



1.1 Abschlussbericht Forschungsprojekt Research Project Progress Report

Projektnummer Project number	2.13.02	Datum Date	29.01.2015
Projekttitel Project title	Molekulargenetik der ureteralen Ektopie bei Entlebucher Sennenhunden Molecular genetics of ectopic ureters in Entlebucher Mountain Dogs		
Projektbeginn Start date of the project	01.01.2013	Projektende End date of the project	31.12.2014
Projektmitarbeitende/r Co-applicants	Leeb Tosso, Prof. Dr. Department of Clinical Research and Veterinary Public Health Vetsuisse-Fakultät der Universität Bern Bremgartenstrasse 109a CH-3012 Bern 41 31 631 23 26 tosso.leebe@vetsuisse.unibe.ch		
Projektverantwortliche/r Project manager	Iris Reichler Abteilungsleiterin Kleintierreproduktion Tierspital Zürich Winterthurerstrasse 260 CH-8057 Zürich 044 635 82 66 ireichler@vetclinics.uzh.ch		
Begleitende/r Experte/in BVET Accompanying expert	Michelle Howald Bundesamt für Veterinärwesen Schwarzenburgstrasse 155 CH-3003 Bern +41 31 323 85 63 michelle.howald@bvet.admin.ch		

Erledigte Arbeiten

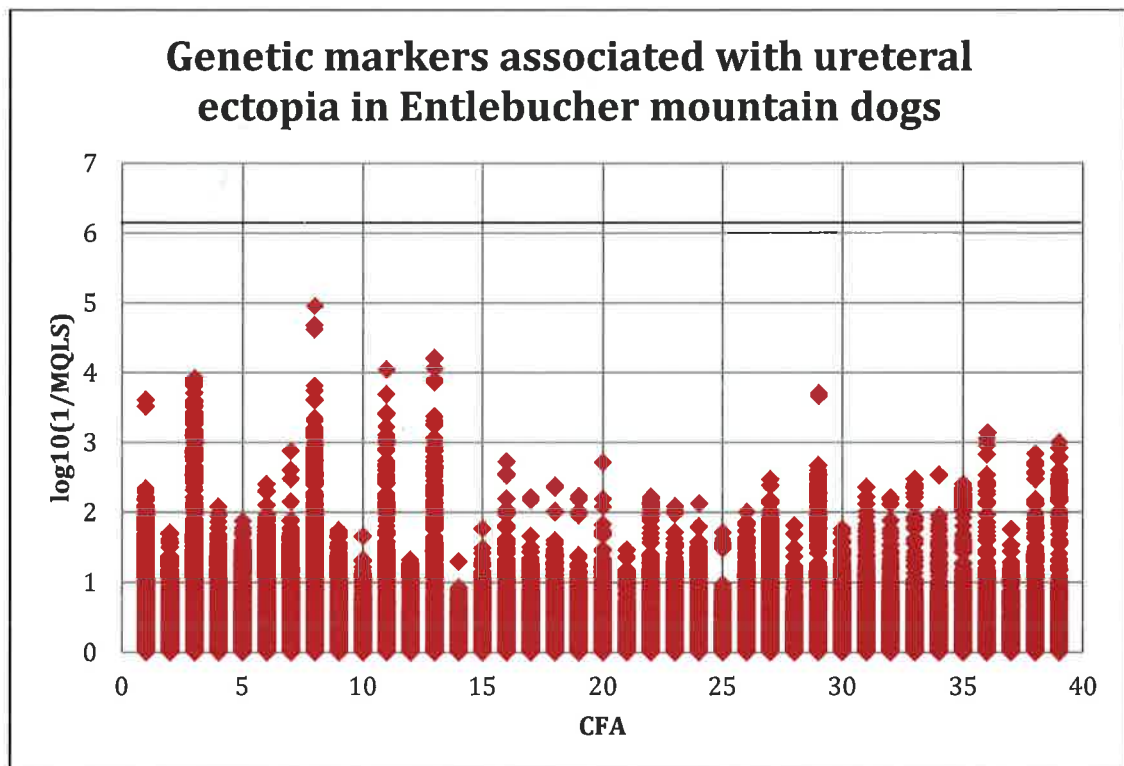
Work completed

2013/2014

In den Jahren 2013 und 2014 wurden 400 Entlebucher Sennenhunde und 15 Appenzeller Sennenhunde mittels Abdominal-Ultraschall (darstellen der Urin-Jets von der Ureter-Mündungsstelle) phänotypisiert. Gleichzeitig wurde während dieser Untersuchungen jeweils eine EDTA-Blutprobe entnommen. Damit stehen uns nun Daten von insgesamt 1026 Entlebucher und 115 Appenzeller Sennenhunden zur Verfügung. Für einen Grossteil dieser Proben ($n=848$) wurde DNA mit dem Nucleon Bacc2 Kit extrahiert und eine Qualitätsüberprüfung durchgeführt (Gelelektrophorese und Spektrophotometrie).

Zur Identifizierung möglicher funktioneller genetischer Varianten wurden die Genome von 8 Hunden resequenziert, 4 davon waren nicht-betroffene, 4 betroffene Hunde. Die Laborarbeiten zur Sequenzierung sind abgeschlossen. Die Datenauswertung hat keine nicht-synonymen Varianten ergeben, bei denen alle anderen Hunderassen, sowie die nicht-betroffenen Entlebucher Sennenhunde, homozygot Wildtyp (0/0) und alle betroffenen Entlebucher Sennenhunde homozygot mutiert (1/1) oder heterozygot (0/1) waren. Des Weiteren wurde auch keine nicht-synonymen Varianten gefunden, bei der alle anderen Hunderassen, sowie die nicht-betroffenen Entlebucher Sennenhunde, homozygot Wildtyp (0/0) oder heterozygot (0/1) und alle betroffenen Entlebucher Sennenhunde homozygot mutiert (1/1) waren.

Im Februar 2014 wurden zudem 96 weitere Hunde auf dem Illumina CanineHD (173k) BeadChip genotypisiert. Diese Daten wurden zusammen mit den Ergebnissen der Genotypisierungen in den Jahren 2010 und 2012 ausgewertet, wiederum mit dem MQSL-Statistik-Programm.



In diesem Manhattan Plot stellt jede Säule die Marker auf einem der 40 Hunde-Chromosomen dar, wobei Nummer 39 das X-Chromosom darstellt und Nummer 40 das Y-Chromosom. Je höher der Y-Achsenwert eines Markers, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass er mit dem Phänotyp Ureterektomie assoziiert ist.

Die horizontale Linie im Manhattan Plot bei $\log(1/MQLS) = 6.16$ stellt die konservative Signifikanzschwelle mit einer Bonferroni-Korrektur für 72150 Marker und einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 0.05$ dar. In unserer Studie erreichen die am stärksten assoziierten Marker mit Werten von $\log(1/MQLS)$ 4 bis 5 diese Signifikanzschwelle noch nicht ganz.

Die erneute Analyse mit zusätzlichen Hunden bestätigt die früher gefunden Hinweise auf eine mögliche Assoziation der Chromosomen 3, 8 und 13. Neu finden wir jetzt zusätzlich auch Marker auf dem Chromosom 11, die mit der Ureterektomie assoziiert sein könnten. Um hier statistisch signifikante Ergebnisse zu erhalten, wird die Anzahl der Hunde in der Studie weiter vergrößert werden. Geplant ist, erneut 96 Hunde per Illumina BeadChip zu genotypisieren, sobald genügend Hunde mit dem Phänotyp 1 (nicht ektopisch) und dem Phänotyp 3 (ektopisch extravasikulär) zur Verfügung stehen, da diese nach bisherigem Wissen die klarsten Ergebnisse liefern. Ausreichend ist die Anzahl nicht betroffener Tiere (Phänotyp 1, n=61), vom Phänotyp 3 stehen bisher 24 Tiere zur Verfügung, für die geplante Analyse sollten weitere 24 Tiere mit Phänotyp 3 identifiziert werden.

Between 01.01.2013 and 31.12.2014, 400 Entlebucher and 15 Appenzeller Mountain Dogs were phenotyped by abdominal ultrasound (visualization of urine jets, representing the ureteral orifices). Thus, data from a total of 1026 Entlebucher and 115 Appenzeller Mountain Dogs are available. During these examinations an EDTA blood sample was taken and DNA was extracted from most of the samples (n=848), using the Nucleon Bacc2 kit. This was then followed by a quality control (gel electrophoresis and spectrophotometry).

To identify potentially functional genetic variants, the genomes of 8 dogs were resequenced, 4 of the dogs being non-affected and 4 affected. The laboratory work for sequencing has been completed. The analysis showed no non-synonymous variations, for which all other dog breeds, as well as the non-affected Entlebucher Mountain Dogs, were homozygous wild type (0/0) and all affected Entlebucher Mountain Dogs were either homozygous mutated (1/1) or heterozygous (0/1). Furthermore, no non-synonymous variations were found, for which all other dog breeds, as well as the non-affected Entlebucher Mountain Dogs, were homozygous wild type (0/0) or heterozygous (0/1), while all affected Entlebucher Mountain Dogs were homozygous mutated (1/1).

In February 2014, another 96 dogs were genotyped with the Illumina CanineHD (173k) BeadChip. The data was analyzed, together with the data from the two previous genotyping experiments, using the MQSL statistics-program. In the Manhattan plot above (page 2), every column depicts the markers on one of the 40 dog chromosomes, number 39 being the x-chromosome, number 40 the y-chromosome. The higher the Y-axis value of a particular marker, the higher is the probability that this marker is associated with the phenotype ureteral ectopia.

The horizontal line at $\log(1/\text{MQSL}) = 6.16$ represents the conservative threshold of significance, with a Bonferroni correction for 72150 markers and a probability of error of $\alpha=0.05$ per marker. In our study, the most strongly associated markers show values of $\log(1/\text{MQSL})$ between 4 and 5, and therefore do not yet reach the threshold of significance. The results of this analysis confirm the hitherto existing assumption that ureteral ectopia in the Entlebucher Mountain Dog is associated with the chromosomes 3, 8 and 13. Furthermore, there are signs that chromosome 11 might be associated with the genotype, as well.

As more dogs are needed to obtain statistically significant results, the project is ongoing. We plan to genotype another 96 dogs with the Illumina BeadChip, as soon as we have the data of enough dogs with phenotype 1 (no ectopic ureters) and phenotype 3 (extravesicular ectopic). Previously collected data suggests that these two phenotypes yield the most results. Sufficient samples of non-affected dogs have already been stored (phenotype 1, n=61), however up to now only 24 samples of dogs showing phenotype 3 are available, samples of a further 24 dogs showing this phenotype still have to be collected.

Soll-Ist-Vergleich mit Projektbeschreibung und daraus folgende Abweichungen für: Comparison of target and actual results achieved, including a description of discrepancies for the project time:	2013/2014
---	------------------

Von den in der zweiten Jahreshälfte 2014 untersuchten Hunden wurden zwar die eingeschickten Blutproben in Bern eingefroren, aber noch keine DNA extrahiert. Die Auswertung der Daten der 96 im Februar genotypisierten Hunde wurde dem vorgezogen.

Die Genome von 8 Hunden wurden resequenziert. Die Datenauswertung wurde wie geplant durchgeführt. Die Ergebnisse erlauben bisher noch keine klaren Rückschlüsse, aber wir halten es durchaus für möglich, dass die bei der ersten Auswertung noch ausgeschlossenen intergenischen und Intron-Regionen funktionell wichtige (regulatorische) Varianten enthalten. Zudem waren die bisherigen Filterkriterien (alle Fälle müssen eine bestimmte Variante aufweisen) unter der Annahme, dass die Ureterektomie höchstwahrscheinlich komplex vererbt wird, wahrscheinlich zu stringent.

Blood samples of the dogs phenotyped during the second half of the year 2014 have been stored in Bern, but DNA has not been extracted so far. The analysis of the data from the 96 dogs genotyped in February was deemed more important for the time being.

The genomes of 8 dogs were resequenced. The analysis was carried out as planned. The results did not yet lead to any definite conclusions. We consider it possible that the intergenic and intron-regions, that were excluded from the first analysis, could potentially harbor functionally important regulatory variants. Additionally, the filters used (all cases were required to carry a certain variant allele) were possibly too strict, considering the assumption, that ureteral ectopia is most probably a trait with a complex mode of inheritance.

Publikationen, wissenschaftliche Vorträge, Öffentlichkeitsarbeit Publications, scientific presentations, PR campaigns	2013/2014
---	------------------

29.10.2013 Sarah Sugiarto: Vortrag im Rahmen des Laborseminars Vetsuisse-Fakultät Bern:
Molecular genetics of the ureteral ectopia in the Entlebucher mountain dog.

29.10.2013 Sarah Sugiarto: Talk at the lab seminar at the Vetsuisse-Faculty Bern:
Molecular genetics of the ureteral ectopia in the Entlebucher mountain dog.

Ort, Datum Place, date Zürich, 31.1.2015	Unterschrift/en Signature/s 
---	---