



# En undersökning av genetisk variation associerad med spermiedefekter hos berner sennen

---

*Genetic variation associated with sperm defects in Bernese mountain dogs*

Anna Snell

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





# En undersökning av genetisk variation associerad med spermiedefekter hos berner sennen

*Genetic variation associated with sperm defects in Bernese mountain dogs*

Anna Snell

**Handledare:** **Bodil Ström Holst, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för kliniska vetenskaper**

**Bitr. handledare:** Göran Andersson, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för husdjursgenetik

**Examinator:** Elisabeth Persson, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi

**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

**Omslagsbild:** [Bernese-mountain-dog-642013\\_1280](#) (localpups 2015) ([CC BY 2.0](#))

**Nyckelord:** Berner sennen, fruktsamhet, spermakvalitet, spermiemorfologi, nedärvning, genetiska defekter

**Sveriges lantbruksuniversitet**

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Institutionen för kliniska vetenskaper

Avdelningen för reproduktion

## 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

Hos hundrasen berner sennen har rasklubben de senaste åren observerat en ökning av fruktsamhetsrelaterade problem, såsom att tikar inte blir dräktiga, minskat antal valpar i kullarna och förlossningsproblem. Dräktighetsprocenten hos berner sennen ligger idag 10–20 % lägre än hos andra raser. Denna problematik kan på sikt leda till en för snäv avelsbas, som är potentiellt skadligt för rasen med hänsyn till ökad risk att utveckla andra genetiska sjukdomar och defekter som förekommer i en hundras på grund av minskad genetisk variation.

Syftet med denna studie var därför att undersöka möjliga ärftliga faktorer till fruktsamhetsproblematik hos hanhundar med målsättningen att finna en gemensam nämnare i stamtavlorna hos de undersökta hundarna och potentiellt finna en mutation i någon del av genomet som går att koppla till den nedsatta fruktsamheten.

Blod- och spermaprover samlades in från 65 friska berner sennenhanar och ett blodprov från en tik. Spermaproverna analyserades sedan med avseende på totalantal spermier, motilitet och morfologi. Normalvariationen av spermiesvansdefekter hos friska hundar är <20 %. Grundat på detta identifierades en avvikande fenotyp i form av ökad andel (>20 %) svansdefekter än den som vanligtvis förekommer hos en frisk hund. Baserat på denna fenotyp undersöktes samtliga hundars härkomst i minst åtta generationer för att försöka lokalisera en gemensam nämnare hos individerna med fenotypen. Detta gjordes ur flera hänseenden; utifrån olika gemensamma anfäder, geografiska födelseplatser och inavelsgrad. Resultatet visade en ökad andel svansdefekter hos individer med fler svenskregistrerade mor- & farföräldrar jämfört med hundar med inga eller få svenskregistrerade mor- & farföräldrar. Detta tyder på både en rasbunden och en populationsbunden problematik vilket talar för att defekten har ärftliga riskfaktorer.

PCR-analys följt av Sanger-sekvensering utfördes på åtta av individerna för att undersöka allelfrekvensen vid positionen av två sedan tidigare kända mutationer; en mutation i genen *DNAH1*, som har setts hos människa kopplat till den icke-syndromiska spermiedefekten Multiple Morphological Abnormalities of the sperm Flagella (MMAF), som leder till infertilitet hos män, samt en mutation i genen *SFXN5* som ospecifikt har länkats till spermimorfologi i den turkiska hundrasen aksaray malaklisi. För *DNAH1* genen var resultaten inte bedömningsbara på grund av fel i PCR-processen. För *SFXN5* genen påvisades ingen genetisk variation mellan individerna vilket talar för att genen inte är länkad till den studerade fenotypen.

Ytterligare forskning i ämnet behövs för utökad kunskap om fertilitetsproblem i berner sennenpopulationen i världen.

*Nyckelord:* Berner sennen, fruktsamhet, spermakvalitet, spermimorfologi, nedärvning, genetiska defekter

## Abstract

The Swedish breed association for Bernese mountain dogs has observed an increase in fertility-related problems such as low pregnancy rates, reduced litter sizes and an increased number of dystocia during the recent years. The pregnancy rate of the Bernese mountain dog is currently 10–20% lower than in other breeds. This problem can eventually lead to a reduction of potential dames and sires used for breeding and a narrowed genetic basis, harmful to the breed when considering increased risk to develop other potential genetic diseases and defects.

The purpose of this study was therefore to investigate possible hereditary factors for fertility problems from the male perspective with the aim of finding a common denominator in the pedigrees of the examined dogs and potentially finding a mutation in some part of the genome that can be linked to the reduced fertility.

Blood and semen samples were collected from 65 healthy Bernese mountain dog males and blood from one female, all registered in Sweden. The semen samples were analysed for total number of sperm, motility and morphology. Healthy dogs normally have <20% sperm tail defects. Based on this, a phenotype was identified in the form of an increased proportion (>20%) of tail defects compared to what usually occurs in a healthy dog. Based on this phenotype, the descent of all dogs was examined in pedigrees for at least eight generations in an attempt to locate a common hereditary denominator in the individuals with the phenotype. This was done using several parameters; based on different common ancestors, geographical places of birth and level of inbreeding.

The results showed an increased proportion of tail defects in the individuals with more Swedish-registered grandparents compared with dogs with no or few Swedish-registered grandparents. This indicates both a breed-related and a population-related problem, which suggests that the defect is hereditary.

PCR analysis followed by Sanger Sequencing was performed in eight of the individuals to examine the allele frequency at the position of two previously known mutations leading to sperm tail defects; one mutation in the *DNAH1* gene, which has been seen in humans linked to the non-syndromic sperm defect Multiple Morphological Abnormalities of the sperm Flagella (MMAF) leading to infertility in men, and one mutation in the *SFXN5* gene which has been linked to sperm morphology in the Turkish dog breed Aksaray malaklisi. For the *DNAH1* gene, the results were inconclusive due to errors in the PCR process. For the *SFXN5* gene, no genetic variation was detected between the individuals, which indicates that the gene is not linked to the studied phenotype.

Further research is needed to investigate the fertility problems in the Bernese mountain dog worldwide.

**Keywords:** Bernese mountain dog, fertility, semen quality, sperm morphology, heritability, genetic defects

# Innehållsförteckning

<b>Förkortningar .....</b>	<b>8</b>
<b>1. Inledning.....</b>	<b>9</b>
<b>2. Litteraturoversikt .....</b>	<b>10</b>
2.1. Mutationer .....	10
2.2. Spermimorfologi.....	11
2.2.1. Azoospermi och oligozoospermi .....	12
2.2.2. Astenozoospermi .....	12
2.2.3. Teratozoospermi .....	13
2.2.4. Svansdefekter .....	14
2.2.5. "Dag"-defekten .....	14
2.3. Ärftliga spermiesvansdefekter .....	15
2.3.1. Multiple morphological abnormalities of the sperm flagella .....	15
2.3.2. Sideroflexin 5 (SFXN5) .....	17
2.4. Polymerase Chain Reaction (PCR) .....	17
<b>3. Material och metod.....</b>	<b>18</b>
3.1. Hundar .....	18
3.2. Provinsamling .....	18
3.3. Spermaanalyzer.....	19
3.4. Definition av fenotyp och val av kandidatgener .....	20
3.4.1. Exkluderande faktorer .....	21
3.5. Genomanalyser.....	21
3.5.1. Sekvensering av genomiskt DNA.....	21
3.5.2. Sanger-sekvensering .....	21
3.6. Databaser .....	22
3.7. Stamtavleanalyser och dräktighetsstatistik.....	22
<b>4. Resultat.....</b>	<b>23</b>
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>29</b>
5.1. Kommande studier.....	31
<b>Referenser.....</b>	<b>32</b>
<b>Tack .....</b>	<b>38</b>
<b>Populärvetenskaplig sammanfattning .....</b>	<b>39</b>

## Förkortningar

AI	Artificiell Insemination
ARMC2	Armadillo repeat containing 2
BSH	Berner sennen (hund)
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
DNAH1	Dynein axonemal heavy chain 1
GWAS	Genome-wide Association Study
kbp	Kilobaspar
MMAF	Multiple Morphological Abnormalities of the sperm Flagella
NGS	Next-Generation Sequencing
NOA	Non-obstruktiv azoospermi
OA	Obstruktiv azoospermi
PCD	Primary Ciliary Dyskinesia
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDZ	Postsynaptic density-95/Discs large/Zona occludens-1
SLU	Sveriges lantbruksuniversitet
SFXN5	Sideroflexin 5
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
WES	Whole-Exome Sequencing
WHO	World Health Organisation



# 1. Inledning

Dräktighetsprocenten hos berner sennen i Sverige var mellan år 2011 och 2015, 65 % baserat på statistik över inrapporterade kullar och parade tikar som inte blivit dräktiga till rasklubben (Svenska Sennenhundklubbens avelsråd 2018). Det är 10-15 % lägre än hos andra hundraser. Dräktighetsprocenten har sedan dess gått ner ytterligare och var från 2016 till och med 2018, 60 % (Svenska Sennenhundklubbens avelsråd 2019). Reproduktionsproblematiken hos berner sennen tros bero på flera faktorer då inte bara dräktighetsprocenten minskar utan det även har setts en minskning av kullstorlekarna samt en ökning av förlossningsproblem och livmoderinflammationer (Svenska Sennenhundklubbens avelsråd 2018). Detta gör att avelsbasen på sikt ytterligare kan minska vilket innebär att sjukdomar med genetisk härkomst som finns i rasen kan bli ännu svårare att begränsa.

God spermakvalitet definieras som tillräckligt antal morfologiskt normala spermier med god motilitet (Linde-Forsberg & Forsberg 1989). England *et al.* (2010) klassificerade ärftligheten för spermimotilitet hos hund som måttlig. Sedan dess visar tillgänglig litteratur att väldigt lite forskning har gjorts avseende ärftligheten för nedsatt fertilitet hos hund, speciellt fertiliteten hos hanarna och deras spermakvalitet.

Hos människa drabbas 15 % av alla par av infertilitet och manlig infertilitet är en bidragande faktor i 30–40 % av fallen och ensam faktor i 20 % av fallen (Thonneau *et al.* 1991; Sharlip *et al.* 2002; Cassatella *et al.* 2013; Tamrakar & Bastakoti 2019). Hur stor den hanliga faktorn är vid fertilitetsproblematik hos hund är ännu okänt.

Syftet med denna studie var att undersöka om det finns en genetisk bakgrund till nedsatt fruktsamhet hos berner sennnenhanar genom att:

- 1) med hjälp av stamtavlor från Svenska Kennelklubben undersöka om det finns en gemensam nämnare i stamtavlorna mellan de hanar som provtagits inom ramen för studien.
- 2) med en så kallad kandidatgenapproach undersöka om det finns mutationer i någon av två utvalda delar av genomet som går att koppla till den nedsatta fruktsamheten.

## 2. Litteraturöversikt

### 2.1. Mutationer

Genetisk variation är grunden till evolution och biologisk mångfald (Griffiths 2012). Det är en viktig process som gör att en individ i en art potentiellt kan klara sig bättre än en annan. De två huvudsakliga grupperna av genetiska variationer är mutationer och rekombinationer, där mutationer ändrar innehållet i DNA-strängen medan rekombinationer är utbyte eller sammanfogning av hela eller delar av genomet.

Mutationer är speciellt intressanta när man tittar på genetisk variation ur ett evolutionärt perspektiv eller vid selektion (avel) eftersom de producerar utgångspunkten för evolutionära innovationer (Nicholas 2009; Griffiths 2012). I grund och botten så uppkommer mutationer i huvudsak på grund av misstag av enzymet DNA-polymeras som uppkommit när DNA replikeras. Oftast korrigeras dessa misstag av cellens egna DNA-reparationsenzymer så att de inte får någon negativ påverkan på cellen, men en viss grad av mutationer måste tillåtas av cellen för att den skall kunna anpassa sig. Ibland kan det ske misstag i replikationen som leder till DNA-förändringar i åtminstone en celldelning, ibland i flera. Om mutationen sker i en könscell så kan mutationen föras vidare till avkomman. Mutationer kan vara av olika typer, från utbytet av en enda bas till försvinnandet av en del av eller en hel kromosom. Bland dessa är punktmutationer vanligast. Punktmutationer refererar till modifieringen av ett baspar eller ett litet antal angränsande baspar och brukar delas in i två huvudgrupper; bassubstitution och basdeletion/-insertion. Vid substitution byts ett baspar ut mot ett annat, t.ex. GGTAGA blir GGTAGC. Om substitutionen sker i ett proteinkodande exon kan substitutionen leda till ett aminosyreutbyte, detta kallas då för en missensmutation. Det kan också vara så att utbytet fortfarande kodar för samma aminosyra, en tyst mutation, eller att utbytet leder till ett stoppkodon så att translationen av proteinet avslutas i förtid, en s.k. nonsensmutation. Vid en deletion försvinner en nukleotid och vid en insertion adderas en bas vilket, om det sker i den kodande delen av en gen, leder till en förskjutning av

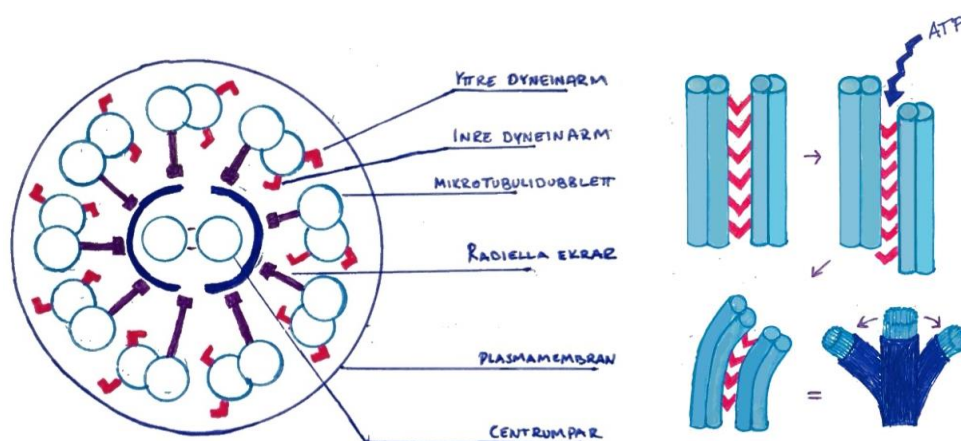
den genetiska kodens öppna läsram. Detta kallas på engelska för en frameshift-mutation.

Inom genetiken delas mutationerna även in beroende på den effekt de har på proteinets funktion d.v.s så kallade "loss-of-function"-mutationer och "gain-of-function"-mutationer, som hänvisar till fenotypsuttrycket som en mutation får (Griffiths *et al.* 2000). Eftersom mutationer uppstår slumpmässigt så uppstår "loss-of-function" oftare än "gain-of-function". En "loss-of-function"-mutation innebär att proteinet tappar sin normala funktion helt eller delvis. Dessa mutationer är i regel recessiva, eftersom en kopia av en funktionell allel, s.k. vildtyp som producerar ett normalt protein, ofta är tillräcklig (haplosufficient) för att kompensera för den muterade allelen. "Gain-of-function"-mutationer är mycket mer ovanliga men när de inträffar så leder de till att proteinet som genen kodar för får en ny funktion. Dessa mutationer är oftast dominanta vilket innebär att även heterozygoter genererar en ny fenotyp.

## 2.2. Spermimorfologi

En normal spermie består av huvud (som täcks till strax över hälften av akrosomen vilket är en organel bestående av enzymer), hals, mittstycke och svans. Svansen, eller flagellen, kan i sin tur delas in i huvudstycke och ändstycke (Feldman & Nelson 2004). Axonemet utgör flagellens cytoskelett och är basen för en korrekt sammansatt flagell. Under spermatogenesisen bildas flagellen genom att axonemet förlängs från basen av huvudet (Lehti & Sironen 2017). Ett axonem består av två mikrotubuli med en ring av nio dubblett-mikrotubuli med dyneinarmar (inner- och ytterarmar) som sitter fast i mikrotubulins alfahelixar (Neesen *et al.* 1997). För att en spermie skall kunna röra sig framåt behöver den en flagell och det är aktionen i dyneinarmarna som gör att spermien kan förflytta sig. Beroende på art så innehåller dyneinarmarna två eller tre tunga kedjor med en ATPas-funktion som tillåter dem att vandra längs med raden av mikrotubuli. Genom att var sida av dyneinarmarna aktiveras i olika faser så kan flagellen röra sig i ett våglikt mönster (Ishikawa 2017) (Figur 1).

Vid fertilitetsutredningar, både på hund och människa, görs en allmänklinisk undersökning och en fullständig andrologisk undersökning med spermaanalys (Feldman & Nelson 2004; Okutman *et al.* 2018). Vid spermaanalysen kan spermbilden delas in i fyra olika typer: azospermi (total avsaknad av spermier i ejakulatet), oligozoospermi (nedsatt antal spermier i ejakulatet), teratozoospermi (onormal spermimorfologi) samt astenozoospermi (nedsatt spermimotilitet). Olika typer av avvikelser vid en spermaanalys har hos människa kunnat associeras till olika typer av mutationer (Okutman *et al.* 2018).



Figur 1. Axonem med dess delar samt en funktionell skiss på hur motorproteinet dynein böjer flagellen så att en våglig rörelse genereras. Illustration av författaren baserat på Campbell Biology 9th ed. (Reece et al. 2011).

### 2.2.1. Azoospermi och oligozoospermi

Vid azoospermi och oligozoospermi finns inga eller få spermier i ejakulatet (Feldman & Nelson 2004). Azoospermi kan antingen vara obstruktiv eller icke-obstruktiv (Oates 2012). Vid en obstruktiv azoospermi (oa) är det inget fel på spermatogenesisen men det finns en blockering eller störning någonstans i spermiepassagen som gör att spermier inte kan passera medan det vid en non-obstruktiv azoospermi (noa) är fel i spermatogenesisen av någon anledning. Både oa och noa kan vara kongenital eller förvärvad. Kongenital oa beror oftast på att sädesledarna saknas på både höger och vänster sida. Hos människa beror detta oftast (80-90 % av fallen) på en mutation i cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)-genen (Bobadilla *et al.* 2002; Thauvin-Robinet *et al.* 2013). Både noa och oligozoospermi beror hos människa ofta på variationer i karyotyp. Vanligast är en extra X-kromosom (Klinefelters syndrom) (Mierla *et al.* 2014) och näst vanligast är mikrodeletion i Y-kromosomen (Krausz *et al.* 2014; Okutman *et al.* 2018).

### 2.2.2. Astenozoospermi

Astenozoospermi betyder att spermier i ett ejakulat har minskad rörlighet. Ökande framåtrörelse är normalt för spermier och tyder på livsdugliga spermier med en god förmåga att förflytta sig till ägget för att kunna fertilisera det (Feldman & Nelson 2004). I normal sperma bör mer än 70 % av spermier röra sig kraftigt framåt. Enskilda spermier ska heller inte röra sig i cirklar eller i sidled, men det är okänt hur stor andel, av ett annars normalt ejakulat, med onormal rörelse som ger infertilitet hos hundar. Mer än 50 % spermier med nedsatt/onormal rörelse anses som ett signifikant fynd, speciellt hos en infertil hund. Vissa morfologiska defekter, till exempel vissa svansdefekter, kan också påverka motiliteten negativt (Feldman & Nelson 2004; Chenoweth 2005). Ärfthigheten avseende motilitet anses vara

måttlig, vilket innebär att avel för bättre spermimotoilitet skulle kunna vara effektiv om en hundras har problem med den (England *et al.* 2010). Ett flertal gener som påverkar nedsatt fertilitet hos människa har associerats med nedsatt motilitet men andra spermieegenskaper verkar påverkas samtidigt, så som antal eller morfologi (Guerra *et al.* 2019).

### 2.2.3. Teratozoospermi

Teratozoospermi är en grupp av defekter som inte är enhetlig och fenotypen hos en individ kan bestå av endast en eller flera morfologiska defekter samtidigt (Guerra *et al.* 2019). Teratozoospermi definieras av World Health Organisation (WHO) som: ”när procenten morfologiskt normala spermatozoer ligger under den nedre referensgränsen” (WHO 2010). Vanligtvis har en frisk hanhund  $\geq 70\%$  morfologiskt normala spermier (Feldman & Nelson 2004).

Morfologiska defekter delas in i primära och sekundära (Tabell 1), där de primära anses uppkomma under spermatogenesisen i testikeln medan de sekundära uppkommer under transporten i bitestikel och sädesledare (Feldman & Nelson 2004). Hos tjur och hund har man också sett att defekterna kan delas in efter deras förväntade påverkan på fertiliteten och grupperas då som major eller minor defekter (Tabell 1) (Kolster 2018; Blom 1983 se Noakes *et al.* 2019).

Tabell 1. Gruppering av morfologiska spermieförändringar hos hund. Modifierad efter Feldman & Nelson (2004) och Kolster (2018)

Defekter	Primär/Sekundär	Major/Minor
Pyriformt huvud	Varierande	Varierande
Mikrocefali	Primär	Major
Makrocefali	Primär	Minor
Nukleära vakuoler	Primär	Major
Lösa huvuden	Sekundär	Minor
Lös akrosom	Sekundär	Major
Abaxial svansinfästning	Sekundär	Minor
Dubbla mittstycken	Primär	Major
Fransiga, tunna, mittstycken	Primär	Major
Förtjockade mittstycken	Primär	Major
Trasiga mittstycken	Primär	Major
Knickade eller böjda mittstycken	Sekundär	Minor
Dagdefekten	Primär	Major
Proximala cytoplasmatiska droppar	Primär	Major
Ihoprullade svansar	Sekundär	Minor
Böjda svansar	Sekundär	Minor
Multipla svansar	Sekundär	Minor
Distala cytoplasmatiska droppar	Sekundär	Minor

Tabell 2. Normalvariation hos hund av morfologiska spermiedefekter

	<i>n</i>	<i>Huvuddefekter</i>	<i>Akrosomdefekter</i>	<i>Mittstycksdefekter</i>	<i>Svansdefekter</i>
<b>Tesi <i>et al.</i> (2018)</b>	30	11,3 ± 2,7	12,0 ± 2,9	21,2 ± 3,2	16,1 ± 3,3
<b>Oettlé (1993)</b>	45	4,6 ± 5,1	3,2 ± 5,9	3,6 ± 5,4 + 1,2 ± 2,1	4,1 ± 4,3
<b>Bartlett (1962)</b>	3	11 ± 1,4	Ej angivet	21 ± 5,0	7 ± 0,8

#### 2.2.4. Svansdefekter

Det finns studier som visar att normalvariationen av medelvärdet för svansdefekter hos friska hundar varierar mellan  $7,0 \pm 0,8$  ( $n=3$ ),  $4,1 \pm 4,3$  ( $n=45$ ) och  $16,1 \pm 3,3$  ( $n=30$ ) (Bartlett 1962; Oettlé 1993; Tesi *et al.* 2018) (Tabell 2). De bakom-liggande orsakerna till andelen svansdefekter hos en hund är komplex där även faktorer som ålder och storlek påverkar uppkomsten av dessa svansdefekter (Tesi *et al.* 2018).

#### 2.2.5. "Dag"-defekten

"Dag"-defekten beskrevs för första gången 1966. Det är en spermiedefekt som hittades hos två danska jerseytjurar (varav den förste hette Dag) som var helbröder (Blom 1966). Hos de båda tjurarna hade 40–50 % av spermerna vikta eller ihop-rullade svansar. Defekten verkade utgå från den distala delen av spermernas mittstycke och kunde ses med eller utan en kvarvarande distal droppe (Blom 1966). Dag-defekten kan ibland också ses i normal sperma i låga nivåer (<4 %) som ett svar på en obalans i testikeln eller bitestikeln. Nivåer över 50 % har setts ha en allvarlig påverkan på fertiliteten (Chenoweth 2005). Hos tjur är alltid de ihop-rullade svansarna omgivna av ett intakt plasmamembran (Koefoed-Johnsen *et al.* 1980). Dag-defekten klassas som en primär och major defekt, vilket gör att den skiljer sig från andra svansdefekter som istället klassas som minor defekter (Blom 1973; Feldman & Nelson 2004). Specifika studier om Dag-defekten hos hund finns inte tillgängliga men defekten har beskrivits hos en tvåårig engelsk bulldog (Rota *et al.* 2008).

Koefoed-Johnsen *et al.* bekräftade 1980 sin teori om att Dag-defekten nedärvs med autosomal, recessiv arvsång. För att bekräfta det parade forskarna en heterozygot tjur med 120 av sina döttrar från en mor som inte var bärare. Teorin då var att var åttonde avkomma borde få Dag-defekten. Figur 2 visar möjliga genotyper som döttrarna till en heterozygot tjur kan få om han paras med en ko som inte bär på defekten. Figur 3 visar möjliga genotyper som avkommorna kan få när samma tjur sedan paras med dessa två typer av döttrar. En åttondel av avkommorna blir då homozygot recessiva.

Vid undersökning av spermiesvansar med Dag-defekten sågs ett avvikande antal mikrotubuli-dubletter i axonemen (Blom 1973). Ofta är det en effekt av att ett eller flera mikrotubuli har fallit bort.

Heterozygot tjur	Homozygot dominant ko	
	A	A
	A	AA AA
a	Aa	Aa

Figur 2. Möjliga genotyper hos avkomman vid parning av homozygot dominant ko och heterozygot tjur.

Heterozygot tjur	Homozygot dominant ko		Heterozygot ko	
	A	A	A	a
	A	AA AA	AA	Aa
a	Aa	Aa	Aa	aa

Figur 3. Möjliga genotyper hos avkomman vid parning av homozygot dominant eller heterozygot ko och heterozygot tjur.

### 2.3. Ärftliga spermiesvansdefekter

Litteratursökning visar att få studier finns om ärftligheten eller den genetiska orsaken bakom spermiedefekter hos hund. Ett turkiskt forskarteam genomförde en helgenomstudie på 46 hanar av rasen aksaray malakli för att försöka undersöka sambandet mellan enbaspolymorfi och reproduktionsstörningar (İnanç *et al.* 2018). Innan dess hade England *et al.* (2010) genomfört en retrospektiv studie av generell ärftlighet av spermakvalitet hos assistanshundar (labrador retriever och golden retriever) genom att undersöka motilitet, totalantal, andel levande/döda spermier, morfologiskt normala spermier hos föräldradjur och deras avkommor. Dessförinnan fanns enligt ovan nämnda studie inget publicerat avseende ärftligheten av spermakvalitet. Hos människa finns det däremot mer forskning i området (Hargreave 2000; Aston & Carrell 2009; Ben Khelifa *et al.* 2014; Okutman *et al.* 2018; Coutton *et al.* 2019). Människa och hund är ofta bra att jämföra på grund av likheten mellan arterna, mer än hälften av de genetiska sjukdomar som har hittats hos hund finns även hos människa (Cassatella *et al.* 2013; OMIA u.å.).

#### 2.3.1. Multiple morphological abnormalities of the sperm flagella

Multiple morphological abnormalities of the sperm flagella (MMAF) är ett syndrom som orsakar en specifik sorts astenoteratozoospermi där en kombination av en onormal flagellfenotyp, såsom korta, böjda, ihopvikta, oregelbundna eller frånvarande flageller samt påtagligt nedsatt spermimotoilitet förekommer (Ben Khelifa *et al.* 2014). Hittills har sju gener som är associerade med MMAF

identifierats hos människa och mus: *DNAH1*, *CFAP43*, *CFAP44*, *CFAP69*, *FSIP2*, *WDR66* och *ARMC2*. Bland dessa gener har det visats att *CFAP*-generna (*CFAP43*, *CFAP44* och *CFAP69*) oftast ger korta svansar eller total avsaknad av svansar, medan *FSIP2* och *ARMC2* även ger hoprullade svansar (Coutton *et al.* 2019).

#### *Dynein axonemal heavy chain 1 (DNAH1)*

*DNAH1* (tidigare kallad *H/MDHC7* eller *DNAHC1*) är en gen som uttrycks i bland annat testis och kodar för en tung kedja i ett axonemalt dynein (Ben Khelifa *et al.* 2014). Infertiliteten orsakad av mutationer i *DNAH1*-genen beror på att spermier mister sin förmåga att förflytta sig från depositionsstället i uterus till äggladare och kan därför inte befrukta ägg (Neesen *et al.* 2001). Hos ”knock-out”-möss där *DNAH1*-genen slogs ut så att inget protein kunde produceras var hanar som var homozygota för mutationen infertila medan honor fortfarande kunde producera avkomma. Alla spermier hos hanar som var homozygota för mutationen (*DNAH1* -/-) var orörliga eller med kraftigt nedsatt motilitet. Vid artificiell befruktning kan spermier dock befrukta äggen. Hos heterozygota hanar sågs ingen signifikant skillnad i motilitet jämfört med hanar av vildtyp. Den tunga dyneinkedjan som *DNAH1* kodar för är jämnt fördelad längs hela flagellen och vid avsaknad av *DNAH1* minskar den laterala amplituden av ett flagellslag med ungefär 50 % vilket skulle kunna vara anledningen till den förlorade hastigheten hos dessa spermier.

I flera humanstudier har mutationer i *DNAH1*-genen observerats hos män diagnostiserade med infertilitet och en MMAF-fenotyp på sina spermier (Ben Khelifa *et al.* 2014; Amiri-Yekta *et al.* 2016; Sha *et al.* 2017; Tang *et al.* 2017; Wang *et al.* 2017). Mutationerna har påvisats på olika ställen i genen men ett flertal individer från olika familjer och ursprung var muterade i exon 73 (Sha *et al.* 2017; Tang *et al.* 2017; Wang *et al.* 2017). Mutationen hos samtliga individer var en deletion av två baser (C och T) i position 11726 och 11727 i exon 73. Mutationen ger en frame-shift av den öppna läsrampen och leder till ett för tidigt avslutande av proteinet p.g.a. att det bildas ett för tidigt stoppkodon. Individerna i studierna var både homozygota och heterozygota för mutationen. I en annan studie sågs mutationen i intron 73 i närheten av mutationen i exon 73 (Ben Khelifa *et al.* 2014). Den mutationen sågs hos två bröder och en obesläktad individ.

#### *Armadillo repeat containing 2 (ARMC2)*

*ARMC2* är en gen belägen på kromosom tolv och är strax över 108 kilobaspar (kbp) lång hos hund (Ensembl genome browser, 2020 s. 2). Studier av hundens *ARMC2*-gen i relation till fertilitet saknas men i en humanstudie analyserade Coutton *et al.* (2019) prover från 168 män med hjälp av whole-exome sequencing (WES). Samtliga individer uppvisade en typisk MMAF-fenotyp, som karaktäriseras av en grav astenozoospermi (total spermimotoilitet under 10 %) samt minst tre av



följande svansdefekter på minst 5 % av spremierna: kort, böjd, ihoprullad, oregelbunden eller avsaknad av, svans. De fann då att fem av dessa individer hade en mutation i *ARMC2*-genen, en gen som tidigare inte beskrivits vara associerad med uppkomst av MMAF. Alla fem individer var homozygota i sina genvarianter och uppvisade alla olika varianter. Fyra av individerna uppvisade loss-of-function-varianter och den femte uppvisade troligen en missense-mutation till följd av ett utbyte av en nukleotid.

### 2.3.2. Sideroflexin 5 (SFXN5)

Hos den turkiska hundrasen aksaray malakli har forskare med hjälp av en genome-wide association study (GWAS) identifierat en single nucleotide polymorphism (SNP) (position 17:49832764) i intron 6 i genen sideroflexin 5 (*SFXN5*) som kunnat associeras till spermiemorfologi (İnanç *et al.* 2018). Effekten av *Sfxn5*-genen har studerats mycket sparsamt men sideroflexin 5-proteinet är involverat i katjon- och aminosyratransport (GeneCards u.å.). *SFXN5*-genen består av uppskattningsvis 120 kbp och 14 exoner (Lockhart *et al.* 2002).

## 2.4. Polymerase Chain Reaction (PCR)

PCR är en metod som utvecklades på 1980-talet av kemisten Kary Mullis (Mullis *et al.* 1986). PCR är en molekylärbiologisk enzymanalys som kan amplifiera specifika DNA-fragment från längre DNA-sekvenser. PCR är en känslig metod eftersom det endast behövs mycket små mängder av DNA och olika typer av vävnader kan användas för preparation av genomiskt DNA, såsom blod, hud, hår, saliv och andra kroppsvätskor. För att en PCR ska fungera behövs primers. Primers är syntetiska korta enkelsträngade DNA-molekyler med komplementär sekvens till den delen av genen som man vill amplifiera. Primers fungerar också som en start och med hjälp av enzymet DNA-polymeras binds nukleotider ihop till en slutlig produkt. Nukleotiderna inkluderar de fyra baserna adenin, thymin, cytosin och guanin. Dessa fyra baser bygger upp hela genomet. Vid en PCR-analys så kombinerar dessa reagens (DNA-polymeras, nukleotider, primers och DNA) i en buffertlösning med rätt jonstyrka och pH och körs i ett instrument som tillåter DNA att amplifieras i tre steg upprepade gånger tills tillräcklig mängd DNA har producerats. Dessa steg är denaturering; när dubbelsträngat DNA blir enkelsträngat DNA, hybridisering; då primers binder in till det enkelsträngade DNA:t samt elongering; då syntetisering av nya DNA-kopior sker.

## 3. Material och metod

### 3.1. Hundar

Sextiofem hanar av rasen berner sennenhund (även kallad berner sennen), över 15 månaders ålder (åldern på hundarna varierade mellan 16 och 137 månader), registrerade i Svenska kennelklubbens register rekryterades med hjälp av rasklubben, uppfödare och annonsering via sociala medier, för att blod- och spermavprov skulle kunna erhållas. I slutet av provinsamlingen samlades också helblod i EDTA-rör från en genetiskt intressant berner sennentik. Samtliga hundar i studien var enligt sina ägare friska vid provtagningstillfället. Ingen av dem uppvisade några sjukdomstecken.

### 3.2. Provinsamling

Serum och helblod samlades in från 66 individer och sperma från 65 individer. Spermavprov samlades in genom manuell manipulation i närvaro av en löpande teasertik enligt Linde-Forsberg (1991). På spermavproverna gjordes en första preliminär bedömning av motilitet med fasmikroskop. Därefter gjordes utstryk (två slätutstryk och två vallutstryk) och i ett provrör blandades sperma med buffrad formalin. Sperman centrifugerades och delades upp i fem rör (fyra rör med seminalplasma och ett rör med spermier).

Hanarna gavs alfabetiska koder mellan A-Ö, AA-AÖ eller BA-BG. Tiken gavs kod Tik 1.

Helblod från hanarna samlades in i EDTA-rör och serumrör. Blodproverna togs enligt etablerad rutin från *vena cephalica*. Proverna togs vid olika tidpunkter under dygnet. Efter cirka 20 minuter, när provet taget i serumrör hade koagulerat, centrifugerades det och serumet delades upp i fyra rör. Helblodet från EDTA-röret centrifugerades och delades upp i ett rör med plasma och ett med blodkroppar. Samtliga prover förvarades sedan i -80 °C.

Proverna togs såväl i Uppsala som på andra orter, av veterinärer med AI (Artificiell Insemination)-behörighet. Veterinärerna på de andra orterna skickade därefter provmaterialet till Uppsala. Proverna inkom från 15 olika provtagare från 14 olika kliniker i totalt 12 svenska län. Ungefär 35 % av proverna togs vid Universitetsdjursjukhuset vid Ultuna, SLU.

För provmaterial som samlades in användes etiskt godkännande (Dnr: 5.8.18-17395/2018), medgivandebblanketter skrevs även under av djurägarna.

### 3.3. Spermaanalyzer

Bedömning av samtliga hanhundars spermakvalitet gjordes med avseende på spermernas antal, motilitet och morfologi. I anslutning till provinsamlingen gjordes en bedömning av motiliteten. Den morfologiska bedömningen gjordes, undantaget några bedömningar av totalantal, av en och samma biomedicinska analytiker för samtliga prover.

Totalantalet bedömdes genom bestämning av koncentrationen i en Bürker-hematocytometer. Antalet spermier i 25 rutor (en ruta motsvarar  $1/250 \text{ mm}^3$ ) i kammaren räknades. Detta antal multiplicerades sedan med 250 för att få antalet spermier per  $\text{mm}^3$ . Därefter multiplicerades antalet med eventuellt spädningsgrad och dividerades sedan med antal räknade rutor, detta ger koncentrationen (Figur 4). Totalantalet bestämdes genom att koncentrationen multiplicerades med volymen.

De morfologiska defekterna bedömdes i buffrad formalinlösning och 200 spermier bedömdes med fas-kontrastmikroskop med en förstoring på  $10 \times 100$ . Alla defekter på spermerna räknades och klassificerades enligt ett system utvecklat av Bane (1961). Defekterna som räknades var proximala cytoplasmatiska droppar, distala cytoplasmatiska droppar, lösa huvuden, specifika akrosomdefekter, övriga akrosomfel, kärnsäck, mittstycksfel, enkel svansböjning, hoprullade svansar och dubbelvikta svansar.

Specifika huvuddefekter och svansdefekter räknades också i Williamsfärgade utstryk där 500 spermier räknades och deras defekter klassificerades enligt ett system utvecklat av Lagerlöf (1934): päronformade huvuden, huvud smala vid basen, onormal huvudkontur, underutvecklade spermier, lösa onormala huvuden, smala huvuden, huvud som varierar i storlek, abaxial infästning av svans på huvud, enkel svansböjning, hoprullade svansar och dubbelvikta svansar.

$$\text{Spermiekoncentration} = \frac{n \times s \times 250}{a}$$

$n$  = antal spermier

$s$  = spädningsgrad

$a$  = antal rutor

Figur 4. Formel för uträkning av spermiekoncentration.

### 3.4. Definition av fenotyp och val av kandidatgener

Med hjälp av databasen PubMed (pubmed.ncbi.nlm.nih.gov) togs litteratur fram för att göra ett urval av troliga gener som kan vara inblandade i att bidra till den fenotyp som de affekterade hundarna i studien uppvisade.

Vid analys av samtliga hundars spermier var det tre hundar som antingen var azoospermiska eller oligozoospermiska. Dessa tre räknades därför inte in i analysen av de morfologiska spermiedefekterna. Vid sammanställning av de morfologiska spermiedefekterna var medelvärdet för svansdefekter hos hundarna i projektet  $26,3 \pm 19,6$  %, vilket är högre än de medelvärden som tidigare har rapporterats som normalvariation. Övriga defekter var inom normalvariationen enligt tidigare studier (Tabell 2-3). Det avvikande medelvärdet för svansdefekter tyder på en förhöjd andel svansdefekter i studiegruppen jämfört med normalvariationen. Baserat på den morfologiska bedömningen av spermierna identifierades denna avvikelse som trolig fenotyp lämplig för vidare studier av genetisk påverkan. Fenotypen bestämdes till >20 % svansdefekter, vilket var 33 av hundarna. Valet av kandidatgener motiveras i litteraturdelen. Generna *DNAH1* och *SFXN5* har i tidigare litteratur båda uppvisat förändringar i specifika positioner av generna medan genen *ARMC2* är mindre undersökt vilket ligger till grund för den slutgiltiga begränsningen att sekvensera endast *DNAH1* och *SFXN5* inom ramen för detta arbete.

Tabell 3. Medelvärden för spermiedefekter hos studerade BMD-hanar

	<i>n</i>	<i>Mean</i>	<i>StDev</i>
Patologiska huvudformer (%)	62	7,3	±5,9
Akrosomdefekter (%)	62	3,7	±6,1
Felaktiga mittstycken (%)	62	3,3	±3,5
Svansdefekter (%)	62	26,3	±19,6

### 3.4.1. Exkluderande faktorer

Det är beräknat att upp till fyra tusen gener kodar för proteiner som är inblandade i spermatogenesisen och nedsatt spermiefunktion, varav de flesta sitter på autosomala kromosomer (Hargreave 2000; Jan *et al.* 2017). Eftersom hundarna inte uppvisade några andra kliniska tecken på ohälsa valdes således gener som gav syndromiska sjukdomar bort. Exempel på några av dessa är generna inblandade i BBSom-komplexet som orsakar Bardet–Biedls syndrom samt gener som orsakar PCD (primary ciliary dyskinesia) (Mäkeläinen *et al.* 2020). Båda gengrupperna orsakar en liknande fenotyp i spermerna men båda två påverkar cilierna i resten av kroppen vilket uttrycks genom bland annat luftvägssymptom (Beales *et al.* 1999; Grave-sande & Omran 2005).

## 3.5. Genomanalyser

### 3.5.1. Sekvensering av genomiskt DNA

Blodkropparna från EDTA-rören användes för att preparera genomiskt DNA med hjälp av en QiaSymphony SP med QiaSymphony DSP DNA-kit från sex av de provtagna hundarna. Dessa prover skickades sedan till Genetiska institutionen på Berns universitet för helgenomssekvensering med Illumina Next-Generation Sequencing (NGS) metodologi. NGS sekvenserar DNA genom att DNA-polymeras märker deoxyribonucleotide triphosphates (dNTPs) med fluorescens i DNA-segmentet under DNA-syntesen. Under varje cykel identifieras sedan nukleotiderna med hjälp av denna fluorescens. Den största skillnaden jämfört med andra analysmetoder är att Illumina NGS sekvenserar genomet i fragment som sedan pusslas ihop av bioinformatiker.

### 3.5.2. Sanger-sekvensering

Med hjälp av onlineversionen av Primer3Plus (Wageningen University Bioinformatics u.å.; Untergasser *et al.* 2007), designades forward och reverse primers för att kunna amplifiera områden av intresse i *DNAH1* (forward 5'-GTACACAGCCGGGAGATAA-3' och reverse 5'-CGTAGGTAGGCTGGATCTGG-3' och *SNFX5* (forward 5'-CAGAGGCCAGATCCTGAGAG-3' och reverse 5'-GACCAGGCATTTGTTGAGGT-3'). Primer oligonukleotidsyntes gjordes av företaget TAG Copenhagen. Amplifiering och sekvensering gjordes sedan med hjälp av BigDye Direct Cycle Sequencing Kit i en GeneAmp PCR System 9700. Fyra nanogram genomiskt DNA tillsattes i 10 µl amplifikationslösning med en annealingtemperatur på 60 °C (enligt tillverkarens protokoll). Cykelsekvensering utfördes med både forward- och reverse-primers i en ABI 3500XL DNA Analyzer. Sekvenserna analyserades med hjälp av en CodonCode Aligner v5.0.2.

### 3.6. Databaser

För att undersöka annoteringen, storleken samt proteinfunktioner för generna som hittats i litteraturstudien användes databaserna *Ensembl genome browser*; *The Human Protein Atlas* och *UCSC Genome Browser*. Referensgenomet som användes var *CanFam3.1*.

I *Ensembl genome browser* (u.å.) jämfördes de sekvenser hos människa som framkommit i litteraturstudien som signifikanta för fenotypen med motsvarande sekvens hos hund. Dessa sekvenser användes sedan för att designa primers.

### 3.7. Stamtavleanalyser och dräktighetsstatistik

Med hjälp av Svenska kennelklubbens databas SKK hunddata, togs samtliga av de 65 hundarnas stamtavlor fram och släktskap undersöktes mellan samtliga 65 hundar. Därefter noterades vilka hundar som påvisade fenotypen (n=33) och dessa undersöktes i en nedärvningsmodell enligt mendelsk genetik. Inavelsgraden för samtliga hundar togs fram från SKK:s databas för avelsdata där inavelsgraden beräknas över fem generationer.

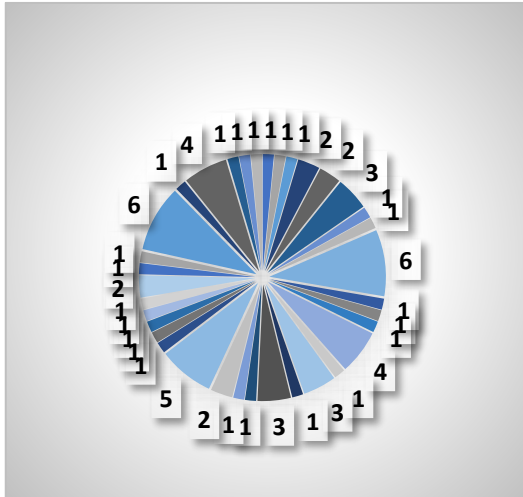
Vid provtagning fick hundägarna fylla i uppgifter om hanhundarnas eventuella parningar och dräktighetsresultat för dessa parningar. Detta tillsammans med Svenska sennenhundklubbens (SSHK:s) dräktighetsstatistik studerades översiktligt för att se eventuella samband mellan avelsdjur samt parningsmönster så som frekvens och kombinationer mellan individer.

## 4. Resultat

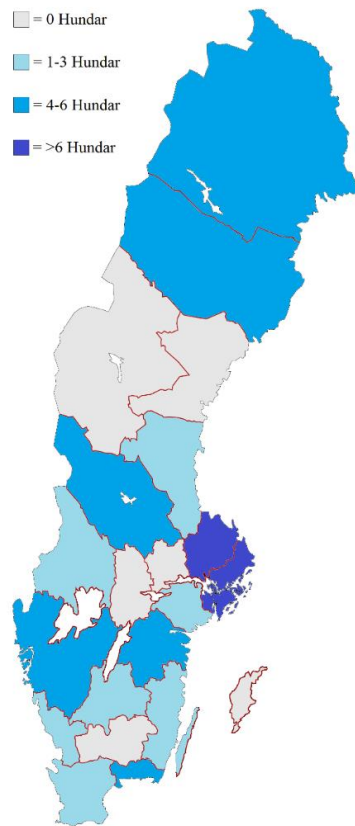
Samtliga stamtavlor för hundar i testgruppen (n = 65) undersöktes för att försöka se ett samband mellan nedärvningsmönster och svansdefekter. Samtliga hundar hade minst en gemensam anfader. I vidare analys av stamtavlorna hittades åtminstone åtta stamfäder som förekom i >80 % av stamtavlorna inom de åtta senaste generationerna. I många av fallen förekom dessa individer flera gånger hos en och samma hund. En av dessa stamfäder förekom i stamtavlorna för alla de 65 hundarna som medverkade i studien. Ingen märkbar skillnad i fenotyp kunde ses beroende på om de hade en viss stamfader i stamtavlan eller inte (Tabell 4). För att undvika confounders så som ålder, då ålder som tidigare nämnts är en vanlig orsak till dålig spermakvalitet, gjordes samma undersökning med endast unga individer, inte heller då sågs något samband mellan morfologiska avvikelser och dessa stamfäder. Trots de gemensamma anfäderna var inavelsgraden hos hundarna i studien relativt låg,  $0,84 \pm 0,14$ . En av dessa anfäder presenteras i en nedärvningsanalys i Figur 10.

Tabell 4. Andel svansdefekter hos de studerade hanarna kopplat till olika gemensamma anfäder

	Andel besläktade med Anfader 1	Andel besläktade med Anfader 2	Andel besläktade med Anfader 3	Andel besläktade med Anfader 4	Andel besläktade med Anfader 5	Andel besläktade med Anfader 6	Andel besläktade med Anfader 7	Andel besläktade med Anfader 8
Hundar med <20% svansdefekter	86%	83%	76%	90%	100%	90%	97%	86%
Hundar med >20% svansdefekter	94%	86%	92%	89%	100%	92%	86%	97%
Hundar <48 månader med <20% svansdefekter	95%	100%	86%	93%	100%	100%	100%	93%
Hundar <48 månader med >20% svansdefekter	100%	93%	89%	89%	100%	95%	89%	100%



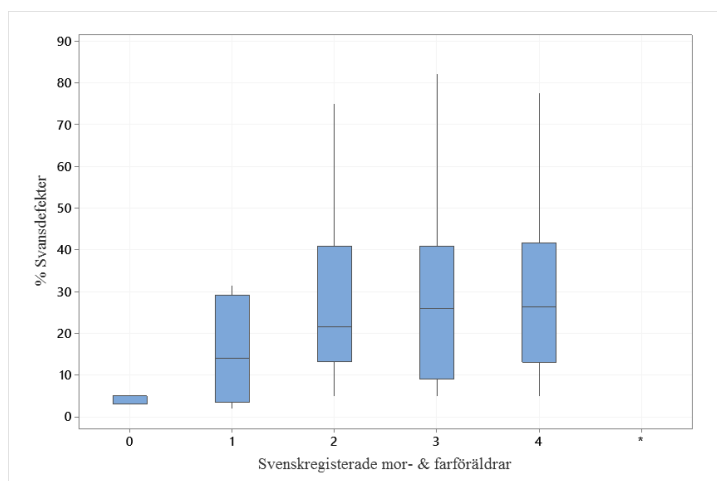
Figur 5. Fördelning av antal hundar ( $n = 65$ ) från de 35 olika uppfödarna i studien.



Figur 6. Geografisk fördelning av de svenskfödda hundarna ( $n=58$ ) efter födelselän.  
[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:SW\\_E-Map\\_L%C3%A4n.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:SW_E-Map_L%C3%A4n.svg) CC-licens (CC BY-SA 2.5). Bearbetad av författaren 2020-12-08 i enlighet med licensen.

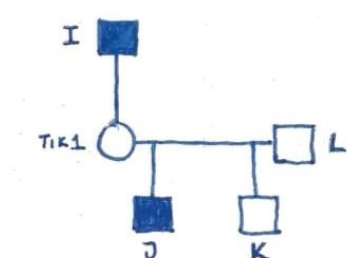
De 65 hundarna i studien kom från 35 olika uppfödare (Figur 5). Antalet hundar från varje uppfödare varierade mellan en och sex. Sju av hundarna i studien var importerade, övriga var födda i Sverige. Hundarna var födda i totalt 15 olika län (Figur 6). I vidare undersökning av hundarnas härkomst noterades antalet svenskregistrerade mor- & farföräldrar för varje individ. Detta jämfördes sedan med hundarnas procentuella förekomst av svansdefekter. Det gick då att se en skillnad som tyder på en ökning av svansdefekterna i den svenska populationen (Figur 7).





Figur 7. Låddiagram över den procentuella fördelningen av svansdefekter hos hundarna i studien kopplat till antal svenskregistrerade mor- & farföräldrar hos en individ.

Vid analys av stamtavlor noterades en familjegrupp med två bröder (hund J & K), deras far (hund L) och morfar (hund I) (Figur 8). En av bröderna (J) uppvisade den valda fenotypen (34,5 % svansdefekter) medan den andra brodern (K) inte gjorde det (5 % svansdefekter). Fadern (L) uppvisade inte fenotypen men låg i det övre spannet för normalvariation gällande svansdefekter (13,5 % svansdefekter). Han hade en ökad andel mittstyckesdefekter och proximala droppar. Fadern hade haft en dräktighetsprocent på 50 %. Morfadern (I) uppvisade fenotypen i det högre intervallet (47,1 % svansdefekter)



Figur 8. Nedärvningsmodell över familjegrupp som studerades. Hanar som uppvisar fenotypen illustreras genom mörkfärgad fyrkant (morfar överst och ena brodern nere till vänster).

Baserat på stamtavleanalyserna togs sex individer fram som lämpliga kandidater för helgenomsekvensering, fadern från familjegruppen ovan (L), modern i samma familjegrupp (Tik 1) (baserat på morfaderns fenotyp inkluderades modern som enda tik för att få tillgång till hennes genomsekvens), två individer med lågt antal svansdefekter (AA och BB) och två individer med högt antal svansdefekter (R och AX). Viktiga kriterier för detta urval var att ingen av individerna fick ha någon gemensam anfader två generationer bakåt samt att individerna gärna skulle vara så nära släkt med en vanligt förekommande anfader i den svenska berner sennen-

populationen som möjligt. Dessa kriterier valdes för att kunna representera den genetiska variationen inom den svenska populationen, av den anledningen valdes de importerade hundarna bort. Utöver dessa sex individer preparerades även genomiskt DNA från de båda bröderna i familjegruppen (J och K) för att senare kunna användas för trioanalyser, som innebär att båda föräldrarna samt en avkomma studeras. Dessa skickades ej för helgenomsekvensering på grund av släktskapet med föräldrarna. Resultatet vid preparationen av genomiskt DNA från dessa individer var mycket lovande då DNA-koncentrationen för alla individer var hög (Tabell 5) vilket tyder på att det genomiska DNA:t inte var degraderat.

Tabell 5. Koncentrationen DNA efter preparation av genomiskt DNA

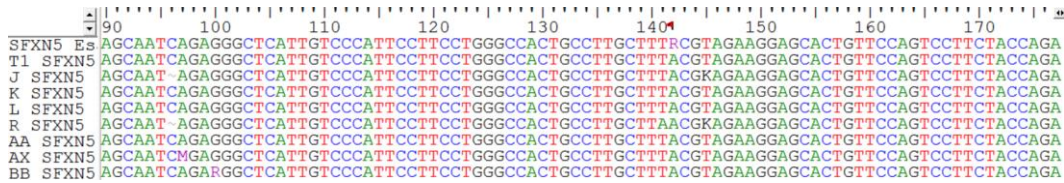
<b>HUND</b>	
<b>1 (TIK 1)</b>	62.73 ng/μl
<b>2 (J)</b>	49.87 ng/μl
<b>3 (K)</b>	91.07 ng/μl
<b>4 (L)</b>	55.57 ng/μl
<b>5 (R)</b>	70.90 ng/μl
<b>6 (AA)</b>	59.26 ng/μl
<b>7 (AX)</b>	67.50 ng/μl
<b>8 (BB)</b>	58.60 ng/μl

Sangersekvensering av exon 74 i *DNAH1*-genen samt för position 17:49832764 i *SFXN5*-genen utfördes på DNA från de sex hundarna som skickades för helgenomsekvensering samt två till, de båda bröderna från familjegruppen. Denna grupp hundar bestod alltså av en tik (Tik 1), en hane (L) som inte uppvisar fenotypen och deras söner varav en (J) uppvisar fenotypen och en (K) inte gör det samt en hane (AA) med mycket god spermimorfologi (7 % svansdefekter), en hane (R) med mycket dålig morfologi = stark fenotyp (77,5 % svansdefekter), en hane (BB) med måttligt god morfologi (10,5 % svansdefekter) och en hane (AX) med måttligt dålig morfologi (21,6 % svansdefekter).

Den sekvens som producerades vid PCR med forward-primern för *DNAH1* gav en produkt som inte var från exon 74 i *DNAH1*-genen. Reverse-primern från samma sekvens producerade sekvensdata av låg kvalitet som ej kunde analyseras. Detta tyder på att primrarna var ospecifika och inte producerade en unik och analyserbar produkt. För vidare analys av denna gen krävs därför omarbetning av primerna eller metoden.

Däremot var PCR-produkten för *SFXN5* av mycket god kvalitet och stämde för samtliga hundar väl överens med motsvarande sekvens i referensgenomet med mycket få skillnader. Antalet insertioner och deletioner s.k. INDELs som hittades i denna intron-region var som förväntat i lokaliseringen för den SNP som i litteraturen har setts vara länkad med spermimorfologi. Samtliga av hundarna som

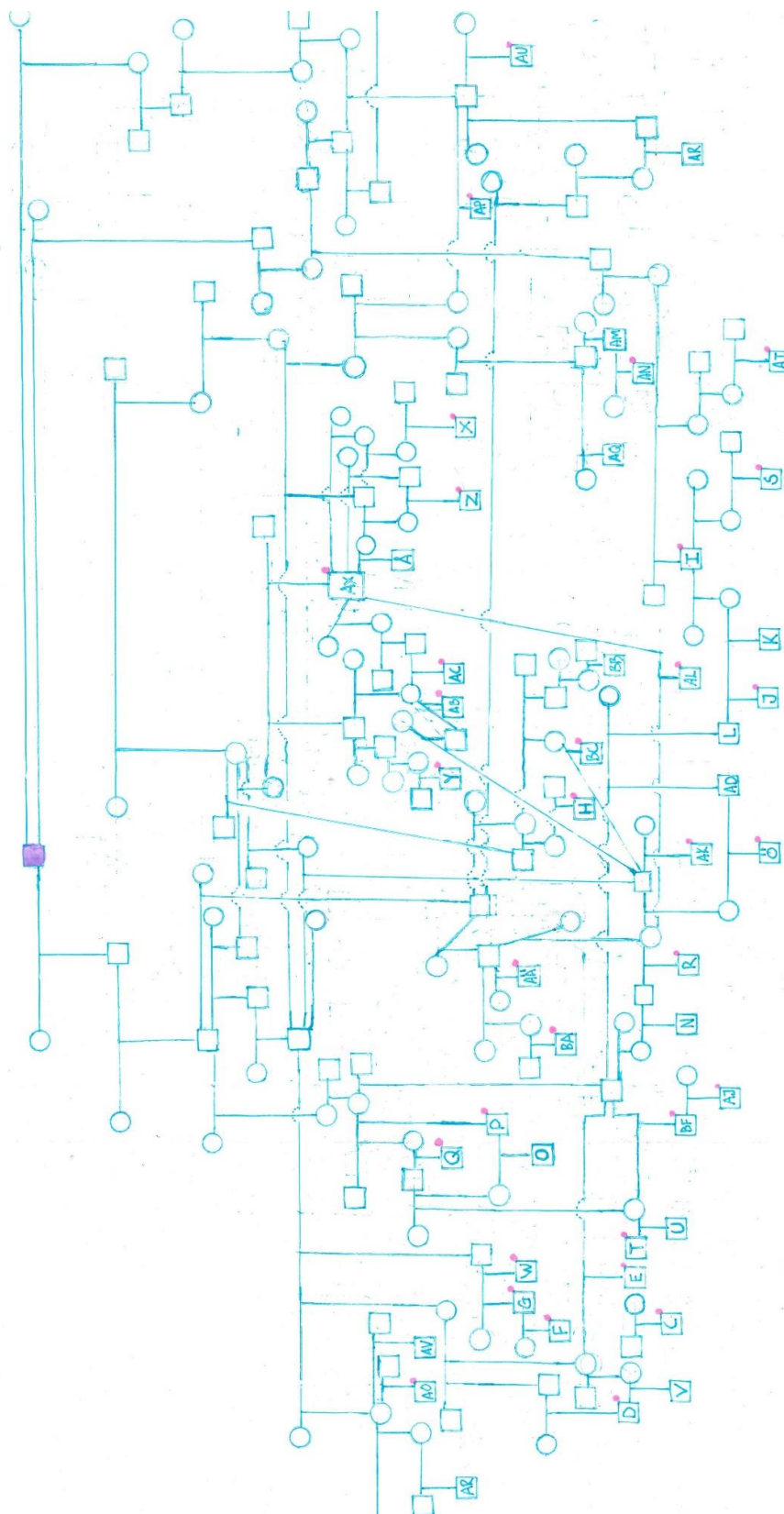
sekvenserades var homozygota för adenin (A), oavsett om de uppvisade mutation eller inte (Figur 9), vilket tyder på låg genetisk variation i området.



Figur 9. DNA-sekvens av del av PCR-produkt för SFXN5-studerade hundar (n=8) samt referensgenomet överst, SNP markeras med röd flagg.

Helgenomsekvenseringen av de sex proverna som skickades till universitetet i Bern avslutades inte inom detta arbete utan används som bas för vidare studier.

Vid analys av de uppgifter om hanarnas eventuella parningar och dräktighetsresultat för dessa parningar som hundägarna fyllde i vid provtagning av de 65 hundarna i studien noterades att av dessa hade 43 hundar parats någon gång före provtagningstillfället. Av dessa 43 hundar hade 35 producerat avkomma. Dräktighetsprocenten för de 43 hundarna varierade mellan 33 och 100 procent. Vid den översiktliga studien av SSHK:s dräktighetsstatistik noterades att hanarna ofta tillåtits para samma tik under upprepade löp trots att dräktighet uteblev flera gånger. I vissa fall blev tikarna dräktiga till slut men i andra fall inte.



Figur 10. Nedärvningsanalys av en gemensam stamfader för några av hundarna i projektet. Hanhundarna i projektet representeras med sina bokstavskoder. Ruta = Hanhund. Cirkel = Tik. Rosa markering = hanhundar med >20 % svansdefekter. Lila ruta = gemensam anfader.

## 5. Diskussion

Vid analysen av en möjlig ärftlig egenskap, sjukdom eller defekt behöver alltid andra orsaker beaktas, så som miljöberoende faktorer, men det faktum att en defekt förekommer mer frekvent i en ras inom en art där individerna befinner sig i olika miljöer tyder på att den defekten är ärftlig. När dessutom en ökning av samma defekt ses inom en viss del av populationen som har ett nära genetiskt band, stärker detta denna misstanke ytterligare. Att hela studiegruppen av berner sennenhanar trots sin generellt låga inavelsgrad har en anfader som förekommer hos alla individer visar att populationen är nära släkt. Svårigheten i denna population är att studieindividerna är släkt via fler än en anfader. Detta gör det svårt att utröna hos vilken av de olika anfäderna en mutation möjligtvis uppkommit. Den låga inavelsgraden i studiegruppen skulle kunna förklaras med att inavelsgraden räknas över fem generationer och de gemensamma anfäderna oftast förekom i generation sju eller åtta och inavelsgraden inkluderar därför inte de gemensamma anfäderna. Inavelsgraden beskriver också endast en enskild individs inavelsgrad och visar inte släktskapet för en viss individ eller andelen genetiskt material en viss stamfader bidragit med. Denna studie påvisade en ökad andel svansdefekter hos individer med fler svenskregistrerade mor- & farföräldrar än hos hundar med inga eller få svenskregistrerade mor- & farföräldrar. Detta tyder på både en rasbunden och en populationsbunden problematik vilket ytterligare stärker antagandet att defekten är ärftlig.

Av praktiska skäl kan vi anta att parningar mellan tikar och hanar från olika delar av landet förekommer mer sällan än parningar mellan tikar och hanar som bor närmare varandra. Detta analyserades dock inte i denna studie. Däremot tyder fördelningen av individerna i denna studie, när det kommer till födelseplats, på att den geografiska fördelningen av avelsmaterialet i den svenska populationen är väl representerat i studien.

Definitionen av fenotypen som valdes i studien är som tidigare nämnts att en individ har  $\geq 20\%$  svansdefekter. Denna siffra är baserad på medelvärdet för svansdefekter hos hundar från tidigare studier som indikerar normalvariationen hos hund. Det är däremot svårt att definiera vad som verkligen är normalt och vad som är vanligt, det skulle kunna vara så att hundarna i de tidigare nämnda studierna (Bartlett 1962; Oettlé 1993; Tesi *et al.* 2018) har påverkad fruktsamhet, eftersom det i ingen av

studierna ingick flera parningar för varje hane med flera känt fertila tikar. Vad som krävs för normal fertilitet (till exempel totalantal spermier) kan också variera med faktorer som till exempel hundens storlek. Tesi *et al.* (2018) grupperade hundarna efter storlek.

Hos människa räknas infertilitet som ett växande globalt hälsoproblem (WHO 2010) och genetiska faktorer finns identifierade (Okutman *et al.* 2018). Inom en hundras är hundarna betydligt mer närbesläktade jämfört med hur nära släkt människor är med varandra. Infertilitet kan därför potentiellt bli ett problem även hos hund. Hundarna i denna studie tilläts ofta para samma tik under upprepade löp trots att dräktighet uteblev flertalet gånger. I vissa fall blev tikarna till slut dräktiga men i andra fall uteblev dräktigheten. Detta tillvägagångssätt talar för att uppfödare gärna ser att en viss kombination blir till beroende på andra egenskaper hos avelshundarna. Det är dock möjligt att anlagen som leder till minskad fertilitet därigenom sprids i populationen.

På grund av bristen på forskning på hundar inom området har denna studie utformats komparativt med människa och nötkreatur som främsta modell för hund. På människa har forskningen kommit mycket längre när det kommer till undersökandet av just genetiska orsaker till spermiedefekter och specifikt svansdefekter i och med forskningen på MMAF (Ben Khelifa *et al.* 2014; Coutton *et al.* 2019). Det som dock ännu är okänt är hur många gener som är inblandade i denna defekt. En begränsning som kan diskuteras avseende de humana studierna och denna studie är att samtliga prover är ejakulat och inte insamlade direkt från testikeln. Det är därför svårt att veta säkert när defekten uppkommit, om det är under spermatogenesen eller under transporten i bitesticklarna och sädesledaren.

Det komparativa tankesättet är däremot intressant att diskutera då en av de gener som antas orsaka MMAF (som klassas som den vanligaste formen av icke-syndromisk teratozoospermi hos människa), *DNAH1*, är viktig för uppbyggnaden av dyneninarmarna i axonemet i spermiesvansens cytoskelett (Neesen *et al.* 2001). Hos tjur är en av de vanligaste mittstyckes-/svansdefekterna den så kallade Dag-defekten och med hjälp av elektronmikroskop har man sett att vid denna defekt saknas oftast en del av axonemet i spermiesvansarna (Blom 1973). Det skulle kunna vara så att dessa två defekter är liknande på fler sätt och skulle möjligtvis kunna ha en liknande uppkomstmekanism. Båda defekterna nedärvs autosomt recessivt (Koefoed-Johnsen *et al.* 1980; Guerri *et al.* 2019).

Dag-defekten är till största delen beskriven hos nötkreatur och inte särskilt väl beskriven hos hund. Detta gör att vid bedömningen av spermiedefekter på hund skulle det vara sannolikt att Dag-defekten missas och eventuellt missbedöms som

ihopprullade svansar. Vid klassificeringen av spermiedefekter så varierar det också om Dag-defekterna bedöms som svans- eller mittstycksdefekter (Blom 1966; Oettlé 1993). Detta visar olikheter mellan studier och det kan vara svårt att utröna vilken defekt som har klassificerats i vilken grupp av defekter.

Bristen på en analyserbar PCR-produkt tillhörande *DNAH1* gör att det inte är möjligt att vare sig bekräfta eller utesluta genens möjliga inverkan på spermie-morfologi hos svenska berner sennenhanar.

De PCR-resultat som producerades för *SFXN5* ger starka indikationer att denna gen kan uteslutas som orsaken till de morfologiska förändringar som identifierats hos de studerade berner sennenhanarna. Det faktum att ingen av hundarna oavsett spermie-morfologi eller släktskap uppvisade genetisk variation i denna lokalisering stärker detta påstående. För att verifiera detta ytterligare behöver rådata som användes i studien av İnanç *et al.* (2018) analyseras. Sekvensen var ej beskriven för den specifika SNP-allelen som var den starkast associerade allelen i deras publicerade studie. På sikt förväntas även att de helsekvenserade genomen som produceras av universitetet i Bern kommer att bekräfta att *SFXN5* kan uteslutas som orsak till fenotypen.

## 5.1. Kommande studier

Med det underlag som är insamlat under denna studie är förhoppningen att det blir möjligt att utföra bioinformatik på de sekvenser som sekvenseras i samarbete med universitetet i Bern och att det ska kunna utföras en trioanalys av den familjegrupp (modern, fadern och de två bröderna i Figur 8) som har identifierats i detta arbete.

## Referenser

- Amiri-Yekta, A., Coutton, C., Kherraf, Z.-E., Karaouzène, T., Le Tanno, P., Sanati, M.H., Sabbaghian, M., Almadani, N., Sadighi Gilani, M.A., Hosseini, S.H., Bahrami, S., Daneshpour, A., Bini, M., Arnoult, C., Colombo, R., Gourabi, H. & Ray, P.F. (2016). Whole-exome sequencing of familial cases of multiple morphological abnormalities of the sperm flagella (MMAF) reveals new DNAH1 mutations. *Human Reproduction*, 31 (12), 2872–2880. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew262>
- Aston, K.I. & Carrell, D.T. (2009). Genome-wide study of single-nucleotide polymorphisms associated with azoospermia and severe oligozoospermia. *Journal of Andrology*, 30 (6), 711–725. <https://doi.org/10.2164/jandrol.109.007971>
- Bane, A. (1961). Acrosomal abnormality associated with sterility in a boar. *Proceedings of the 4th International Congress of Animal Reproductives*. The Hague, The Netherlands, 810–817.
- Bartlett, D.J. (1962). Studies on dog semen. I. Morphological characteristics. *Journal of Reproduction and Fertility*, 3, 173–189. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0030173>
- Beales, P., Elcioglu, N., Woolf, A., Parker, D. & Flinter, F. (1999). New criteria for improved diagnosis of Bardet-Biedl syndrome: results of a population survey. *Journal of Medical Genetics*, 36 (6), 437–446.
- Ben Khelifa, M., Coutton, C., Zouari, R., Karaouzène, T., Rendu, J., Bidart, M., Yassine, S., Pierre, V., Delaroche, 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>
- Blom, E. (1966). A new sterilizing and hereditary defect (the ‘Dag Defect’) located in the bull sperm tail. *Nature*, 209 (5024), 739–740. <https://doi.org/10.1038/209739a0>
- Blom, E. (1973). Ultrastrukturen af nogle karakteristiske spermiedefekter og forslag til et nyt klassificeringssystem for tyrens spermioqram. *Nordisk Veterinaermedicin*, (25), 383–391.
- Bobadilla, J.L., Macek, M., Fine, J.P. & Farrell, P.M. (2002). Cystic fibrosis: A worldwide analysis of CFTR mutations - correlation with incidence data and application to screening. *Human Mutation*, 19 (6), 575–606. <https://doi.org/10.1002/humu.10041>



- CanFam3.1* (u.å.). [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF\\_000002285.3/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000002285.3/) [2020-11-08]
- Cassatella, D., Martino, N.A., Valentini, L., Guaricci, A.C., Cardone, M.F., Pizzi, F., Dell'Aquila, M.E. & Ventura, M. (2013). Male infertility and copy number variants (CNVs) in the dog: a two-pronged approach using Computer Assisted Sperm Analysis (CASA) and Fluorescent In Situ Hybridization (FISH). *BMC Genomics*, 14, 921. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-921>
- Chenoweth, P.J. (2005). Genetic sperm defects. *Theriogenology*, 64 (3), 457–468. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.05.005>
- 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 asthenoteratozoospermia 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>
- 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>
- Ensembl genome browser* (2020). Gene: ARMC2 (ENSCAFG00000003784), CanFam3.1. [https://www.ensembl.org/Canis\\_lupus\\_familiaris/Gene/Summary?db=core;g=ENSCAFG00000003784;r=12:65824672-65933098;t=ENSCAFT00000006088](https://www.ensembl.org/Canis_lupus_familiaris/Gene/Summary?db=core;g=ENSCAFG00000003784;r=12:65824672-65933098;t=ENSCAFT00000006088) [2020-10-29]
- Ensembl genome browser* (u.å.). <https://www.ensembl.org/index.html> [2020-11-08]
- Feldman, E.C. & Nelson, R.W. (2004). *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*. 3rd. ed. Philadelphia: Saunders.
- GeneCards (u.å.). *GeneCards – the human gene database*. Weizmann Institute of Science. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SFXN5&keywords=Sideroflexin-5> [2022-05-11]
- Gravesande, K.S. van's & Omran, H. (2005). Primary ciliary dyskinesia: Clinical presentation, diagnosis and genetics. *Annals of Medicine*, 37 (6), 439–449. <https://doi.org/10.1080/07853890510011985>
- Griffiths, A.J.F., Miller, J.H., Suzuki, D.T., Lewontin, R.C. & Gelbart, W.M. (2000). Mutant types. I: *Introduction to Genetic Analysis*. 7th ed. New York: W.H. Freeman.
- Griffiths, A.J.F. Wessler, S.R., Carroll, S.B. & Doebley, J. (2012). *Introduction to Genetic Analysis*. International 10th. ed. New York: W.H. Freeman.
- 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>

- Hargreave, T.B. (2000). Genetic basis of male fertility. *British Medical Bulletin*, 56 (3), 650–671. <https://doi.org/10.1258/0007142001903454>
- İnanç, M.E., Tekin, K., Akkurt, M.Y., Olgac, K.T., Yılmaz, B., Çil, B., Kızılaslan, M., Taşdemir, U., Tuncer, P.B., Büyükleblebici, S., Uysal, O. & Kul, B.Ç. (2018). Genomewide association of male reproductive traits in Aksaray Malakli dogs. *Reproduction in Domestic Animals*, 53 (6), 1555–1562. <https://doi.org/10.1111/rda.13302>
- Ishikawa, T. (2017). Axoneme structure from motile cilia. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 9 (1). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028076>
- Jan, S.Z., Vormer, T.L., Jongejan, A., Röling, M.D., Silber, S.J., de Rooij, D.G., Hamer, G., Repping, S. & van Pelt, A.M.M. (2017). Unraveling transcriptome dynamics in human spermatogenesis. *Development (Cambridge, England)*, 144 (20), 3659–3673. <https://doi.org/10.1242/dev.152413>
- Koefoed-Johnsen, H.H., Andersen, J.B., Andresen, E., Blom, E. & Philipsen, H. (1980). The Dag defect of the tail of the bull sperm. Studies on the inheritance and pathogenesis. *Theriogenology*, 14 (6), 471–475. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(80\)90059-X](https://doi.org/10.1016/0093-691X(80)90059-X)
- Kolster, K.A. (2018). Evaluation of canine sperm and management of semen disorders. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 48 (4), 533–545. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2018.02.003>
- Krausz, C., Hoefsloot, L., Simoni, M. & Tüttelmann, F. (2014). EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions: state-of-the-art 2013. *Andrology*, 2 (1), 5–19. <https://doi.org/10.1111/j.2047-2927.2013.00173.x>
- Lagerlöf, N. (1934). *Morphologische Untersuchungen über Veränderungen in Spermabild und in den Hoden bei Bullen mit vermindeter oder aufgehobener Fertilität. (Researches concerning morphologic changes in the semen picture and in the testicles of sterile and subfertile bulls)*. Diss. Karolinska institutet, Stockholm. (Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica. Supplementum 19). Uppsala: Almqvist & Wiksell.
- 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>
- Linde-Forsberg, C. (1991). Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 21 (3), 467–485. [https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(91\)50054-1](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(91)50054-1)
- Linde-Forsberg, C. & Forsberg, M. (1989). Fertility in dogs in relation to semen quality and the time and site of insemination with fresh and frozen semen. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, 39, 299–310.
- Lockhart, P.J., Holtom, B., Lincoln, S., Hussey, J., Zimprich, A., Gasser, T., Wszolek, Z.K., Hardy, J. & Farrer, M.J. (2002). The human sideroflexin 5 (SFXN5) gene: sequence, expression analysis and exclusion as a candidate for PARK3. *Gene*, 285 (1), 229–237. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(02\)00402-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(02)00402-X)

- Mierla, D., Jordan, D. & Stoian, V. (2014). Chromosomal abnormality in men with impaired spermatogenesis. *International Journal of Fertility & Sterility*, 8 (1), 35–42.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 1986 (51), Pt 1:263-73. <https://doi.org/doi:10.1101/sqb.1986.051.01.032>
- Mäkeläinen, S., Hellsand, M., Van Der Heiden, A.D., Andersson, E., Ström Holst, B., Häggström, J., Bersås Ljungvall, I., Mellersh, C., Hallböök, F., Andersson, G., Ekestén, B. & Bergström, T. (2020). *Deletion in the Bardet-Biedl syndrome gene TTC8 results in a syndromic retinal degeneration in dogs*. [Tidskriftsartikel]. <https://pub.epsilon.slu.se/17558/> [2020-10-07]
- Neesen, J., Kirschner, R., Ochs, M., Schmiedl, A., Habermann, B., Mueller, C., Holstein, A.F., Nuesslein, T., Adham, I. & Engel, W. (2001). Disruption of an inner arm dynein heavy chain gene results in asthenozoospermia and reduced ciliary beat frequency. *Human Molecular Genetics*, 10 (11), 1117–1128. <https://doi.org/10.1093/hmg/10.11.1117>
- Neesen, J., Koehler, M.R., Kirschner, R., Steinlein, C., Kreuzberger, J., Engel, W. & Schmid, M. (1997). Identification of dynein heavy chain genes expressed in human and mouse testis: chromosomal localization of an axonemal dynein gene. *Gene*, 200 (1), 193–202. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(97\)00417-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(97)00417-4)
- Nicholas, F.W. (2009). *Introduction to Veterinary Genetics*. Chichester, United Kingdom: John Wiley & Sons, Incorporated. <http://ebookcentral.proquest.com/lib/slub-ebooks/detail.action?docID=707897> [2020-12-04]
- Noakes, D.E., Parkinson, Timothy J. & England, G.C.W. (2019). *Veterinary Reproduction and Obstetrics*. 10<sup>th</sup> ed. Saunders Ltd.
- Oates, R. (2012). Evaluation of the azoospermic male. *Asian Journal of Andrology*, 14 (1), 82–87. <https://doi.org/10.1038/aja.2011.60>
- Oettlé, E. (1993). Sperm morphology and fertility in the dog. *Journal of Reproduction and fertility. Supplement*, 47, 257–260.
- Okutman, O., Rhouma, M.B., Benkhalifa, M., Muller, J. & Viville, S. (2018). Genetic evaluation of patients with non-syndromic male infertility. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 35 (11), 1939–1951. <https://doi.org/10.1007/s10815-018-1301-7>
- OMIA (u.å.). *Online Mendelian Inheritance in Animals*. Sydney School of Veterinary Science. World Wide Web URL: <https://omia.org/> [2022-03-14]
- Reece, J.B., Urry, L.A., Cain, M.L., Wasserman, S.A., Minorsky, P.V. & Jackson, R.B. (2011). *Campbell Biology*. 9<sup>th</sup> ed. Boston: Benjamin Cummings /Pearson, 115-116.
- Rota, A., Manuali, E., Caire, S. & Appino, S. (2008). Severe tail defects in the spermatozoa ejaculated by an English bulldog. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 70 (1), 123–125. <https://doi.org/10.1292/jvms.70.123>
- Sha, Y., Yang, X., Mei, L., Ji, Z., Wang, X., Ding, L., Li, P. & Yang, S. (2017). DNAH1 gene mutations and their potential association with dysplasia of the sperm fibrous

- sheath and infertility in the Han Chinese population. *Fertility and Sterility*, 107 (6), 1312–1318.e2. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.04.007>
- Sharlip, I.D., Jarow, J.P., Belker, A.M., Lipshultz, L.I., Sigman, M., Thomas, A.J., Schlegel, P.N., Howards, S.S., Nehra, A., Damewood, M.D., Overstreet, J.W. & Sadovsky, R. (2002). Best practice policies for male infertility. *Fertility and Sterility*, 77 (5), 873–882. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(02\)03105-9](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(02)03105-9)
- Svenska Sennenhundklubbens avelsråd (2018). *Rasspecifik avelsstrategi för Berner Sennen*. Svenska Sennenhundklubben. <https://www.skk.se/globalassets/dokument/rasdokument/ras-berner-sennenhund.pdf>
- Svenska Sennenhundklubbens avelsråd (2019). *Kullstatistik Berner Sennen*. Svenska Sennenhundklubben. [https://www.sshk.a.se/Avelsradet/Kullstatistik\\_sammanstallning\\_2019.xls](https://www.sshk.a.se/Avelsradet/Kullstatistik_sammanstallning_2019.xls) [2020-11-12]
- Tamrakar, S.R. & Bastakoti, R. (2019). Determinants of infertility in couples. *Journal of Nepal Health Research Council*, 17 (1), 85–89. <https://doi.org/10.33314/jnhrc.1827>
- Tang, S., Wang, X., Li, W., Yang, X., Li, Z., Liu, W., Li, C., Zhu, Z., Wang, L., Wang, J., Zhang, L., Sun, X., Zhi, E., Wang, H., Li, H., Jin, L., Luo, Y., Wang, J., Yang, S. & Zhang, F. (2017). Biallelic mutations in CFAP43 and CFAP44 cause male infertility with multiple morphological abnormalities of the sperm flagella. *American Journal of Human Genetics*, 100 (6), 854–864. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2017.04.012>
- 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>
- Thauvin-Robinet, C., Munck, A., Huet, F., Becdelièvre, A. de, Jimenez, C., Lalau, G., Gautier, E., Rollet, J., Flori, J., Nové-Josserand, R., Soufir, J.-C., Haloun, A., Hubert, D., Houssin, E., Bellis, G., Rault, G., David, A., Janny, L., Chiron, R., Rives, N., Hairion, D., Collignon, P., Valeri, A., Karsenty, G., Rossi, A., Audrézet, M.-P., Férec, C., Leclerc, J., Georges, M. des, Claustres, M., Bienvenu, T., Gérard, B., Boisseau, P., Cabet-Bey, F., Cheillan, D., Feldmann, D., Clavel, C., Bieth, E., Iron, A., Simon-Bouy, B., Izard, V., Steffann, J., Viville, S., Costa, C., Drouineaud, V., Fauque, P., Binquet, C., Bonithon-Kopp, C., Morris, M.A., Faivre, L., Goossens, M., Roussey, M., Girodon, E. & p.Arg117His, T.C.W.G.O. (2013). CFTR p.Arg117His associated with CBAVD and other CFTR-related disorders. *Journal of Medical Genetics*, 50 (4), 220–227. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2012-101427>
- The Human Protein Atlas* (u.å.). <https://www.proteinatlas.org/> [2020-11-08]
- Thonneau, P., Marchand, S., Tallec, A., Ferial, M.L., Ducot, B., Lansac, J., Lopes, P., Tabaste, J.M. & Spira, A. (1991). Incidence and main causes of infertility in a resident population (1,850,000) of three French regions (1988-1989). *Human Reproduction (Oxford, England)*, 6 (6), 811–816. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a137433>

- 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>
- UCSC Genome Browser (u.å.). <https://genome-euro.ucsc.edu/index.html> [2020-11-08]
- Wageningen University Bioinformatics (u.å.). *Primer3Plus*. [webb interface] <https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/> [2020-12-01]
- Wang, X., Jin, H., Han, F., Cui, Y., Chen, J., Yang, C., Zhu, P., Wang, W., Jiao, G., Wang, W., Hao, C. & Gao, Z. (2017). Homozygous DNAH1 frameshift mutation causes multiple morphological anomalies of the sperm flagella in Chinese. *Clinical Genetics*, 91 (2), 313–321. <https://doi.org/10.1111/cge.12857>
- WHO (red.) (2010). *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*. 5th ed. Geneva: World Health Organization.

# Tack

Detta arbete har kommit till tack vare många fantastiska människor och hundar: Tack till alla veterinärer, hanhundsägare, hanhundar, tikhundsägare och teasertikar som ställt upp vid provinsamling. Tack till den fantastiska personalen vid Institutionen för kliniska vetenskaper (spermalaboratoriet) och vid Institutionen för husdjursgenetik (molekylärgenetik) för ert arbete och guidning.

Tack till mina handledare Bodil Ström Holst och Göran Andersson och examinator Elisabeth Persson för ert arbete, stöd och kloka råd i hela processen. Tack till mina projektkollegor Angus Lau, Hannah Olsson och Stina Wallander samt tack till Ida Hallberg.

Slutligen, tack till min familj och vänner för att ni orkat lyssna på allt om berner sennen, deras gener och spermier.

# Populärvetenskaplig sammanfattning

Rasklubben för hundrasen berner sennen har länge fört statistik över genomförda parningar, dräktighetsprocent, kullstorlek och förlossningssvårigheter. Rasklubben har märkt en minskning i dräktighetsprocent och kullstorlek samt en ökning av förlossningssvårigheter.

För att undersöka vad detta kan bero på genomfördes en studie där 65 berner sennenhanar fick lämna sperma- och blodprover och dessutom fick en genetiskt intressant tik lämna blodprov. Spermaproverna analyserades med avseende på det totala antalet spermier i provet, spermiernas förmåga att röra sig samt spermiernas utseende. Defekter i spermiernas utseende delades in i grupper beroende på var på spermien defekten sitter; huvudet, mittstycket eller svansen.

I denna studie sågs en högre andel spermier med defekta svansar bland berner sennenhanarna jämfört med det som rapporterats för andra hundraser. Att en egenskap eller defekt ökar i frekvens inom en specifik ras talar för att den är ärftlig, alltså att en förälder kan föra egenskapen eller defekten vidare till sin avkomma. Eftersom denna ökning av defekta spermiesvansar kunde observeras hos de studerade hundarna gjordes en analys av hundarnas stamtavlor för att försöka påvisa ett samband mellan de individer som hade en ökad andel defekta spermiesvansar. Under dessa analyser sågs att hundarna i studien hade flera gemensamma förfäder, vilket ytterligare stärker påståendet om att defekten är ärftlig. Analysen visade också att de hundar där tre eller fyra av deras mor- och farföräldrar var svenskregistrerade generellt sett hade fler defekta spermiesvansar än de hundar där ingen eller bara en av mor- och farföräldrarna var svenskregistrerade. Det tyder på att det inte bara är en generell ökning av defekta spermiesvansar i hundrasen berner sennen utan en ökning speciellt i den svenska populationen av rasen.

Detta skulle kunna vara en av möjligtvis fler anledningar till den minskade dräktighetsprocenten hos rasen. Det är därför en viktig faktor för rasklubben att ha i åtanke, då en ökad problematik med fruktsamheten inom en ras på sikt kan vara skadligt eftersom det gör att generna från färre antal hundar kan föras vidare vilket gör att andra ärftliga sjukdomar i en ras kan öka eller uppkomma till följd av detta.

Utöver detta gjordes också studier av utmärkande områden i två specifika gener som i tidigare forskning setts ha samband med genetiska spermiedefekter, en hos hund (genen *SFXN5*) samt en hos människa (genen *DNAH1*). Vid analys av dessa två gener sågs för den ena (*SFXN5*) inget som tyder på samband till de spermiedefekter som hundarna uppvisade. För den andra (*DNAH1*) gick det inte att säga något på grund av fel som uppkom i analysmetoden.

Material samlades också in och skickades till Genetiska institutionen på universitetet i Bern som håller på att kartlägga den genetiska variationen hos hela världens berner sennenpopulation. Deras resultat förväntas sedan kunna användas för ytterligare genetiska analyser hos hundarna i denna studie.