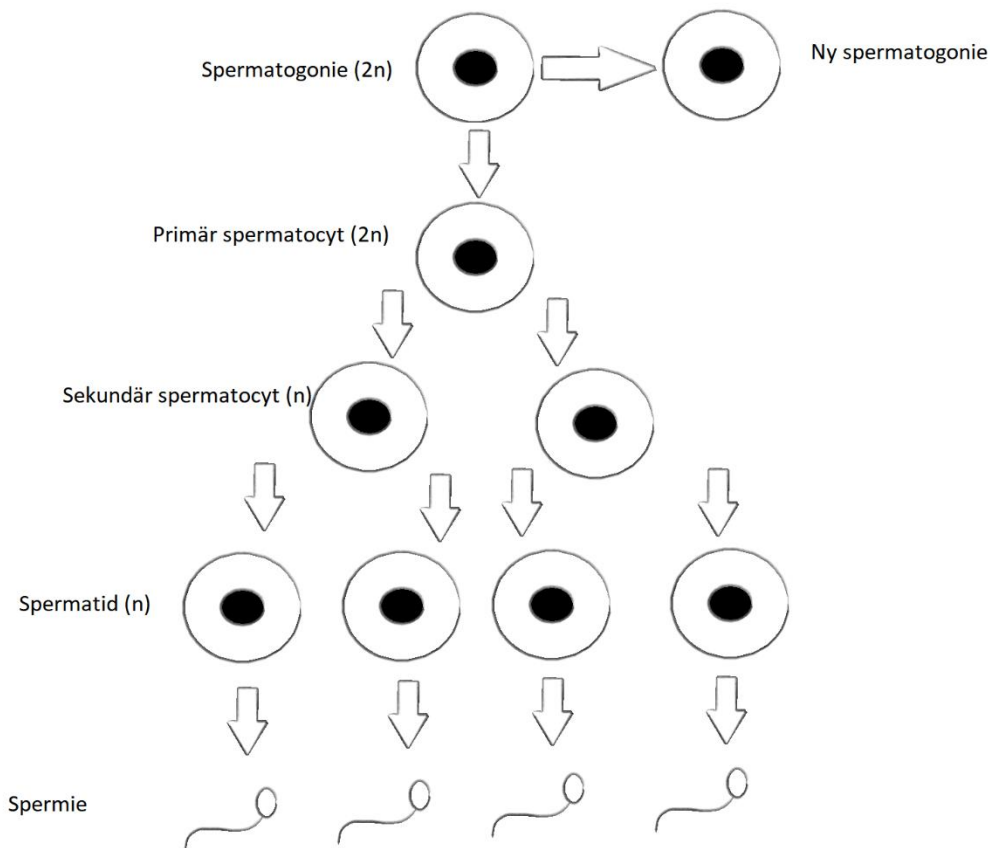


Bild 1. En schematisk bild över spermatogenesen. Illustration av författaren.

2.3. Spermimorfologi

En korrekt bildad spermie består av ett huvud, hals, mittstycke och svans (även kallad flagell) (Chłopik & Wysokińska 2020). Huvudet är klätt av en akrosom som innehåller enzymer som möjliggör för spermier att penetrera oocytens hölje (*zona pellucida*). Huvudet innehåller cellkärnan med sitt kromatin bestående av DNA i form av en enkel kromosomuppsättning packat med protamin. Mittstycket innehåller en stor mängd mitokondrier som förser spermien med den energi som behövs för rörelseförmågan i form av ATP. Svansen/flagellen bidrar till spermies rörlighet genom en roterande rörelse som uppstår tack vare axonemet. En normal spermie-motilitet är en snabb, progressiv framåtverkande rörelse.

Flageller och cilier är rörliga utskott som bekläder cellytan, de varierar i längd, i antal per cell, och i de mönster av rörlighet som de producerar (Mitchell 2007). Flageller är först och främst organeller som slår, och deras komplexa struktur skulle inte ha utvecklats utan evolutionärt urval för motilitet, vilket framgår av förlusten av mycket av strukturer i icke-rörliga sensoriska cilier, s.k. primära cilier som

återfinns i nästan alla kroppens celler. Flageller hos eukaryota arter, till exempel hundars spermiesvansar består av en bunt av nio fuserade mikrotubulipar som omger två centrala mikrotubuli (Ishikawa 2017). Varje par av de yttre nio mikrotubuliparen har två dyneinarmar en inre och en yttre, som sträcker sig till de två intilliggande mikrotubuliparen. Dyneinarmar alstrar aktion som för spermien framåt genom hydrolysering av ATP. Dyneinarmarna aktiveras i olika faser och skapar det vågrika rörelsemönstret som för spermien framåt.

Det finns skillnader mellan cilie- och flagellbildning, eftersom vissa gener kodar för proteiner som är mer avgörande för flagellbildningen än för ciliefunktionen (Lehti & Sironen 2017). En sådan gen är Dynein Axonemal Heavy Chain 1 (*DNAH1*). Om en gen som har en avgörande roll i bildningen av både flagell och cilie är affekterad av mutation som orsakar en nedsatt funktion i dessa två, drabbas individen av en syndromsjukdom.

2.4. Avvikelser i spermaproduktionen

Hanlig fertilitet är komplex och trots att spermaanalys inte alltid ger svaret till fruktsamhetsproblem så är en utvärdering av spermiekvaliteten grundläggande vid utredningar av hanliga orsaker till fruktsamhetsproblematik.

2.4.1. Azoospermi och oligozoospermi

Azoospermi är ett av flera tillstånd som är förknippat med hanlig infertilitet (Guerra *et al.* 2019). Benämningen betyder att ejakulatet inte innehåller några spermier. Orsaken kan vara att testiklarna inte producerar några spermier överhuvudtaget p.g.a. störd spermatogenes s.k. icke obstruktiv azoospermi (non obstructive azoospermia, noa). En annan orsak kan vara att spermatogenesisen inte är störd men det finns en obstruktion eller förändring i spermiepassagen som gör att inga spermier kan passera ut tillsammans med ejakulatet s.k. obstruktiv azoospermi (oa). Oa kan vara förvärvad eller kongenital, vid den kongenitala varianten saknas sädesledarna.

När ejakulatet innehåller ett mycket litet antal spermier så benämns tillståndet som oligozoospermi (Meyers-Wallen 1991). Den vanligaste orsaken till oligozoospermi och noa hos människor är variation i karyotypen, där individen har t.ex. två X kromosomer, eller en mikrodeletion i Y-kromosomen. Ytterligare orsaker till medfödd oligozoospermi är ensidig segmentell aplasi av bitestikeln eller sädesledaren, vilket resulterar i total obstruktion av spermieproduktion från en testikel. Om aplasin endast är enkelsidig och den andra bitestikeln och sädesledaren är normal så kan hanen fortfarande vara fertil men kan ha nedsatt fruktsamhet.

Oligozoospermi kan även uppkomma sekundärt till en systemisk inflammation i kroppen.

2.4.2. Astenozoospermi/astenospermi och nekrozoospermi/nekrospermi

Astenozoospermi/astenospermi är ett tillstånd där en varierande andel spermier har en nedsatt motilitet (Nduwayo *et al.* 1995). Orsakerna till astenospermi kan vara metaboliska sjukdomar, strukturella abnormaliteter i spermiers strukturer eller genetiska avvikelser. Vid nekrozoospermi eller nekrospermi innehåller ejakulatet en hög andel döda och orörliga spermier. För att särskilja astenospermi från nekrospermi kan man färga in spermier, om de är döda kommer de då att färgas, eftersom membranet är nedbrutet och färgen kommer in urskillningslöst. Nekrospermi är en sällsynt orsak till infertilitet på män då prevalensen är ca 20-48 %.

Vid astenospermi kan affekterade spermier fortfarande fertilisera oocyten och kan därför användas vid *in vitro*-fertilisering som ex intracytoplasmisk spermieinjektion, ICSI hos människor, något som ej görs på hundar (England *et al.* 2010). Hos hund bedöms ärftligheten för faktorerna hög motilitet samt lågt totalt antal spermier som måttlig och individer drabbade av astenospermi bör därför inte användas i avel. Till följd av den måttliga arvbarheten för lågt totalt antal spermier så bedöms även antalet morfologiskt normala spermier i ett ejakulat ha måttlig arvbarhet. Vid en andrologisk undersökning hos hund bör >70 % av spermier ha en tydlig och kraftig rörlighet framåt för att spermiekvaliteten ska bedömas som normal (Barak & Baker 2016.)

2.4.3. Teratozoospermi/teratospermi

Teratozoospermi eller teratospermi karaktäriseras av spermier med en onormal morfologi som negativt påverkar spermiekvaliteten och individens fertilitet (Feldman 2004). Spermiedefekter kan indelas baserat på sitt ursprung. Primära defekter är relaterade till felaktig testikelfunktion medan sekundära defekter uppstår efter att spermier har lämnat testikeln. Den indelningen säger inget om effekten av de morfologiskt avvikande spermier på den hanliga fertiliteten. Denna ursprungsbaserade klassificering har också visat sig vara inkonsekvent, då vissa primära defekter kan uppkomma i bitestiklarna (Blom 1973). Därför föreslog Blom en ny indelning där spermieavvikelserna antingen är förknippade med en betydande negativ inverkan på hanlig fertilitet, så kallad ”major” defekter, eller är förknippade med en mindre effekt på hanlig fertilitet så, så kallade ”minor” defekter. En hög förekomst av major defekter är förknippat med nedsatt fertilitet eller sterilitet och beror troligen på onormala tillstånd i testiklarna eller bi-

testiklarna, eller ärftliga genetiska defekter. De mindre defekterna anses vara mindre viktiga för hanlig fertilitet, såvida de inte finns i en stor andel i ejakulatet.

Oettlé (1993) fann i sina studier att hundar med >60 % morfologiskt normala spermier (MNS) hade en betydlig högre dräktighetsstatistik jämfört med hundar med <60 % MNS. Således drogs slutsatsen att procentandelen under vilken fertiliteten påverkades negativt för hundar är 60 %. I jämförelse så bedöms tjurar som icke tillfredställande av användas inom avel med cut off-värden på < 70 % MNS, > 20 % huvuddefekter, eller båda (Menon *et al.* 2011).

I studier gjorda på hund har ett samband indikerats mellan stigande ålder och nedsatt spermiekvalitet (Tesi *et al.* 2018). Sambandet är inte helt klarlagt och man misstänker att det är många faktorer som inverkar som ex övervikt, degeneration av accessoriska könskörtlar och ackumulation av toxiska substanser. Studier av hundars fertilitet är få i jämförelse med människa och andra djurslag som nöt och häst, men (Hesser *et al.* 2017) utförde en omfattande studie på 39 hanhundar av rasen labrador retriever med avseende på fertilitet och kunde inte observera något samband mellan spermiekvalitet och fertilitet, trots att skillnader på spermiekvalitet noterades mellan åldersgrupper.

2.4.4. Kompensatoriska defekter och icke-kompensatoriska defekter

Spermieavvikelser kan klassificeras som antingen kompensatoriska eller icke kompensatoriska baserat på förmågan att kompensera för förekomst av avvikelser och uppnå optimal fertilitet genom att öka antalet spermier per ejakulat (Den Daas *et al.* 1998); Saacke *et al.* 2000). Icke-motila spermier och spermier med gravt avvikande morfologi förhindras av de honliga reproduktionsorganen från att nå platsen för befruktning. Resultaten kan bli ett otillräckligt antal spermier vid oocyten, och minskad fertilitet (Saacke *et al.* 1998). Den negativa påverkan av kompensatoriska spermiedefekter kan motverkas genom att öka antalet normala spermier i en artificiell inseminationsdos. Olika individer uppvisar olika maximala fertilitetsnivåer (Pace *et al.* 1981). Att öka antalet spermier övervinner inte de negativa effekterna av icke kompensatoriska spermiedefekter (Saacke 2008). Icke kompensatoriska spermiedefekter kommer sannolikt att identifieras som normala eller något oregelbundna under rutinmässiga laboratorieutvärderingar då dessa spermier oftast har ett helt normalt eller nästintill normalt utseende. Dessa spermier är ofta kapabla att nå platsen för befruktning och kan penetrera och aktivera oocyten, men misslyckas med att stödja zygotisk och embryonal utveckling.

2.5. MMAF (multipla morfologiska abnormala spermieflageller)

Multipla morfologiska abnormala spermieflageller (MMAF) är en specifik typ av astenoteratospermi, ett syndrom som rymmer samtliga typer av morfologiska abnormiteter av flagellen såsom till exempel korta och böjda flageller eller total avsaknad av flagellen (Wang *et al.* 2020). MMAF har en tydlig negativ inverkan på spermernas motilitet och orsakar således primär infertilitet hos män. Det är ännu inte klarlagt om MMAF är en fenotypisk variant av sjukdomen primär ciliär dyskinesi (PCD), en ärftlig defekt i motilitet hos cilier och flageller.

2.6. Genetisk variation

Fenotypisk variation mellan individer inom en art orsakas av en kombination av genetiska faktorer och miljöfaktorer (Brown 2002). Genetisk variation, skillnaden mellan individers genom, har i huvudsak sitt ursprung på grund av att enzymet DNA-polymeras introducerar i låg frekvens fel nukleotider vid replikationen. Dessutom påverkas mutationsfrekvensen av miljöfaktorer som t.ex. toxiner, UV-strålning och radioaktiv strålning. Vid meiosen uppkommer dessutom överkorsningar av det genetiska material som nedärvs från föräldrarna. De flesta egenskaper orsakas inte endast av en genvariant utan istället av en kombination av flera gener som samverkar (Li *et al.* 2013)

Mutagenes kallas processen där en individs genetiska kod förändras på grund av en mutation (Brown 2002). Mutationen kan uppkomma spontant, framförallt på grund av att enzymet DNA-polymeras introducerar fel nukleotider vid replikationen. En ytterligare orsak är att en ökad frekvens av mutationer kan induceras av mutagena ämnen. Mutagenes kan leda till cancer och ärftliga sjukdomar, men när mutationerna drabbar könscellerna och nedärvs också drivkraften för evolutionen. Mutationer kan ske storskaligt när de involverar kromosomstrukturerna, vid exempelvis amplifiering, duplikation, deletion, inversion och rearrangemang av regioner på kromosomer. Småskaliga mutationer involverar en eller ett fåtal nukleotider. När endast en nukleotid är involverad kallas mutationen för punktmutation. Punkt-mutationer kan ske så att en kvävebas byts ut mot en annan (bas substitution), läggs till (basinsertion) eller tas bort (basdeletion). Om mutationen sker i en proteinkodande del av genen kan förändringen antingen orsaka kodning för en ny aminosyra som leder till en ny proteinprodukt (missense-mutation), för samma aminosyra och således samma proteinprodukt (tyst mutation) eller ett stoppkodon som gör att proteinprodukten stoppas prematurt.

Om punktmutationen inte sker i multipel om tre kvävebaser motsvarande ett kodon, så kommer punktmutation att leda till att den öppna läsramen förskjuts och orsakar en så kallad "frameshift mutation" som oftast leder till att ett stoppkodon bildas ett antal kodon 3' om punktmutationen och ett förkortat protein med nedsatt eller utebliven funktion bildas (Brown 2002). När mutationer leder till att proteinet får en ny eller förbättrad funktion så kallas mutationen för "gain of function" och när mutationen leder till nedsatt eller utebliven proteinfunktion så kallas mutationen för "loss of function".

Det är av stor vikt att detektera mutationer i genomet för att diagnostisera individer som lider av genetiska sjukdomar. Diagnostiken kan göras exempelvis vid screening av hundar inom en ras för att detektera drabbade individer och ta ut dem ur avelsprogrammet. Idag finns det fler än 300 kända sjukdomsframkallande mutationer hos hund (OMIA u.å.). Genetiska tester kan användas för att detektera sjukdomsassocierade genvarianter och PCR-tester används ofta för att detektera dessa mutationer (Bell 1989). Genom att amplifiera en region på genomet som kan muteras så erhålls flera kopior av regionen som kan analyseras vidare. Den amplifierade regionen kan sedan jämföras mot en referenssekvens för att utvärdera om individen har en förändring i DNA sekvensen.

2.6.1. Kandidatgener

Kandidatgen-approach är en typ av genetisk studie där man undersöker om genetisk variation föreligger i en gen som har bedömts att sannolikt vara inblandad i den fenotyp som studeras (NHGRI u.å.). Ofta väljs genen ut baserat på att den har visat sig vara muterad i en annan art eller i en annan ras. Innan en studie startar har en utvärdering av nedärvningsmönstret utförts som säkerställt att risken att utveckla fenotypen påverkas av genetiska faktorer och hur den eller dessa nedärvs och att en eller flera mutationer orsakar den fenotyp som undersöks. Man har således en hypotes att en individ eller en grupp med en fenotyp kan vara muterade i en viss gen.

Då spermerna från berner sennenhundar som ingick i projektet uppvisade en fenotyp med förhöjt antal svansdefekter i jämförelse med normalvärdet för hundar så begränsade vi undersökningen till gener med effekt på endast flageller. I dagsläget är forskningen kring genetiken bakom svansdefekter hos hund ofullständigt kartlagd. Genvarianter hos minst 18 olika gener har beskrivits som associerade med MMAF hos människa och modellorganismer, ffa möss. Exempel på några av dessa gener är *DNAH1* (dynein heavv chain 1), *CFAP43/44* (cilia and flagella associated protein 43/44), *AK7* (adenylate kinsase 7), *QRICH2* (glutamine rich 2), *FSIP2* (fibrous sheath interacting protein 2), *CFAP69* (cilia and flagella associated protein 69), *CFAP65* (cilia and flagella associated protein 65), *CFAP91*

(cilia and flagella associated protein 91) och *ARMC2* (armadillo repeat containing 2) (Khan *et al.* 2021). Är *CFAP* generna påverkade (*CFAP43*, *CFAP44* och *CFAP69*) leder det till korta svansar eller total avsaknad av svansar, medan påverkan på *FSIP2* och *ARMC2* gör att svansen blir ihoprullad (Coutton *et al.* 2019).

2.6.2. *DNAH1*

Dynein axonemal heavy chain 1 (*DNAH1*) är som namnet syftar på en gen som kodar för en tung kedja som är kopplad till de inre dyneinarmarna i axonemet och uttrycks i testiklarna (Ben Khelifa *et al.* 2014). Trots att *DNAH1* också uttrycks i andra cilier som de i luftvägarna, var infertilitet det enda symptomet som observerades hos drabbade försökspersoner, vilket tyder på att *DNAH1*-funktionen i övriga cilier inte är lika kritisk som i spermieflagellen. Hanar från möss där *DNAH1*-genen var inaktiverad, s.k. knockoutmöss som var homozygota för en deletion av genen, kunde inte befrukta honor via naturlig väg då spermier inte kunde förflytta sig från depositionsstället i vagina och kunde därför inte befrukta äggen (Neesen *et al.* 2001). I den studien såg man att spermier från de homozygot knockade mössen hade ca 50 % nedsatt lateral amplitud av flagellen men ca 35 % ökad slagfrekvens. Med IVF och ICSI kan äggen dock befruktas trots denna mutation eftersom man då transporterar en enda spermie in i äggets cytoplasma via injektion. Denna mutation kan klassificeras som icke kompensatorisk då samtliga spermier har kraftigt nedsatt motilitet.

Mutationer i *DNAH1*-genen hos män diagnostiserade med infertilitet har beskrivits i flera studier (Ben Khelifa *et al.* 2014; Sha *et al.* 2017; Tang *et al.* 2017; Wang *et al.* 2017). Mutationerna har orsakat en MMAF-fenotyp på spermier. Mutationer har lokaliserats till flera områden i genen men ett flertal orelaterade individer var muterade i exon 73 (Sha *et al.* 2017; Tang *et al.* 2017; Wang *et al.* 2017). Denna mutation var en deletion av två baser (C och T) på position 11726 och 11727. Deletionen orsakar en frame-shiftmutation och leder till ett för tidigt stoppkodon i aminosyrasekvensen och proteinet blir ej komplett och därför förlorar det sin normala funktion. Individerna i de tidigare nämnda studierna var både homozygota och heterozygota för mutationen i exon 73. *DNAH1* mRNA har detekterats i spermier från människa och möss (Ben Khelifa *et al.* 2014; Khan *et al.* 2021b).

2.6.3. *ARMC2*

Coutton *et al.* (2019) visade att *ARMC2*-genen kodar för ett protein på 867 aminosyror. Genom Realtids-kvantitativ PCR (RT-qPCR) fann Coutton *et al.* (2019) signifikant högre uttryck av *ARMC2* mRNA i testiklarna än i övriga vävnader hos människa.

Hos 5 av 168 män med primär infertilitet och MMAF, identifierades homozygositet för mutationer i *ARMC2*-genen som inte hittades i kontroller eller i offentliga variantdatabaser (Coutton *et al.* 2019). Immunfluorescensstudier i human- och musspermier visade frånvaro av de axonemala proteinerna SPAG6 respektive Spef2, vilket tyder på att *ARMC2* kan vara specifikt involverad i sammansättningen eller stabiliteten av det axonemala centrala parkomplexet. Med hjälp av CRISPR/Cas9-teknik genererades *ARMC2* homozygot knockade -/- möss. Hanarna var infertila, medan honorna var fertila. Analys av epididymala spermier från män med mutationen visade att 100 % hade korta, tjocka och/eller lindade flageller, associerade med fullständig motilitetsbrist. Immunfluorescensanalys av axonemet visade total frånvaro av SPEF2 och SPAG6, två markörer för centralparkomplexet.

2.7. Polymerase Chain Reaction (PCR)

PCR är en metod som amplifierar en specifik region av båda DNA-strängarna, och som kan användas vid en kandidatgenapproach. En grundläggande PCR-uppsättning kräver flera komponenter och reagens enligt Brown (2002):

- En DNA-mall som innehåller den DNA-målregion som ska amplifieras
- Ett värmeokänsligt DNA-polymeras; ett enzym som polymeriserar nya DNA-strängar.
- Två DNA-primrar på ca. 20-25 nukleotider som är komplementära till var och en av sens- och antisenssträngarna i regionen man vill amplifiera. Specifika primrar som är komplementära till DNA-målregionen väljs ut i förväg.
- Deoxinukleosidtrifosfater eller dNTP (nukleotider som innehåller trifosfatgrupper), byggstenarna från vilka DNA-polymeraset syntetiserar en ny DNA-sträng.
- En buffertlösning som tillhandahåller en lämplig kemisk miljö för optimal aktivitet och stabilitet för DNA-polymeraset.

Vid PCR så genomgår prover flera upprepade termala cykler som delas in i tre steg enligt Lorenz (2012):

Denaturering: Det första steget består av att värma reaktionskammaren till 94–96 °C i 20–30 sekunder. Detta orsakar denaturering av den dubbelsträngade DNA molekylen genom att bryta vätebindningarna mellan komplementära baser, vilket ger två enkelsträngade DNA-molekyler.

Hybridisering (annealing): I nästa steg sänks reaktionstemperaturen till 50–65 °C, vilket möjliggör hybridisering av primrarna till de enkelsträngade DNA-mole-

kylerna. Två olika primrar ingår typiskt i reaktionsblandningen: en för vart och ett av de två enkelsträngade komplementen som innehåller målregionen. Primrarna är själva enkelsträngade sekvenser, med en längd på ca 20-25 baser. Avståndet mellan den primer som är komplementär till den kodande respektive den icke kodande DNA strängen avgör längden på den amplifierade målregionen. Primersekvens, salthalt och temperatur är de faktorer som är avgörande för att få en specifik annealing. Det är avgörande att bestämma en lämplig temperatur för hybridiseringssteget eftersom effektivitet och specificitet påverkas starkt av temperaturen. Denna temperatur måste vara tillräckligt låg för att möjliggöra hybridisering av primern till strängen, men tillräckligt hög för att hybridiseringen ska vara specifik, dvs. primern bör binda endast till en perfekt komplementär del av strängen, och ingen annanstans i DNA som skall amplifieras. Om temperaturen är för låg kan primern binda felaktigt. Om den är för hög kanske primern inte binder alls.

Förlängning (extension): I detta steg syntetiserar det värmekänsliga DNA-polymeraset en ny DNA-sträng som är komplementär till DNA-mallsträngen genom att lägga till fria dNTP från reaktionsblandningen som är komplementär till mallen i 5'-till-3'-riktningen. Under optimala förhållanden (dvs om det inte finns några begränsningar på grund av begränsande substrat eller reagens), fördubblas antalet DNA-målsekvenser vid varje förlängningssteg.

Processerna för denaturering, hybridisering och förlängning utgör en enda cykel. Flera cykler krävs för att amplifiera DNA-målet till miljontals kopior. Formeln som används för att beräkna antalet DNA-kopior som bildas efter ett givet antal cykler är 2^n , där n är antalet cykler. Således resulterar en reaktionsuppsättning med 30 cykler 2^{30} eller 1 073 741 824 kopior av den ursprungliga dubbelsträngade DNA-målregionen.

2.7.1. Primers

PCR kräver två olika primrar som binder till början och slutet av den DNA-sekvens som ska amplifieras (Brown 2002). Dessa två primrar måste ha liknande smältpunkt eftersom båda primrarna måste binda till DNA-mallen lika effektivt under PCR-reaktionen. För att undvika amplifiering av en felaktig DNA sekvens måste primrarna utformas så att de bara kan binda en utvald sekvens i DNA-mallen. Primrarna ska inte heller ha förmågan att lätt binda till sig själva eftersom detta kan förhindra att primrarna binder till DNA-templetet och istället bildar primer-dimer, de ska inte ha s.k. intern komplementaritet.

För att optimera resultatet vid PCR så bör primerparet utformas enligt vissa kriterier (Lorenz 2012). För att förhindra sekundär strukturbildning rekommenderas en

primer-längd på 18-30 nukleotider och en GC-halt på 40-60 %, då G och C kvävebaserna binder till varandra med tre vätebindningar och den bindningen är stabilare än de två vätebindningarna mellan A och T kvävebaserna.

Primerparen bör ha en hybridiseringstemperatur så nära varandra som möjligt, helst inom 3 °C. Repetitioner av fyra eller fler av samma nukleotid i följd ska undvikas (Lorenz 2012).

2.8. RNA

För att kunna utföra kvantifieringen av genuttryck som påverkar spermiesvansen med hjälp av Realtids-PCR och jämföra uttrycken av dessa mot en s.k. ”house-keeping” gen för att återspegla den relativa mängden av dessa gener (Wang *et al.* 2004), behöver man kunna preparera RNA från spermier. I studier av humana spermier har förhöjda nivåer ribonukleas (RNas) i seminalplasman påvisats hos män med allvarlig oligozoospermi och azoospermi (Biswas & Stedronska 1980).

Någon information om preparation av RNA från hundsperma har inte hittats, endast studier från människa och mus. I arbetets andra del var därför målet att försöka preparera RNA från färsk och fryst hundsperma, utföra kvalitetskontroll och utvärdera om det går att preparera RNA av så pass god kvalitet att det framöver går att utföra reverse transcription-PCR (RT-PCR) på RNA från hundsperma.

3. Material och metod

Ingående hundar valdes ut bland de totalt 65 berner sennen som rekryterats under 2020, och där det fanns sperma och blod sparad. Hundarna hade undersökts kliniskt och blod- och spermaprover var tagna. Alla hundarna bedömdes som friska och uppvisade inga sjukdomstecken enligt sina ägare vid tidpunkten för deltagandet i studien. Alla prover var tagna av veterinärer med AI-behörighet, med etiskt godkännande (Dnr: 5.8.18-17395/2018). Alla djurägare hade givit sitt samtycke i form av medgivande blanketter.

Därutöver samlades sperma från en undervisningshund.

3.1.1. Utvalda hundar till kandidatgenapproach

I denna studie analyserades totalt åtta hundar av rasen berner sennen, samma åtta individer som analyserades i Anna Snells examensarbete (Snell 2022). Anledningarna till att dessa valdes var dels för att de hade en varierande fenotyp vad gäller spermiekvalitet, dels för att undersöka om det går att amplifiera exon 73 i *DNAH1* genen med andra primers. Sju av hundarna var hanar, av dessa hade fyra stycken (hund B, D, F & G) en andel MNS som var lägre än 60 %. Tre av de sju hanarna hade en andel svansdefekter som översteg det bestämda cutoff värdet på 20 %, dessa var hund B, E & G. Dessa hundar hade motsvarande 34,5 %, 77,5 % & 21,6 % spermier med defekta svansar (enkel svansböjning, ihoprullade under huvudet och dubbelvikta spermier). Den åttonde hunden var en tik av samma ras (Tabell 1).

Blodprov togs från tiken då denna var intressant ur genetisk synpunkt då hon har haft en kull med valpar i Sverige, där fadern samt flera av valparna i kullen deltagit i studien.

Tabell 1. Information gällande, kod, kön, MNS, vanligast förekommande spermiedefekter, andel svansdefekter och bedömning gällande fruktsamhet för de åtta utvalda berner sennenhundarna i studiens kandidatgenapproach del.

Kod	Kön	Totalantal spermier (miljarder)	MNS (%)	Spermiedefekter, vanligast förekommande	Andel svansdefekter (%)	Bedömning gällande fruktsamhet
S	Tik	-	-	-	-	-
B	Hane	1,01	46-55	Svansdefekter	34,5	Något nedsatt
C	Hane	1,73	80-84	Inga	5	God
D	Hane	1,23	34-42	Huvuddefekter och proximala droppar	13,5	Något nedsatt
E	Hane	1,35	7-13	Svansdefekter	77,5	Nedsatt
F	Hane	1,09	81-82	Inga	7	God
G	Hane	0,07	23-33	Omogna spermier och svansdefekter	21,6	Nedsatt
H	Hane	0,49	80-84	Inga specifika	9,5	God

3.1.2. Provinsamling

Spermaprov

För berner sennenhundarna användes tidigare insamlade prover som förvarats frysta.

Blodprov

För de ingående berner sennenhundarna fanns frysta blodkroppar sparade i -80°C , från prov tagna i EDTA-rör.

3.1.3. Spermaanalyzer

Sperman från berner sennenhundarna var analyserad avseende totalantal spermier, detaljerad morfologisk undersökning av spermieavvikelser och motilitet.

3.1.4. Utvalda kandidatgener

I ett tidigare, examensarbete (Snell 2022) undersöktes sekvensprodukterna av Sangersekvensering av generna *DNAH1* och *SFXN5* i en kandidatgenapproach. I det arbetet gick det inte att analysera *DNAH1* genen för att PCR-produkten inte var av tillräckligt god kvalitet. Data från *SFXN5* produkten var av god kvalitet, dock uppvisade ingen av hundarna oavsett spermimorfologi eller släktskap genetisk variation i denna lokalisation. I detta arbete undersöktes *DNAH1*-genen med andra DNA primers samt analyserades fem olika områden på *ARMC2*-genen som

beskrivits orsaka svansdefekter och nedsatt spermiekvalitet hos människa och möss (Coutton *et al.* 2019).

3.1.5. Exklusionskriterier

Nedsatt spermiekvalitet kan bero på en mutation i någon eller några av de ca tvåtusen gener som är inblandade i spermatogenesisen, som man såg i en studie på mus (Schultz *et al.* 2003). Eftersom hundarna i studien inte uppvisade några kliniska tecken på sjukdom valdes gener involverade i syndromiska sjukdomar bort. Exempel på några av dessa är gener involverade i Bardet–Biedls syndrom och PCD (Mäkeläinen *et al.* 2020). Båda dessa syndrom orsakar en nedsatt/utebliven funktion i cilierna i samtliga av kroppens vävnader, vilket yttrar sig främst i form av luftvägssymptom då cilier återfinns i bl.a. näshålan, bihålorna, farynx, trakea, bronker och bronkioli (Forsyth & Gunay-Aygun 2003 updated 2020).

3.1.6. Preparation av genomiskt DNA

Blodkropparna från EDTA-rören användes för att preparera genomiskt DNA med hjälp av en QiaSymphony™ SP. 1 µl provmaterial per individ från de åtta individerna pipetterades till en Nanofisher™ NanoDrop™ 2000/2000c spektrofotometer för att mäta koncentrationerna av genomiskt DNA i proverna inför alikvotering. Därefter tillsattes nukleasfritt vatten till proverna så att man erhöll den önskade koncentrationen av genomiskt DNA, som var 4 ng/µl.

3.1.7. Sanger-sekvensering

Forward och reverse primers konstruerades via hemsidan Primer3Plus (Wageningen University Bioinformatics u.å.; Untergasser *et al.* 2007), för att kunna amplifiera områdena av intresse i *DNAH1* och *ARMC2*. Totalt utformades ett primerpar för *DNAH1* och fem stycken primerpar för fem separata områden av intresse på *ARMC2* genen. Primerparen konstruerades för att bilda produkter som täcker hela exonet av intresse samt en del av de intilliggande intronerna. Primerparen kontrollerades sedan via ett in-silico PCR-test (Kent u.å.) för att se om primerparen fäster in på korrekt områden i den genetiska koden.

DNAH1:

Forward Primer: CAGCACCTGAGGGTGTTCAG

Reverse Primer: AGGCTAGGGTGGGGTGCT

ARMC2_1:

Forward Primer: TGCTGCTTTACTCTCTTTGCT

Reverse Primer: ACTAGACCAGAGGAAAGAAAACTT

ARMC2_2:

Forward Primer: GTACAGCTGGGAACCCTGAG

Reverse Primer: GCTCCACGCTTTGACACTTA

ARMC2_3:

Forward Primer: TCAAGGAGATTCTGGTCTAATAACG

Reverse Primer: TCTGATAAAACTCTCAGACTTACAGGA

ARMC2_4:

Forward Primer: TGCCTTAAAATGTCTCTCTCCA

Reverse Primer: GGCTGTAAGCAACCACCTGT

ARMC2_5:

Forward Primer: GACACAGAAACTCACGCCAAT

Reverse Primer: CCCTCAGATTTCAAAGGATGA

De sex primerparen beställdes från företaget TAG Copenhagen som dessutom konstruerade och fäste M13 svansar till forward respektive reverse:

(5'-TGTA AACGACGGCCAGT-3')

(5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3').

PCR-sekvenseringarna utfördes enligt manualen för BigDye® Direct Cycle Sequencing Kit (ThermoFisher Scientific u.å.) i en GeneAmp PCR System 9700. Processen utfördes i tre delsteg. I det första utfördes PCR-amplifiering, i det andra utfördes cykel sekvensering och i det sista renades produkterna från kontamination. Fyra nanogram genomiskt DNA tillsattes i 10 µl amplifikationslösning med en annealing-temperatur på 62°C. Cykelsekvensering utfördes i en ABI 3500XL DNA Analyser. Sekvenserna analyserades i dataprogrammen Chromas och BioEdit.

3.1.8. Studie 2 RNA extraktion

I den andra studien, RNA-extraktion, jämförde vi RNA-extraktion från färsk respektive fryst sperma med och utan tillsats av RNAs inhibitor. Färsk sperma samlades in från en beagle. Motiliteten bedömdes subjektivt i mikroskop och var 80 % (Tabell 2).

Två frysta spermaprover analyserades, det första var från en berner sennenhund (B1) som förvarats i -80°C i ca 14 månader. Det andra provet var från beaglen, för denna analys användes spermapelleten som förvarats i -80°C i totalt 8 dygn. (Tabell 2).

Tabell 2. Information över sperman från berner sennenhunden (B1) och beaglen som ingick i RNA extraktionsdelen av studien.

Hund	Kön	MNS (%)	Totalantal spermier (miljarder)	Motilitet (%)	Svansdefekter (%)	Bedömning gällande fruktsamhet
B1	Hane	50-59	1,35	-	16,3	Förmodligen nedsatt
Beagle	Hane	72	0,65	80	3,3	Normal

3.1.9. Spermahantering inför RNA-analys

Sperman från en beagle delades upp i två lika delar, 1,5 ml, i varsitt provrör.

En del transporterades direkt till laboratoriet för RNA-extraktion. Resten av sperman centrifugerades i 3000rpm i 10 min, supernatanten sögs av och pelleten frystes direkt i -80°C för senare extraktion.

3.1.10. RNA extraktion från färsk och fryst sperma

RNA extraherades från ~1,5 ml färsk sperma från beaglen. För extraktionen användes Qiagen RNeasy Plus Universal Kit. De olika stegen i Quick-Start protokollet som medföljde kitet utfördes.

Två lika delar, 500 µl sperma delades upp i två stycken 1,5 ml eppendorfrör. Båda proverna bedömdes som homogeniserade och bearbetades därför inte i en TissueRaptor, TissueLyser LT eller TissueLyser II som per protokollet. Till det ena provet (R+) tillsattes 2 µl Protector RNase Inhibitor 40U/µl. Därefter gjordes inga avvikelser från protokollet.

De frysta proverna fick tina i rumstemperatur, därefter tillsattes 0,9 ml TRIS-buffert (pH 7,0) till vardera prov. Därefter upprepades samma procedur som för de fräska spermaproverna.

3.1.11. Förvaring och kvalitetskontroll av RNA prover

Proverna med extraherat RNA transporterades nedkylda på is till frysförvaring i -80°C. Efter sex dagar i frysförvaring togs proverna ut för att utföra en kvalitetskontroll i en Agilent TapeStation för att erhålla ett RNA integrity value (RIN).

3.1.12. Databaser

NCBI (u.å.) användes som databas för att få fram sekvensdata för gener hos människa (*homo sapiens*) och hund (*canis lupus familiaris*). OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man u.å.) användes för utökad information gällande genfunktion och information från human- och djurstudier för generna som undersöktes i arbetet. Primer3plus (Wageningen University Bioinformatics u.å.) användes för att konstruera primers med önskvärda egenskaper för de sekvenser vi ville amplifiera. Genomes UCSC användes för att konfirmera primers via deras in silico PCR-dataprogram (Kent u.å.). NCBI Blast-verktyget (NCBI-BLAST u.å.) användes för att konfirmera att PCR-produkterna från Sangersekvenseringen kom från korrekta exoner och gener.

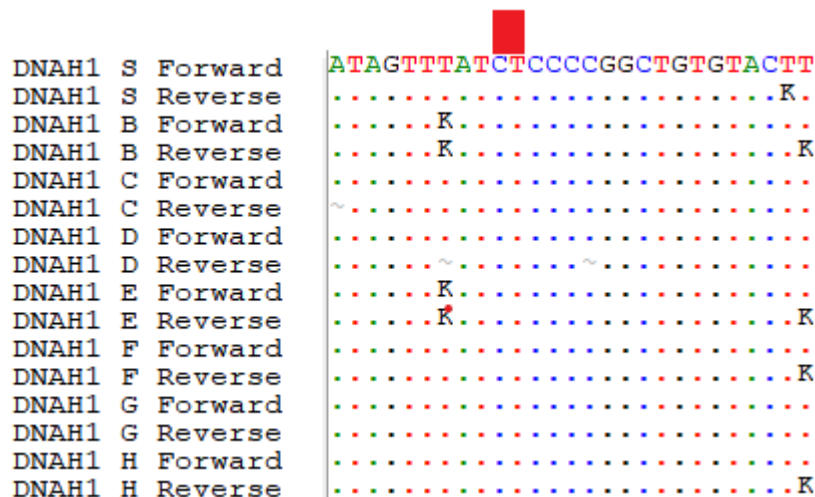
4. Resultat

4.1.1. Sekvensdata från *DNAH1* genen

Samtliga produkter från forward och reverse primern var av god kvalitet och konfirmerades härröra från exon 73 på *DNAH1* genen tillhörande individer S, B, C, D, E, F, G och H (figur 1). Vid analys av erhållen sekvens-data kunde man inte finna den mutationen i exon 73 på *DNAH1* genen som Sha *et al.* (2017) fann hos nio människor som diagnostiserats med astenozoospermi och MMAF. Denna mutation har orsakat ramförskjutning på grund av en deletion av kvävebaserna C&T vid position c.11726_11727.



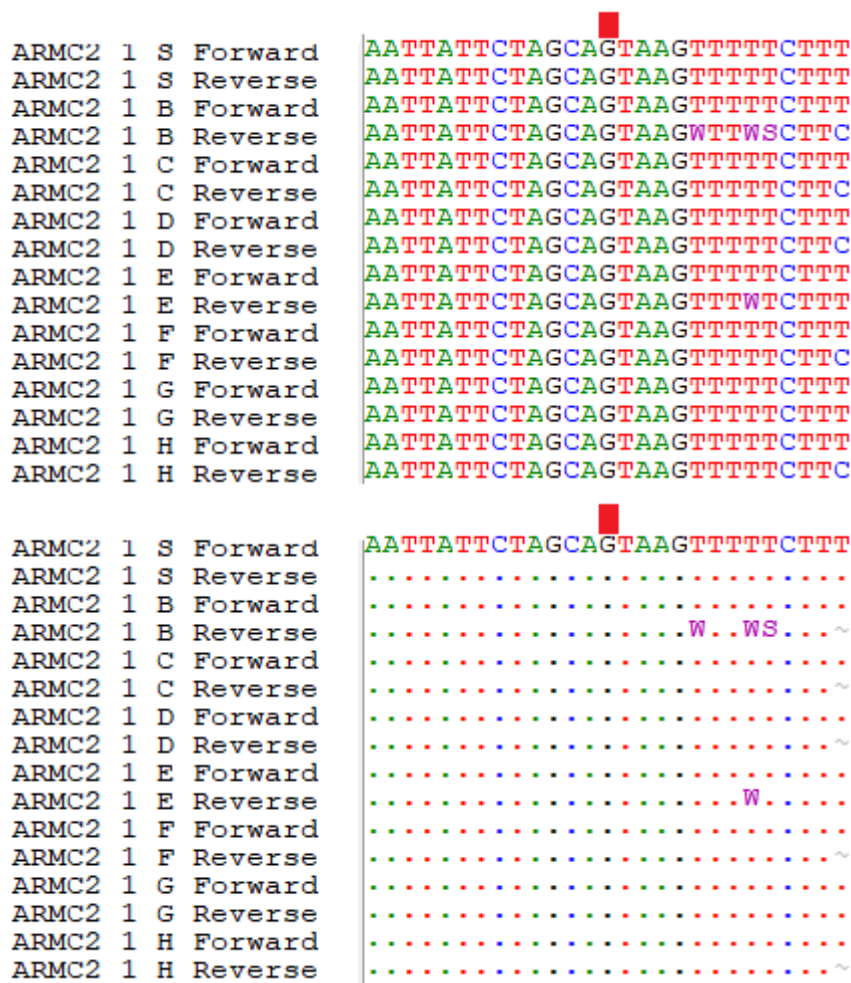
```
DNAH1 S Forward ATAGTTTATCTCCCCGGCTGTGTACTT
DNAH1 S Reverse ATAGTTTATCTCCCCGGCTGTGTACKT
DNAH1 B Forward ATAGTTKATCTCCCCGGCTGTGTACTT
DNAH1 B Reverse ATAGTTKATCTCCCCGGCTGTGTACTK
DNAH1 C Forward ATAGTTTATCTCCCCGGCTGTGTACTT
DNAH1 C Reverse ~TAGTTTATCTCCCCGGCTGTGTACTT
DNAH1 D Forward ATAGTTTATCTCCCCGGCTGTGTACTT
DNAH1 D Reverse ATAGTT~ATCTCCC~GGCTGTGTACTT
DNAH1 E Forward ATAGTTKATCTCCCCGGCTGTGTACTT
DNAH1 E Reverse ATAGTTKATCTCCCCGGCTGTGTACTK
DNAH1 F Forward ATAGTTTATCTCCCCGGCTGTGTACTT
DNAH1 F Reverse ATAGTTTATCTCCCCGGCTGTGTACTK
DNAH1 G Forward ATAGTTTATCTCCCCGGCTGTGTACTT
DNAH1 G Reverse ATAGTTTATCTCCCCGGCTGTGTACTT
DNAH1 H Forward ATAGTTTATCTCCCCGGCTGTGTACTT
DNAH1 H Reverse ATAGTTTATCTCCCCGGCTGTGTACTK
```



Figur 1. Sekvensdata från forward och reverseprimer från de åtta utvalda individerna (S, B, C, D, E, F, G och H) i exon 73 på DNAH1 genen. Proverna DNAH1_S_Forward och DNAH1_S_Reverse är två prover från samma individ, detsamma gäller för följande prover till respektive individ. Markerat med två röda markeringar är CT basen som Sha et al. (2017) beskrivit orsakat en frameshift mutation när den deleterats. På vissa positioner förekommer degenererade baser (wobbles) R, W, M, Y, S eller K. Varje wobble motsvarar 2 möjliga baser, där $R = A+G$, $W = A+T$, $M = A+C$, $Y = C+T$, $S = C+G$, $K = G+T$.

4.1.2. Sekvensdata från exon 8 på ARMC2 genen

Vid PCR Sanger-sekvensering erhöles totalt 16 stycken produkter, en från forward primern och en från reverse primer från de totalt åtta individerna som analyserades. Samtliga produkter var av god kvalitet och konfirmerades härröra från exon 8 på ARMC2 genen (figur 2). Vid analys av sekvensdata kunde inte den mutation påvisas som Coutton *et al.* (2019) fann i en individ som uppvisade astenospermi i deras studie. Den individen var drabbad av en splitsningsmutation på grund av bas-substitution G>A i position c.1023+1 som resulterade i att exon 8 hoppas över, vilket orsakar en förskjutning i läsramen och introducerar ett för tidigt stoppkodon. Samtliga undersökta individer var homozygota i denna region på genen.



Figur 2. Sekvensdata från forward och reverseprimer från de åtta utvalda individerna (S, B, C, D, E, F, G och H) i exon 8 på ARMC2 genen. Proverna ARMC_2_1_S_Forward och ARMC_2_1_S_Reverse är två prover från samma individ, detsamma gäller för följande prover till respektive individ. Markerat med en röd flagga är G basen som Coutton *et al.* (2019) beskrivit substitueras mot en Adenin kvävebas och introducerar ett för tidigt stoppkodon. På vissa positioner förekommer degenererade baser (wobbles) R, W, M, Y, S eller K. Varje wobble motsvarar 2 möjliga baser, där $R = A+G$, $W = A+T$, $M = A+C$, $Y = C+T$, $S = C+G$, $K = G+T$.

4.1.3. Sekvensdata från exon 16 på ARMC2 genen

Vid PCR sekvensering erhöles totalt 16 stycken produkter, en från forward primern och en från reverse primern från de totalt åtta individerna som analyserades. Samtliga produkter var av god kvalitet och kunde konfirmeras härröra från exon 16 på ARMC2 genen (figur 3). Vid analys av sekvensdata var samtliga undersökta individer homozygota för T i den position på genen som Coutton *et al.* (2019) fann hos en man som uppvisade astenospermi. Den individen var drabbad av en missensmutation i exon 16 på position c.2279 där ett T>A. Inga andra mutationer kunde påvisas i detta exon hos berber sennen.

```

ARMC2 2 S Forward AAAGAAGGAGGTGGCATTAAAAAGTAA
ARMC2 2 S Reverse AAAGAAGGMGGTRGCATTAAAAAGTRA
ARMC2 2 B Forward AAAGAAGGAGGTGGCATTAAAAAGTAA
ARMC2 2 B Reverse AAAGAAGGAGGTGGCATTAAAAAGTAA
ARMC2 2 C Forward AAAGAAGGAGGTGGCATTAAAAAGTAA
ARMC2 2 C Reverse AAAGAAGGAGGTGGCATTAAAAAGTAA
ARMC2 2 D Forward AAAGAAGGAGGTGGCATTAAAAAGTAA
ARMC2 2 D Reverse AAAGAAGGAGGTGGCATTAAAAARMMA
ARMC2 2 E Forward AAAGAAGGAGGTGGCATTAAAAAGTAA
ARMC2 2 E Reverse AAAGAAGGAGGTGGCATTAAAAAGTAA
ARMC2 2 F Forward AAAGAAGGAGGTGGCATTAAAAAGTAA
ARMC2 2 F Reverse AAAGAAGGAGGTGGCATTAAAAAGTAA
ARMC2 2 G Forward AAAGAAGGAGGTGGCATTAAAAAGTAA
ARMC2 2 G Reverse AAAGAAGGAGGTGGCATTAAAAAGTWR
ARMC2 2 H Forward AAAGAAGGAGGTGGCATTAAAAAGTAA
ARMC2 2 H Reverse AAAGAAGGAGGTGGCATTAAAAAGTAA

ARMC2 2 S Forward AAAGAAGGAGGTGGCATTAAAAAGTAA
ARMC2 2 S Reverse .....M...R.....R.
ARMC2 2 B Forward .....
ARMC2 2 B Reverse .....
ARMC2 2 C Forward .....
ARMC2 2 C Reverse .....
ARMC2 2 D Forward .....
ARMC2 2 D Reverse .....RM.
ARMC2 2 E Forward .....
ARMC2 2 E Reverse .....
ARMC2 2 F Forward .....
ARMC2 2 F Reverse .....
ARMC2 2 G Forward .....
ARMC2 2 G Reverse .....WR
ARMC2 2 H Forward .....
ARMC2 2 H Reverse .....

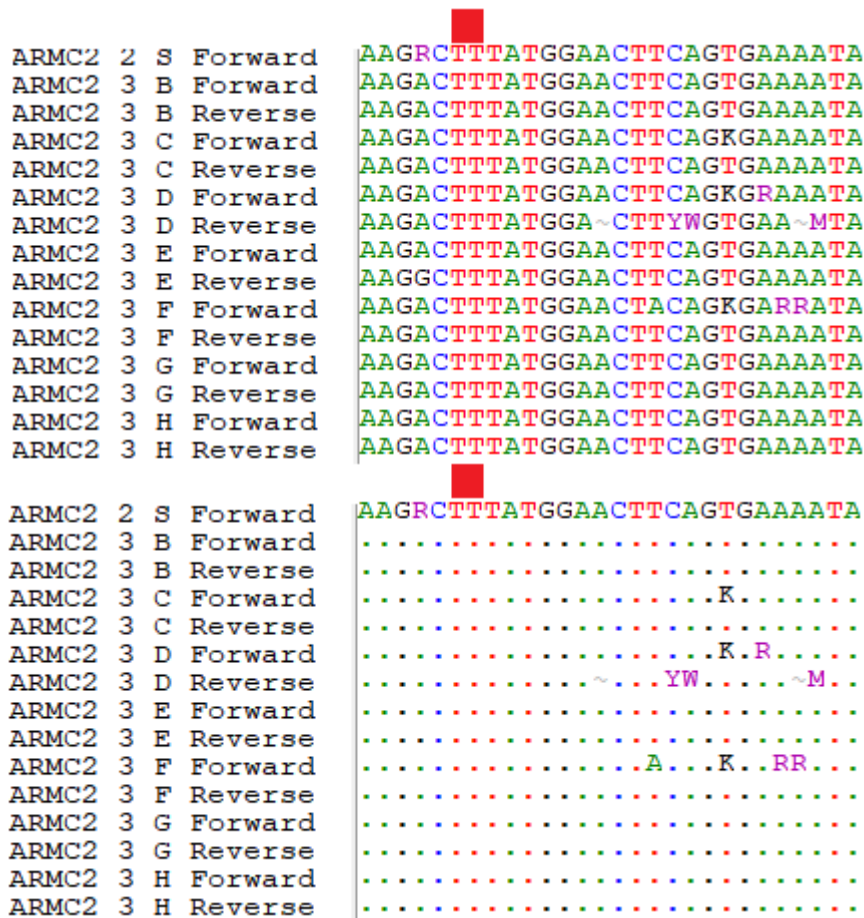
```

Figur 3. Sekvensdata från forward och reverseprimers från de åtta utvalda individerna (S, B, C, D, E, F, G och H) i exon 16 på *ARMC2* genen. Proverna *ARMC2_2_S_Forward* och *ARMC2_2_S_Reverse* är två prover från samma individ, detsamma gäller för följande prover till respektive individ. Markerat med en röd flagga är T basen som Coutton *et al.* (2019) beskrivit substitueras mot en adenin kvävebas och orsakar en missensemutation. På vissa positioner förekommer degenererade baser (wobbles) R, W, M, Y, S eller K. Varje wobble motsvarar 2 möjliga baser, där $R = A+G$, $W = A+T$, $M = A+C$, $Y = C+T$, $S = C+G$, $K = G+T$.

4.1.4. Sekvensdata från exon 17 på *ARMC2* genen

Vid PCR-sekvensering erhöles totalt 15 stycken användbara produkter, en från forward primern och en från reverse primern från de totalt sju individerna, och en forward primer produkt från den åttonde individen. Samtliga produkter var av god kvalitet och kunde konfirmeras härröra från exon 17 i *ARMC2* genen (figur 4). Data från en av de analyserade individerna gav inte någon sekvens överhuvudtaget, detta var data från reverse primern (*ARMC2_2_S_Reverse*). Vid analys av sekvensdata kunde man inte finna den mutationen som Coutton *et al.* (2019) fann i en individ som uppvisade astenospermi. Den individen var drabbad av en deletion av två kvävebaser TT som introducerade ett för tidigt stoppkodon på grund av en förskjutning av läsramen Sju av åtta individer (samtliga berner sennen hanhundar,

B-H) var homozygota i denna region på genen (markerat med flagga i bilden nedan) och den åttonde (individ S, berner sennentiken var heterozygot).

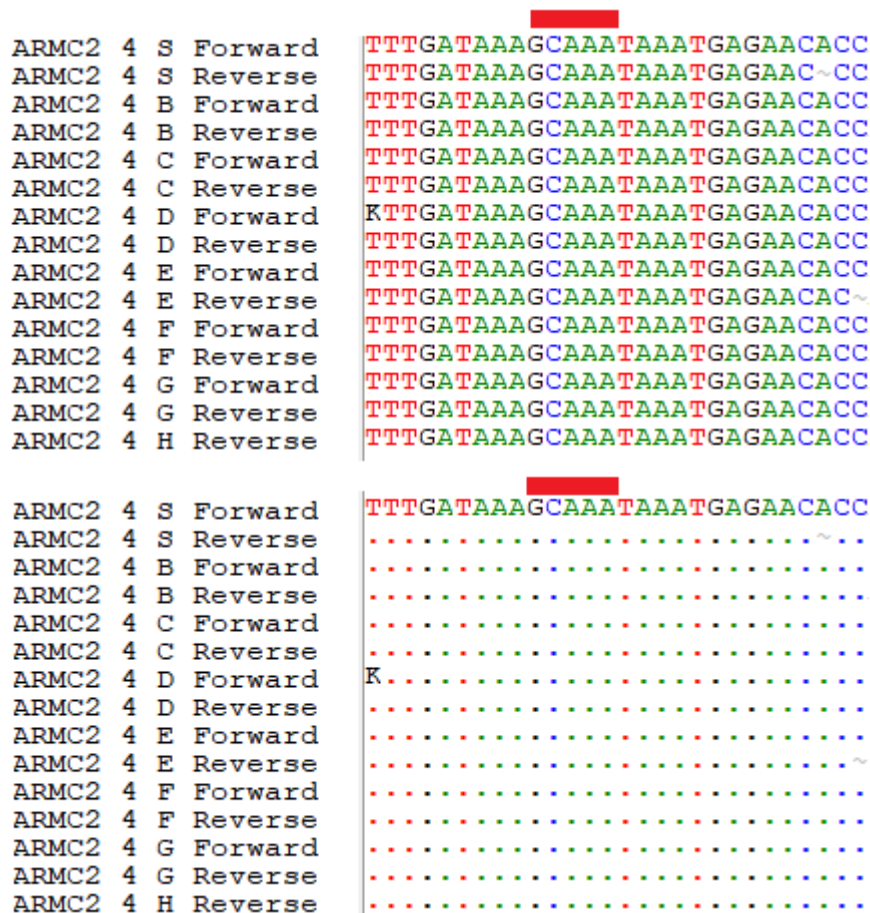


Figur 4. Sekvensdata från forward och reverseprimer från de åtta utvalda individerna (S, B, C, D, E, F, G och H) i exon 17 på ARMC2 genen. Proverna ARMC_2_3_S_Forward och ARMC2_3_S_Reverse är två prover från samma individ, detsamma gäller för följande prover till respektive individ. Markerat med två röda flaggor är två efterföljande tymin baser som Coutton *et al.* (2019) beskrivit deleterats och orsakat en läsramsförskjutning. På vissa positioner förekommer degenererade baser (wobbles) R, W, M, Y, S eller K. Varje wobble motsvarar 2 möjliga baser, där $R = A+G$, $W = A+T$, $M = A+C$, $Y = C+T$, $S = C+G$, $K = G+T$.

4.1.5. Sekvensdata från exon 10 på ARMC2 genen

Vid PCR-sekvensering erhöles totalt 15 användbara produkter, en från forward primern och en från reverse primer från sju individer, och en reverse primer produkt från den åttonde individen (ARMC2_4_H_R). Samtliga produkter var av god kvalitet och kunde konfirmeras härröra från exon 10 på ARMC2 genen (figur 5). Data från en av de analyserade individerna var ej användbar, detta var data från forward primern märkt ARMC2_4_H_F som inte visade något resultat överhuvudtaget. Vid analys av sekvensdata kunde inte den mutation påvisas som Coutton *et al.* (2019) fann i en individ som uppvisade astenospermi och som var drabbad av en deletion av kvävebaserna ACAA som introducerade ett för tidigt stoppkodon

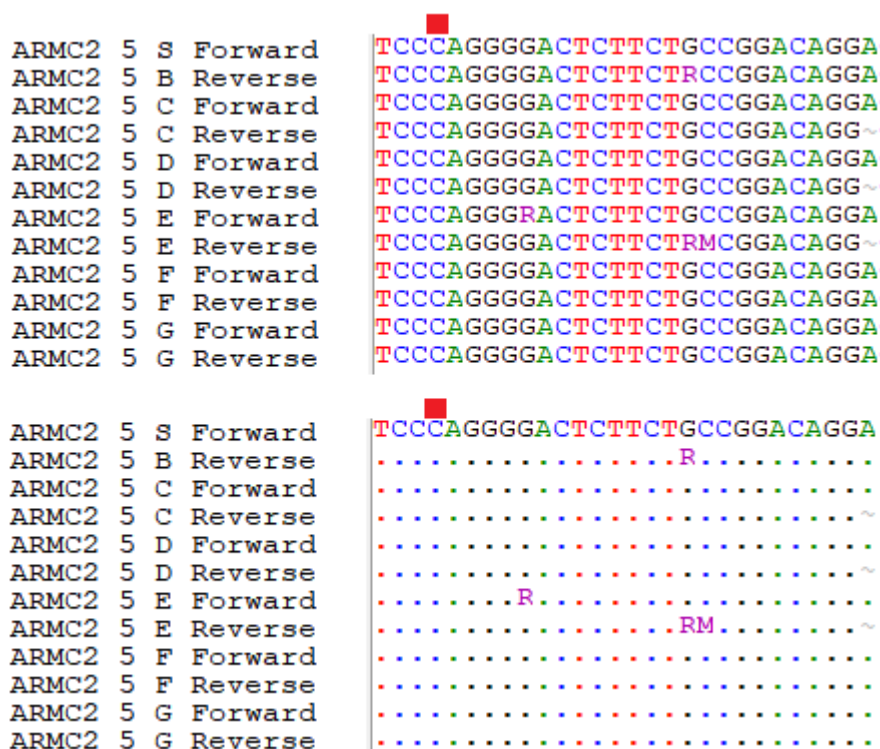
på grund av en förskjutning av läsramen. Sju av åtta individer var homozygota i denna region på genen (markerat med flagga i bilden nedan) och den åttonde var heterozygot.



Figur 5. Sekvensdata från forward och reverseprimers från de åtta utvalda individerna (S, B, C, D, E, F, G och H) i exon 10 på ARMC2 genen. Proverna ARMC_2_4_S_Forward och ARMC2_4_S_Reverse är två prover från samma individ, detsamma gäller för följande prover till respektive individ. Markerat med fem röda flaggor är baserna ACAA som Coutton *et al.* (2019) beskrivit deleterats och orsakat en läsramsförskjutning. På vissa positioner förekommer degenererade baser (wobbles) R, W, M, Y, S eller K. Varje wobble motsvarar 2 möjliga baser, där $R = A+G$, $W = A+T$, $M = A+C$, $Y = C+T$, $S = C+G$, $K = G+T$.

4.1.6. Sekvensdata från exon 4 på ARMC2 genen

Vid PCR-sekvensering erhöles totalt 12 användbara produkter, en från forward primern och en från reverse primern från fem individer (C, D, E, F & G), en forward primer från individ S och en reverse primer produkt från individ B. Inga användbara produkter erhöles från individ H. Samtliga produkter var av god kvalitet och kunde konfirmeras härröra från exon 4 på ARMC2 genen (figur 6). Vid analys av sekvens data kunde inte den mutation påvisas som Coutton *et al.* (2019) fann i en individ som uppvisade astenospermi. Individerna i deras studie var drabbad av en bassubstitution C>T som introducerade ett för tidigt stoppkodon på grund av bildningen av ett prematurt stoppkodon.



Figur 6. Sekvensdata från forward och reverseprimer från de åtta utvalda individerna (S, B, C, D, E, F, G och H) i exon 4 på ARMC2 genen. Proverna ARMC_2_5_S_Forward och ARMC_2_5_S_Reverse är två prover från samma individ, detsamma gäller för följande prover till respektive individ. Markerat med en röd flagga är basen cytosin som Coutton et al. (2019) beskrivit substituerats mot en tymin och introducerat ett för tidigt stoppkodon. På vissa positioner förekommer degenererade baser (wobbles) R, W, M, Y, S eller K. Varje wobble motsvarar 2 möjliga baser, där $R = A+G$, $W = A+T$, $M = A+C$, $Y = C+T$, $S = C+G$, $K = G+T$.

4.1.7. Kvalitet av extraherad RNA från färsk och fryst sperma

För de två färska spermaproverna från beaglen, med respektive utan tillsats av RNas-hämmare var RIN-värdet 5,8 respektive 2,7. För de två frysta spermaproverna från beaglen och bernersennen hunden (B1), med respektive utan tillsats av RNas-hämmare var RIN-värdet 3,9 respektive 2,7, se tabell 3.

Tabell 3. Resultat över sperman från berner sennenhunden (B1) och beaglen som ingick i RNA extraktionsdelen av studien. Det framgår ifall provet var färsk eller fryst, om det var med eller utan tillsats av RNas-hämmare, samt vilket RIN-värde på skalan 1-10 som erhöles från Agilent TapeStation. För de frysta proverna var det erhållna värdet högre från beaglen, vi vet inte om detta beror på lagringstiden. Detta var ett första försök med begränsat antal individer och prover.

Hund	Färsk/fryst	Med/utan tillsats av RNas hämmare	RIN värde (1-10)
Beagle	Färsk	Med	5,8
Beagle	Färsk	Utan	2,7
Beagle	Fryst	Med	3,9
B1	Fryst	Med	2,7

5. Diskussion

Då man i ett tidigare delprojekt inom berner sennenprojektet fann en förhöjd andel svansdefekter i studiegruppen jämfört med normalvariationen för hund så identifierades denna morfologiska avvikelse som en kvalificerad fenotyp att undersöka genetiskt. I denna studie valdes två kandidatgener ut, som har visats ge upphov till svansdefekter hos mus och människa (Sha *et al.* 2017; Wang *et al.* 2017; Coutton *et al.* 2019), för att se om mutationer i dess gener orsakar svansdefekter hos de studerade hundarna. Fyra av de sju hanhundar som undersöktes med PCR och Sangersekvensering uppvisade ingen mutation i någon av de undersökta generna, *DNAH1* och *ARMC2*.

Ingen variation mellan de undersökta hundarna och hundens referensgenom påvisades i de områden där mutationer påvisats hos människor med förhöjd andel spermier med svansdefekter. Sannolikheten att de undersökta berner sennhundarna skulle vara drabbade av en identisk mutation på samma gen som ett litet antal människor inom en familj i Algeriet (Ben Khelifa *et al.* 2014) samt i Kina (Tang *et al.* 2017) är dock liten. Erhållna resultat har varit av god kvalitet och visar att med tillräckligt bra utformade primers kan man få analyserbara PCR-produkter från det insamlade helblodet från hanhundarna i studien.

Eftersom vi uteslöt syndromiska sjukdomar i kandidatgenapproachen, då de undersökta hundarna inte uppvisade några kliniska tecken på någon form av sjukdom, så är antalet troliga genmutationer begränsat till sådana som endast påverkar flagellfunktion hos spermier. Av de ca 2000 gener som är involverade i spermatogenesen har minst 18 gener i dagsläget beskrivits som associerade med MMAF hos människa och modellorganismer (Khan *et al.* 2021a) vilket begränsar antalet troliga kandidatgener att undersöka markant. *DNAH1* genen består av totalt 78 exon och vi har i denna studie undersökt endast en utav dessa, och vi undersökte totalt fem av totalt 18 exon i *ARMC2* genen. Det är förvisso möjligt att en mutation som orsakar en nedsatt spermiekvalitet är belägen i någon av de exon eller intron vi ej har undersökt i denna studie.

En trend som noterades vid undersökning av PCR-produkterna var att samtliga hundar där vi erhöll produkter från både forward och reverseprimern för samma

område på en gen uppvisade homozygoti, vilket skulle tyda på att hundarna i den svenska populationen har en minskad fitness gällande fertilitet förutsatt att den heterozygota genotypen har en högre relativ fitness (Charlesworth & Willis 2009). Det är tidigare visat att inavelsdepression ökar förekomsten av skadliga alleler, som förekommer oftare hos homozygota individer (Marelli *et al.* 2020). Även om inavelsdepression inte ger upphov till skadliga alleler så är minskningen av genetisk variabilitet negativt i sig.

Fruktbarhetsproblem kan bero på faktorer hos honan, hanen eller en kombination. Det är möjligt att den relativt höga fenotypen av svansdefekter hos berner sennen-hundar inte är den enda orsaken till nedsatt fertiliteten inom rasen. Oavsett orsak är det ett viktigt område att undersöka vidare då det finns en risk att trenden med fortsatt låg dräktighetsprocent, fortsätter och på sikt minskar avelsbasen betydligt och med det den genetiska variationen inom rasen (RAS Sennen, 2008).

I arbetets senare del så utförde vi RNA-extraktioner direkt från hundspermier. Majoriteten av studier där man extraherat sperma-RNA är gjorda på andra djurslag än hund, ex nöt, gris och mus. Därför finns inga vedertagna protokoll för hur RNA bäst extraheras ur hundspermier. I vårt arbete noterade vi att man fick högst RIN-värde (5,8) när RNA extraherades från färsk hundsperma med tillsats av RNAs-inhibitor, mer än dubbelt så högt som för provet utan tillsats av RNAs-inhibitor.

Även för fryst hundsperma erhöles ett bättre RIN-värde (3,9) jämfört med utan tillsats av RNAs-inhibitor. Tiden som provet förvarats i -80°C kan också ha påverkat RIN-värdet, eftersom spermaprovet från en berner sennen som förvarats i ca 14 månader hade ett relativt lågt RIN-värde (2,7) trots tillsatsen av RNAs-inhibitor. Variation mellan raserna eller individerna kan också ha påverkat RIN-värdet. Detta värde är dock samma som för ett färskt spermaprov utan tillsats av RNAs-inhibitor, vilket stärker indikationen på en skyddande effekt av RNAs-inhibitor på RNA-innehållet i proven.

För framtida studier vore det intressant att fortsätta utveckla alternativa protokoll för RNA-extraktion från hundspermier för att höja RIN-värdet. Med tillgång till RNA-prover av högre kvalitet kan säkrare kvantifiering av mRNA från kandidat-gener jämfört med housekeeping-gener genomföras. Dessutom kan hela transkriptomet från hundspermier definieras från berner sennen hundar med olika spermiekvalitet samt fertilitet.

Referenser

- Barak, S. & Baker, H.W.G. (2016). Chapter 141 - Clinical Management of Male Infertility. I: Jameson, J.L. & De Groot, L.J. (eds.). *Endocrinology, Adult and Pediatric*, 7th ed. Elsevier. 2431-2455.
- Bell, J. (1989). The polymerase chain reaction. *Immunology Today*, 10 (10), 351-355. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(89\)90193-X](https://doi.org/10.1016/0167-5699(89)90193-X).
- Ben Khelifa, M., Coutton, C., Zouari, R., Karaouzène, T., Rendu, J., Bidart, M., Yassine, S., Pierre, V., Delaroché, J., Hennebicq, S., Grunwald, D., Escalier, D., Pernet-Gallay, K., Jouk, P.-S., Thierry-Mieg, N., Touré, A., Arnoult, C. & Ray, P.F. (2014). Mutations in DNAH1, which encodes an inner arm heavy chain dynein, lead to male infertility from multiple morphological abnormalities of the sperm flagella. *American Journal of Human Genetics*, 94 (1), 95–104. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.11.017>
- Biswas, S. & Stedronska, J. (1980). Enhanced seminal plasma ribonuclease activities in azoospermia, severe oligozoospermia, and asthenozoospermia. *Archives of Andrology*, 4 (3), 271–273. <https://doi.org/10.3109/01485018008986973>
- Brown, T.A. (2002). *Genomes*. 2nd. ed Oxford: Wiley-Liss. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21128/> [2021-12-09]
- Carmichael, L.E. & Kenney, R.M. (1968). Canine abortion caused by *Brucella canis*. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 152 (6), 605–616
- Charlesworth, D. & Willis, J.H. (2009). The genetics of inbreeding depression. *Nature Reviews. Genetics*, 10 (11), 783–796. <https://doi.org/10.1038/nrg2664>
- Chłopik, A. & Wysokińska, A. (2020). Canine spermatozoa - What do we know about their morphology and physiology? An overview. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 55 (2), 113–126. <https://doi.org/10.1111/rda.13596>
- Coutton, C., Martinez, G., Kherraf, Z.-E., Amiri-Yekta, A., Boguenet, M., Saut, A., He, X., Zhang, F., Cristou-Kent, M., Escoffier, J., Bidart, M., Satre, V., Conne, B., Fourati Ben Mustapha, S., Halouani, L., Marrakchi, O., Makni, M., Latrous, H., Kharouf, M., Pernet-Gallay, K., Bonhivers, M., Hennebicq, S., Rives, N., Dulioust, E., Touré, A., Gourabi, H., Cao, Y., Zouari, R., Hosseini, S.H., Nef, S., Thierry-Mieg, N., Arnoult, C. & Ray, P.F. (2019). Bi-allelic mutations in ARMC2 lead to severe astheno-teratozoospermia due to sperm flagellum malformations in humans and mice. *American Journal of Human Genetics*, 104 (2), 331–340. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.12.013>

- Den Daas, J.H., De Jong, G., Lansbergen, L.M. & Van Wagendonk-De Leeuw, A.M. (1998). The relationship between the number of spermatozoa inseminated and the reproductive efficiency of individual dairy bulls. *Journal of Dairy Science*, 81 (6), 1714–1723. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75739-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75739-X)
- England, G.C.W., Phillips, L. & Freeman, S.L. (2010). Heritability of semen characteristics in dogs. *Theriogenology*, 74 (7), 1136–1140. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.05.012>
- Forsyth, R.L. & Gunay-Aygun, M. (2003 updated 2020). Bardet-Biedl Syndrome Overview. In: Adam, M.P., Mirzaa, G.M., Pagon, R.A., *et al.*, (eds.). *GeneReviews*® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1363/>
- Freshman, J.L. (2001). Clinical management of the subfertile stud dog. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 31 (2), 259–269. [https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(01\)50204-1](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(01)50204-1)
- Guerri, G., Maniscalchi, T., Barati, S., Busetto, G.M., Del Giudice, F., De Berardinis, E., Cannarella, R., Calogero, A.E. & Bertelli, M. (2019). Non-syndromic monogenic male infertility. *Acta Bio Medica : Atenei Parmensis*, 90 (Suppl 10), 62–67. <https://doi.org/10.23750/abm.v90i10-S.8762>
- Hase, M., Hori, T., Kawakami, E. & Tsutsui, T. (2000). Plasma LH and progesterone levels before and after ovulation and observation of ovarian follicles by ultrasonographic diagnosis system in dogs. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 62 (3), 243–248. <https://doi.org/10.1292/jvms.62.243>
- Hensel, M.E., Negron, M. & Arenas-Gamboa, A.M. (2018). Brucellosis in dogs and public health risk. *Emerging Infectious Diseases*, 24 (8), 1401–1406. <https://doi.org/10.3201/eid2408.171171>
- Hesser, A., Darr, C., Gonzales, K., Power, H., Scanlan, T., Thompson, J., Love, C., Christensen, B. & Meyers, S. (2017). Semen evaluation and fertility assessment in a purebred dog breeding facility. *Theriogenology*, 87, 115–123. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.08.012>
- Holst, B.S., Löfqvist, K., Ernholm, L., Eld, K., Cedersmyg, M. & Hallgren, G. (2012). The first case of *Brucella canis* in Sweden: background, case report and recommendations from a northern European perspective. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 54 (1), 18. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-54-18>
- Ishikawa, T. (2017). Axoneme structure from motile cilia. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 9 (1), a028076. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028076>
- Johnston, S.D. (1991). Clinical approach to infertility in bitches with primary anestrus. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, 21 (3), 421-5. [https://doi.org/10.1016/s0195-5616\(91\)50051-6](https://doi.org/10.1016/s0195-5616(91)50051-6)
- Jordbruksverket (u.å.). *Statistik ur hundregistret*. <https://jordbruksverket.se/e-tjanster-databaser-och-appar/e-tjanster-och-databaser-djur/hundregistret/statistik-ur-hundregistret> [2021-11-07]

- Kent, J. (u.å.). UCSC In-Silico PCR. *UCSC Genome Browser*. Available at: <https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr> [2021-08-30]
- Khan, I., Dil, S., Zhang, H., Zhang, B., Khan, T., Zeb, A., Zhou, J., Nawaz, S., Zubair, M., Khan, K., Ma, H. & Shi, Q. (2021a). A novel stop-gain mutation in ARMC2 is associated with multiple morphological abnormalities of the sperm flagella. *Reproductive BioMedicine Online*,. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2021.07.021>
- Khan, R., Zaman, Q., Chen, J., Khan, M., Ma, A., Zhou, J., Zhang, B., Ali, A., Naeem, M., Zubair, M., Zhao, D., Shah, W., Khan, M., Zhang, Y., Xu, B., Zhang, H. & Shi, Q. (2021b). Novel loss-of-function mutations in DNAH1 displayed different phenotypic spectrum in humans and mice. *Frontiers in Endocrinology*, 12. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2021.765639> [2022-02-13]
- Lehti, M.S. & Sironen, A. (2017). Formation and function of sperm tail structures in association with sperm motility defects. *Biology of Reproduction*, 97 (4), 522–536. <https://doi.org/10.1093/biolre/iox096>
- Li, L., Lu, X. & Dean, J. (2013). The maternal to zygotic transition in mammals. *Molecular Aspects of Medicine*, 34 (5), 919–938. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2013.01.003>
- Lorenz, T.C. (2012). Polymerase chain reaction: Basic Protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (63), 3998. <https://doi.org/10.3791/3998>
- Mäkeläinen, S., Hellsand, M., van der Heiden, A.D., Andersson, E., Thorsson, E., S. Holst, B., Häggström, J., Ljungvall, I., Mellersh, C., Hallböök, F., Andersson, G., Ekesten, B. & Bergström, T.F. (2020). Deletion in the Bardet–Biedl syndrome gene TTC8 results in a syndromic retinal degeneration in dogs. *Genes*, 11 (9), 1090. <https://doi.org/10.3390/genes11091090>
- Marelli, S.P., Beccaglia, M., Bagnato, A. & Strillacci, M.G. (2020). Canine fertility: The consequences of selection for special traits. *Reproduction in Domestic Animals*, 55 (S2), 4–9. <https://doi.org/10.1111/rda.13586>
- Menon, A.G., Barkema, H.W., Wilde, R., Kastelic, J.P. & Thundathil, J.C. (2011). Associations between sperm abnormalities, breed, age, and scrotal circumference in beef bulls. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 75 (4), 241–247
- Meyers-Wallen, V.N. (1991). Clinical approach to infertile male dogs with sperm in the ejaculate. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, 21 (3), 609–633. [https://doi.org/10.1016/s0195-5616\(91\)50063-2](https://doi.org/10.1016/s0195-5616(91)50063-2)
- Mitchell, D.R. (2007). The evolution of eukaryotic cilia and flagella as motile and sensory organelles. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 607, 130–140. https://doi.org/10.1007/978-0-387-74021-8_11
- Moon, J.H., Yoo, D.Y., Jo, Y.K., Kim, G.A., Jung, H.Y., Choi, J.H., Hwang, I.K. & Jang, G. (2014). Unilateral cryptorchidism induces morphological changes of testes and hyperplasia of Sertoli cells in a dog. *Laboratory Animal Research*, 30 (4), 185–189. <https://doi.org/10.5625/lar.2014.30.4.185>

- NCBI (u.å.). *Genes*. National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene> [2021-08-30]
- NCBI-BLAST (u.å.). *BLAST – Basic Local Alignment Search Tool*. National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine. https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome [2021-08-30]
- Nduwayo, L., Barthélémy, C., Lansac, J., Tharanne, M.J. & Lecomte, P. (1995). [Management of necrospemia] [Article in French]. *Contraception, Fertilité, Sexualité*, 23 (11), 682–685.
- NHGRI (u.å.). *Candidate Gene*. National Human Genome Research Institute. <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Candidate-Gene> [2021-12-10]
- OMIA (u.å.). *Online Mendelian Inheritance in Animals*. Sydney School of Veterinary Science. <https://omia.org/browse/> [2022-02-07]
- OMIM - Online Mendelian Inheritance in Man (u.å.). *An Online Catalog of Human Genes and Genetic Disorders*. Johns Hopkins University. <https://www.omim.org/> [2022-02-07]
- Pace, M.M., Sullivan, J.J., Elliott, F.I., Graham, E.F. & Coulter, G.H. (1981). Effects of thawing temperature, number of spermatozoa and spermatozoal quality on fertility of bovine spermatozoa packaged in .5-ml French straws. *Journal of Animal Science*, 53 (3), 693–701. <https://doi.org/10.2527/jas1981.533693x>
- Purswell, B.J., Althouse, G., Root-Kustritz, M.V., Pretzer, S. & Lopate, C. (2015). *Guidelines for using the canine breeding soundness evaluation form*. Available via ResearchGate. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.2180.1122>
- Romagnoli, S.E. (1991). Canine cryptorchidism. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 21 (3), 533–544. [https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(91\)50059-0](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(91)50059-0)
- Saacke, R. (2008). Sperm morphology: Its relevance to compensable and uncompensable traits in semen. *Theriogenology*, 70, 473–8. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.04.012>
- Saacke, R.G., Dejarnette, J.M., Bame, J.H., Karabinus, D.S. & Whitman, S.S. (1998). Can spermatozoa with abnormal heads gain access to the ovum in artificially inseminated super- and single-ovulating cattle? *Theriogenology*, 50 (1), 117–128. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(98\)00119-8](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00119-8)
- Schultz, N., Hamra, F.K. & Garbers, D.L. (2003). A multitude of genes expressed solely in meiotic or postmeiotic spermatogenic cells offers a myriad of contraceptive targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100 (21), 12201–12206. <https://doi.org/10.1073/pnas.1635054100>
- Snell, A. (2022). *En undersökning av genetisk variation associerad med spermiedefekter hos berner sennen*. (Självständigt arbete). Sveriges lantbruksuniversitet. Veterinärprogrammet. <http://urn.kb.se/resolve?urn=urn:nbn:se:slu:epsilon-s-18155>

- Svenska Sennenhundklubben (u.å.). *Avelsrådet - Kullstatistik*.
https://www.sshk.a.se/Avelsradet/Kullstatistik_sammanstallning_2021.htm [2021-11-07]
- Svenska Sennenhundklubben (2018). *Avelsrådet - Rasspecifik avelsstrategi Berner Sennen*. <https://www.skk.se/globalassets/dokument/rasdokument/ras-berner-sennenhund.pdf>
- Tesi, M., Sabatini, C., Vannozzi, I., Di Petta, G., Panzani, D., Camillo, F. & Rota, A. (2018). Variables affecting semen quality and its relation to fertility in the dog: A retrospective study. *Theriogenology*, 118, 34–39.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.05.018>
- Themes, U.F.O. (2016). Male canine sexual behavior. *Veterian Key*.
<https://veteriankey.com/male-canine-sexual-behavior/> [2022-01-31]
- ThermoFisher Scientific (u.å.). *BigDye™ Direct Cycle Sequencing Kit*.
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4458687>. [2021-10-15]
- Untergasser, A., Nijveen, H., Rao, X., Bisseling, T., Geurts, R. & Leunissen, J.A.M. (2007). Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Research*, 35 (2), W71–W74, <https://doi.org/10.1093/nar/gkm306>
- Verstegen, J., Dhaliwal, G. & Verstegen-Onclin, K. (2008). Canine and feline pregnancy loss due to viral and non-infectious causes: A review. *Theriogenology*, 70 (3), 304–319. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.05.035>
- Wageningen University Bioinformatics (u.å.). *Primer3Plus*. [webb interface]
<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/> [2021-08-30]
- Wang, W.-L., Tu, C.-F. & Tan, Y.-Q. (2020). Insight on multiple morphological abnormalities of sperm flagella in male infertility: what is new? *Asian Journal of Andrology*, 22 (3), 236–245. https://doi.org/10.4103/aja.aja_53_19

Tack

Jag vill utfärda ett stort och varmt tack till min handledare Bodil Ström Holst som har hjälpt mig att genomföra detta arbete. Hon har aktivt hjälpt till med skrivningen och har givit många goda råd.

Jag vill även tacka min biträdande handledare Göran Andersson för den entusiastiska hjälp han givit. Han har introducerat mig till spännande forskning om genetik, och har bidragit till allt som berör genetik i detta arbete.

Jag vill också tacka Tytti Vanhala som hjälpt mig att utföra de laborativa delarna av arbetet på ett säkert och korrekt sätt. Samt hjälpt mig med att tolka sekvensdata med hjälp av datorprogram.

Populärvetenskaplig sammanfattning

I denna studie ville man undersöka möjliga orsaker till fruktsamhetsproblematik hos hundrasen berner sennen i Sverige. Fruktsamhet kan bero på hanen, tiken eller en kombination av båda, i detta arbete valde man att fokusera på fruktsamhet ur det hanliga perspektivet. Därför studerades spermaprover och blodprover.

Detta är inte det första arbetet från SLU där man undersöker fruktsamhetsproblem hos berner sennen. Förra året (2020) gjordes fyra arbeten med olika fokus kring nedsatt fruktsamhet ur det hanliga perspektivet. Då fann man att medelvärdet för felaktiga spermiesvansar var förhöjd hos de undersökta hundarna. Därför valde vi att studera genetiska orsaker till att spermierna hade defekter på sina svansar.

Eftersom vi inte vet vilken av flera gener som påverkar bildningen av spermier så var vi tvungna att göra en kvalificerad gissning på vilken gen som kan orsaka svansdefekter hos hundarna i vår studie. Genom att läsa studier där man har undersökt liknande problem i andra arter så kunde vi begränsa antalet gener vi som sannolikt kunde orsaka problemen. Vi hade således en hypotes att hundarna med dålig spermiekvalitet kunde vara muterade i en viss gen.

En gen består av flera kodande delar, exoner, och flera icke kodande delar, introner. Mutationer, dvs förändringar i den genetiska koden, kan ske i båda av dessa. Vi letade efter mutationer i vissa exoner där människor och möss med defekta spermiesvansar har varit muterade. Det är svårt och dyrt att få fram hela den genetiska koden från en hund, därför kunde vi bara titta på ett fåtal och korta sekvenser. Via en metod som heter PCR och Sangersekvensering kunde vi få reda på den genetiska koden från vissa få utvalda ställen genom att bygga och beställa så kallade primers. Primers är korta DNA-sekvenser som berättar var man ska börja bygga en ny kopia av den delen av genen som man vill kopiera. När vi hade många kopior av den delen på genen kunde vi studera om det var en annorlunda ordning på kvävebaserna, s.k. mutation.

Vi renade också ut RNA från färsk och frusen sperma. RNA finns framför allt i spermiehuvudena och kan skadas av RNAs som finns i alla celler. För att få ut så mycket RNA som möjligt av bra kvalitet så tillsatte vi i RNAs-hämmare, som hindrar

RNas från att bryta ned RNA. Sedan tillsatte vi substanser för att ta bort allt annat utom RNA i provet. Vi använde en maskin som visar hur bra RNA är på en skala mellan 1 och 10 där 1 är sämst och 10 är bäst. Vi fick som bäst 5,8. Vi tror att man kan få ett ännu bättre resultat om man utvecklar metoden. Detta var endast ett första test för denna metod och gjordes på totalt 3 prover för att utvärdera metodens effektivitet. Vi kontrollerade också kvaliteten på färsk vs fryst sperma för att få en uppfattning om metodens effektivitet

Vi hittade inga mutationer som har orsakat felaktiga spermiesvansar hos människor och möss hos de studerade hundarna. Man fick bäst RNA om man tillsatte RNas-hämmare till färsk sperma och sämst RNA från fryst sperma utan att tillsats av RNas-hämmare.