

KU LEUVEN



DEPARTEMENT  
LANDBOUW  
& VISSERIJ



PAARDENPUNT  
VLAANDEREN  
Als het om paarden gaat



BELGIAN  
WARMBLOOD  
Bred to Perform



# Studieavond PaardenGenomica

27/11/2023

Léa Chopard, Steven Janssens, Nadine Buys  
Onderzoeksgroep Huisdierengenetica, KU Leuven

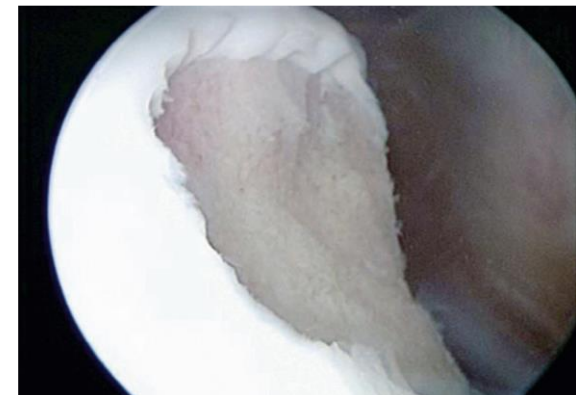


Bram Van Mol, Maarten Oosterlinck, Frederik Pille  
Vakgroep Heelkunde ,Anesthesie en Orthopedie van de Grote Huisdieren, UGent  
FWO Vlaanderen, : grant 11B3921N

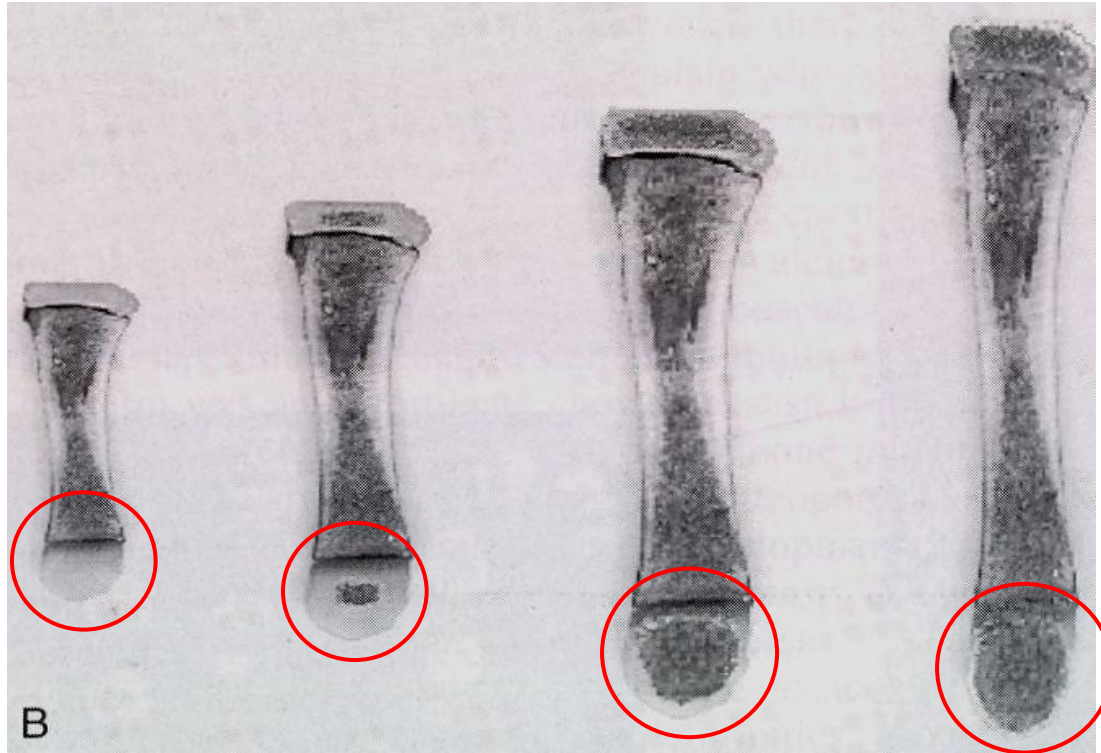


# Situering

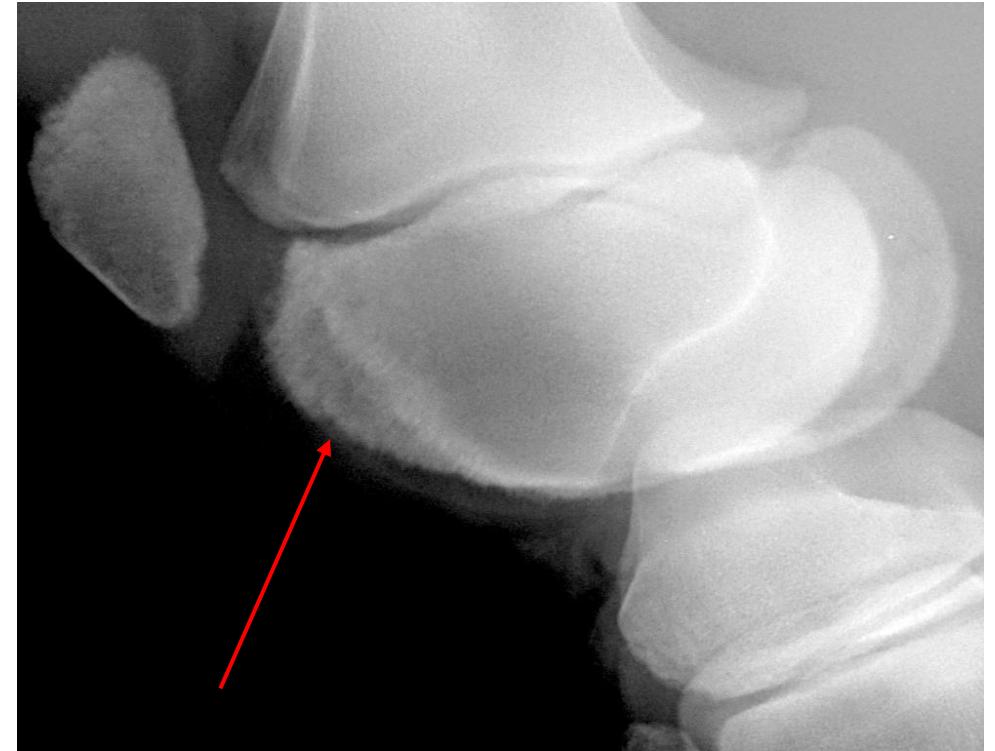
- >340 000 paarden in België aanwezig
  - >**34,12%** met skeletale ontwikkelingsstoornissen
  - **Osteochondrose (OC)** meest voorkomend en erfelijk
- Medische afwijking met de **grootste economische impact** binnen de paardenwereld
  - Afwijzing door stamboeken
  - ↓ Economische waarde
  - ↑ Chirurgiën
  - ↓ Welzijn



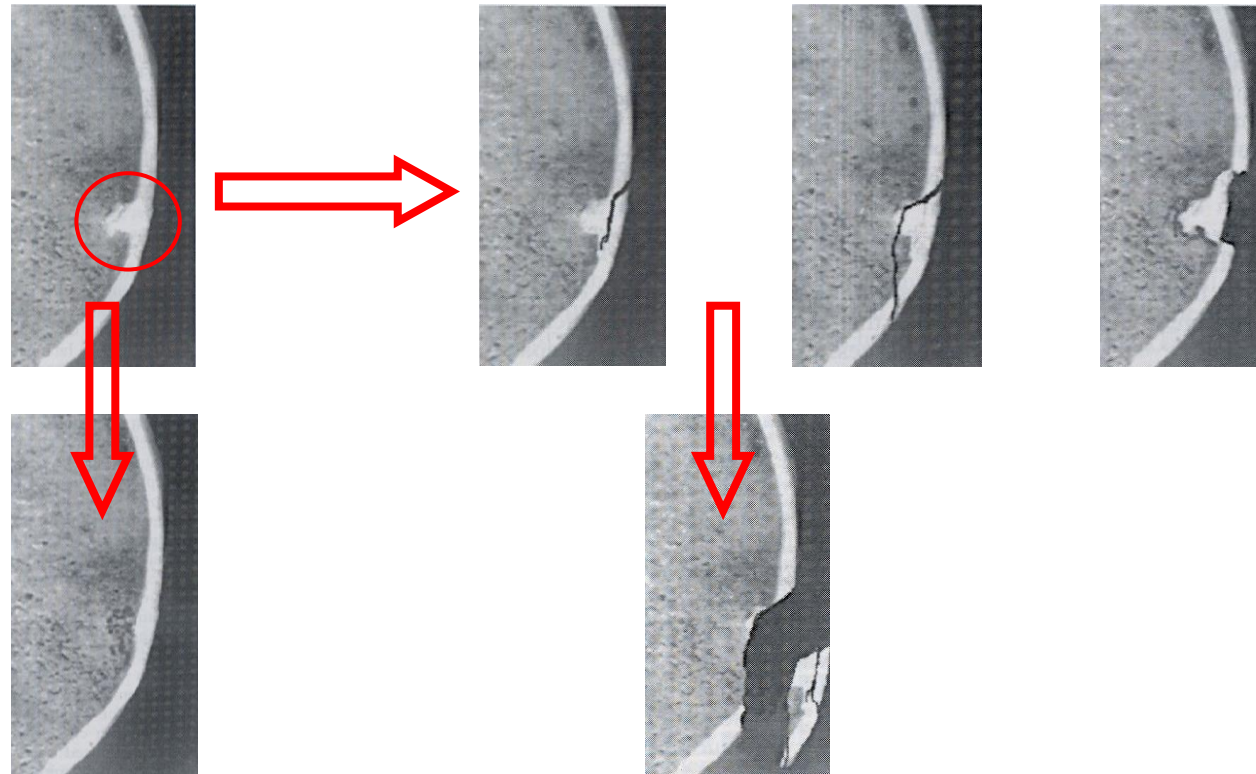
# Osteochondrose



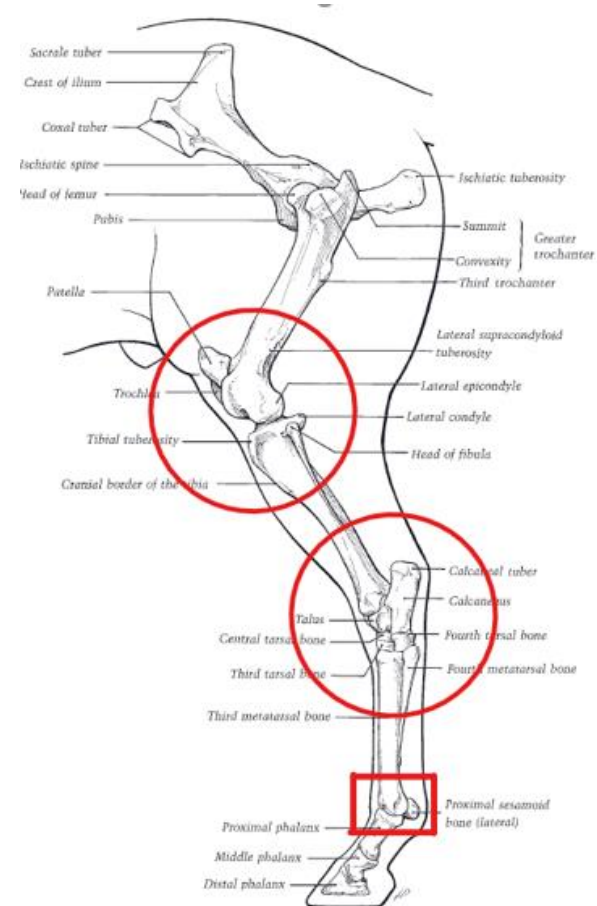
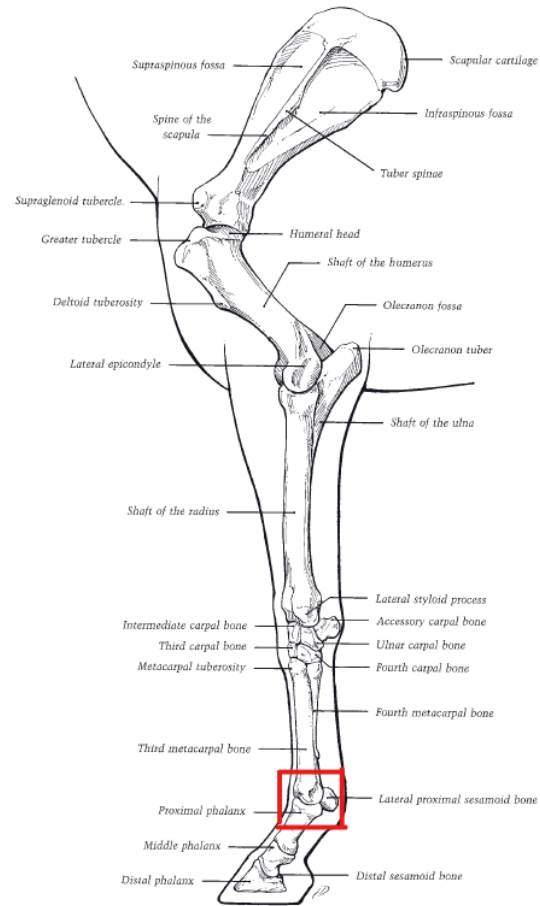
ossificatiecentrum



# Osteochondrose



# Osteochondrose



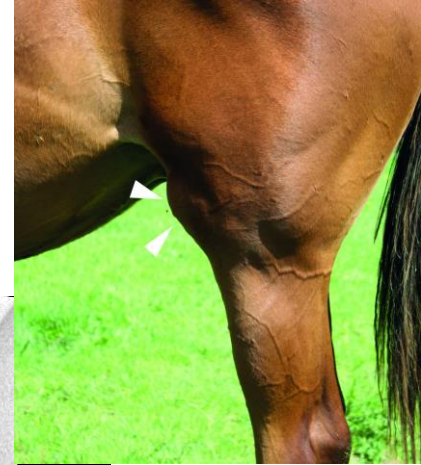
# Röntgenkeuring

- Screening
  - Ontwikkelingsstoornissen (osteocondrose, botcysten, ...)
  - Straalbeenkwaliteit
  - Spat
- Klassieke keuring:  $\pm$  20 projecties
  - Voorvoeten: LM, D55°Pr-PaDIO and D65°Pr-PaDIO (6)
  - Kogels LM (4)
  - Sprongen: LM, D45°L-PIMO, PI45°L-DMO and DPL (8)
  - Knieën: Cd60°L-DMO (2)

# OC(D) sprong



# OC(D) knie





# OC(D) kogel

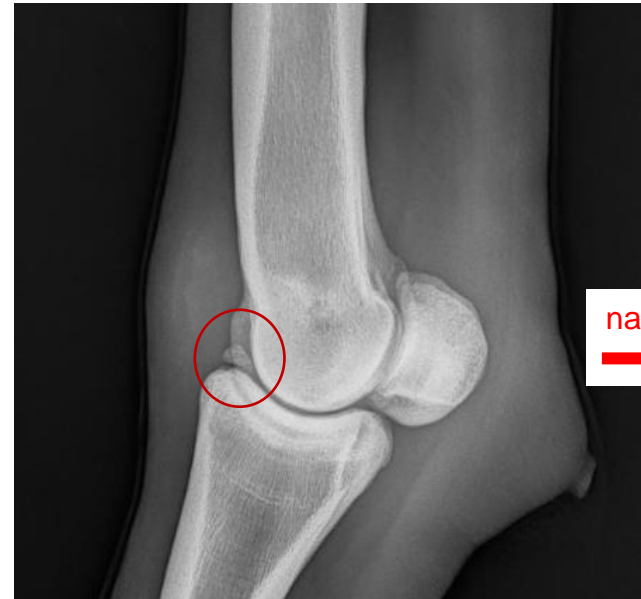


# Andere kogelfragmenten (DOF en POF)

POF



DOF



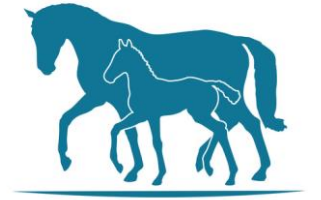
na chirurgie



# Pathogenese

Multifactorieel:

- **Omgevingsfactoren:** beweging, voeding, trauma, ...
- **Genetica**



Genotype

+



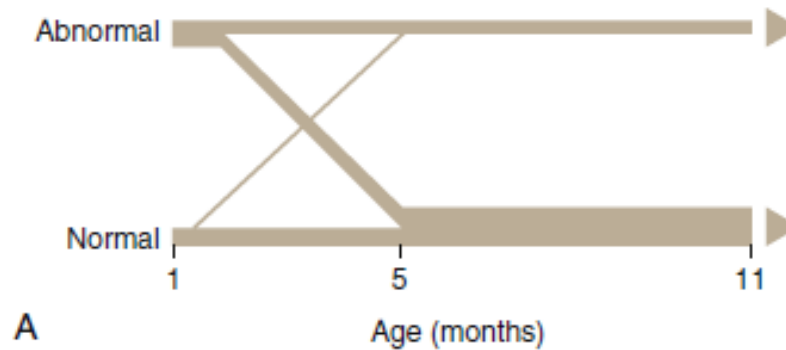
Environment

=

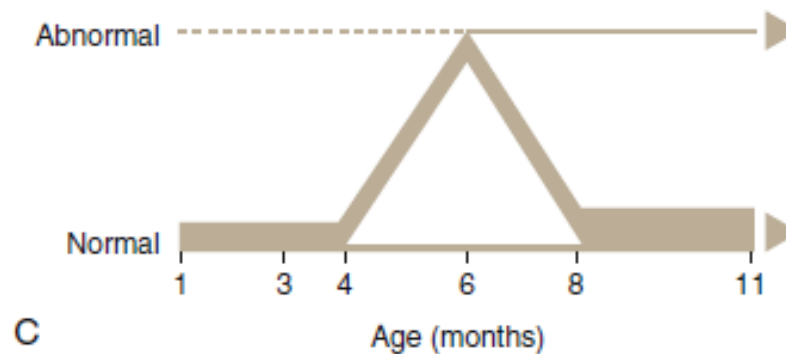


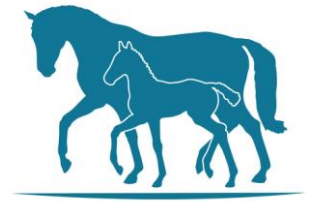
Phenotype

Sprong:



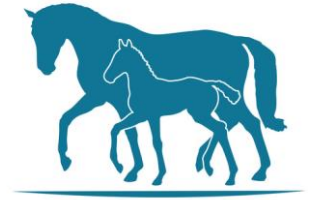
Knie:





# Genomica in de strijd tegen osteochondrose

# PaardenGenomica project



Doel: verbeterde selectieprotocollen op basis van DNA onderzoek

Onderzoeksinstituten:

- Centrum Huisdierengenetica KU Leuven
- Faculteit diergeneeskunde UGent



Met ondersteuning van:

- PaardenPunt Vlaanderen
- Departement Landbouw en Visserij
- Stamboeken BWP en Zangersheide

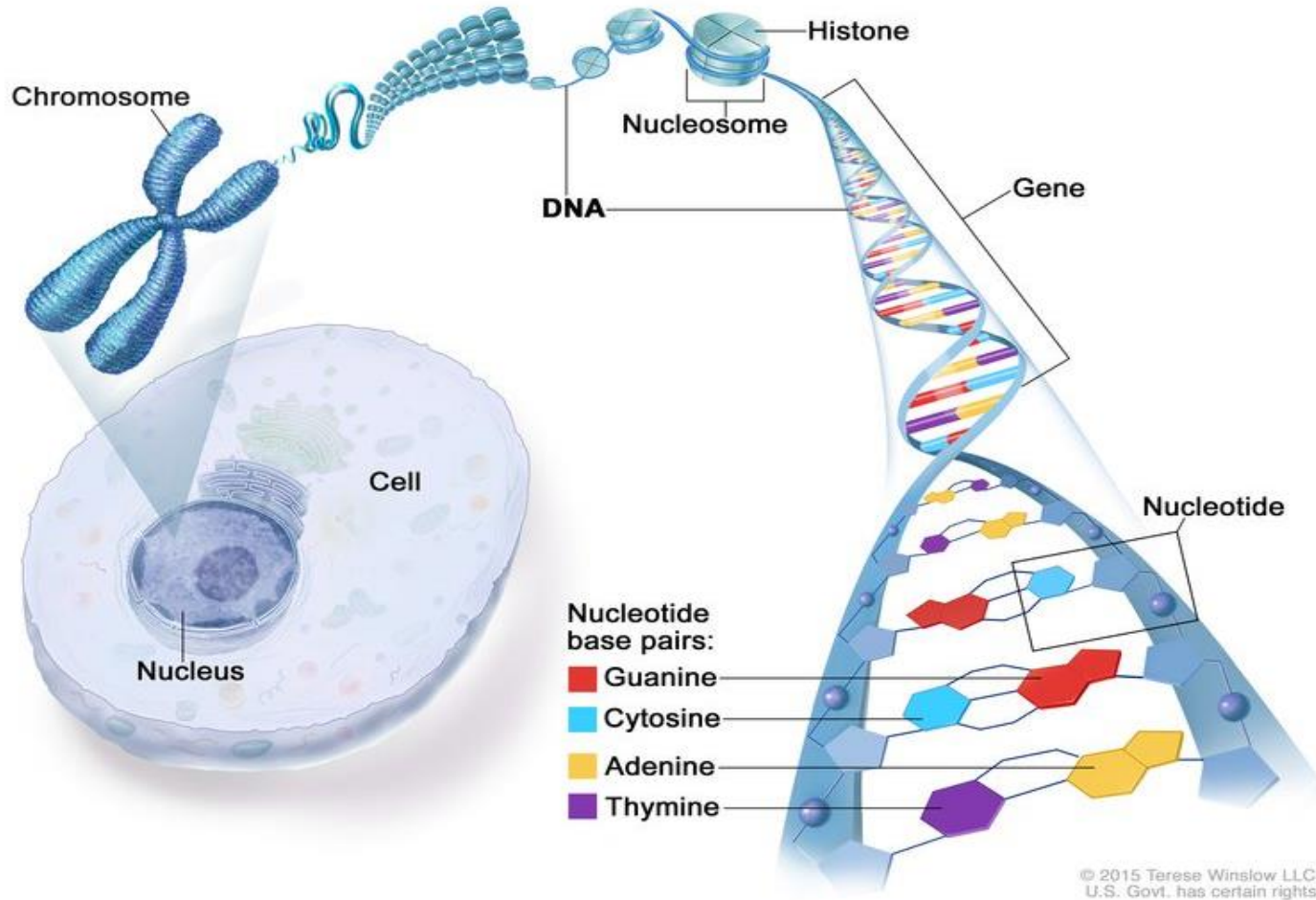
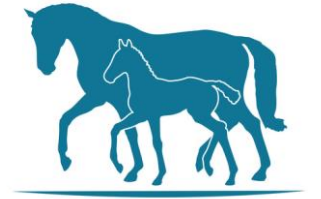


# Studieopzet

- **Twee groepen** (radiologisch onderzoek)
  - Paarden met OC = cases
  - Paarden zonder OC= controles
- **Vergelijken van DNA** tussen deze 2 groepen
- Onderzoeksvraag:
  - Verschil in DNA detecteerbaar?
  - Mogelijkheid tot **aanvulling en verbetering** huidige manier van selectie?



# DNA



- Lange code van 4 types moleculen (nucleotiden)
- Paard: 2 680 000 000 nucleotiden
- DNA code :
  - Erfelijk
  - Opgedeeld in chromosomen (hoofdstukken)
  - 99% identiek tussen de paarden
- Interactie DNA code + omgeving = **eigenschappen individu**

# Genoomwijde associatie studie(GWAS)

- Bloed of haarwortels → extractie DNA

- Bepalen ~~alle~~ nucleotiden (± €1000/staal)

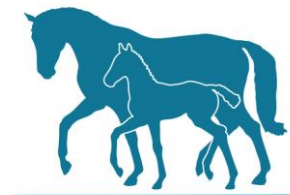


- Steekproef **670 000** zeer variabele en gelijk verdeelde nucleotiden = **merkers**

... TT**G**TTCAAATCAGGGTCCAAAT...  
↓  
... TT**A**TTCAAATCAGGGTCCAAAT... .

- Is er een **verschil in merkers** (nucleotiden) tussen cases en controles?





# Studie in de praktijk

# Materiaal en methode

## Materiaal:

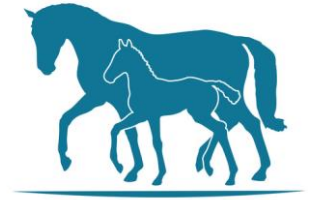
- **716 paarden:**
  - DNA
  - Radiografieën

## Methode

- Kwaliteitscontrole\*
- Ouderschapscontrole



# Data



716 horses:

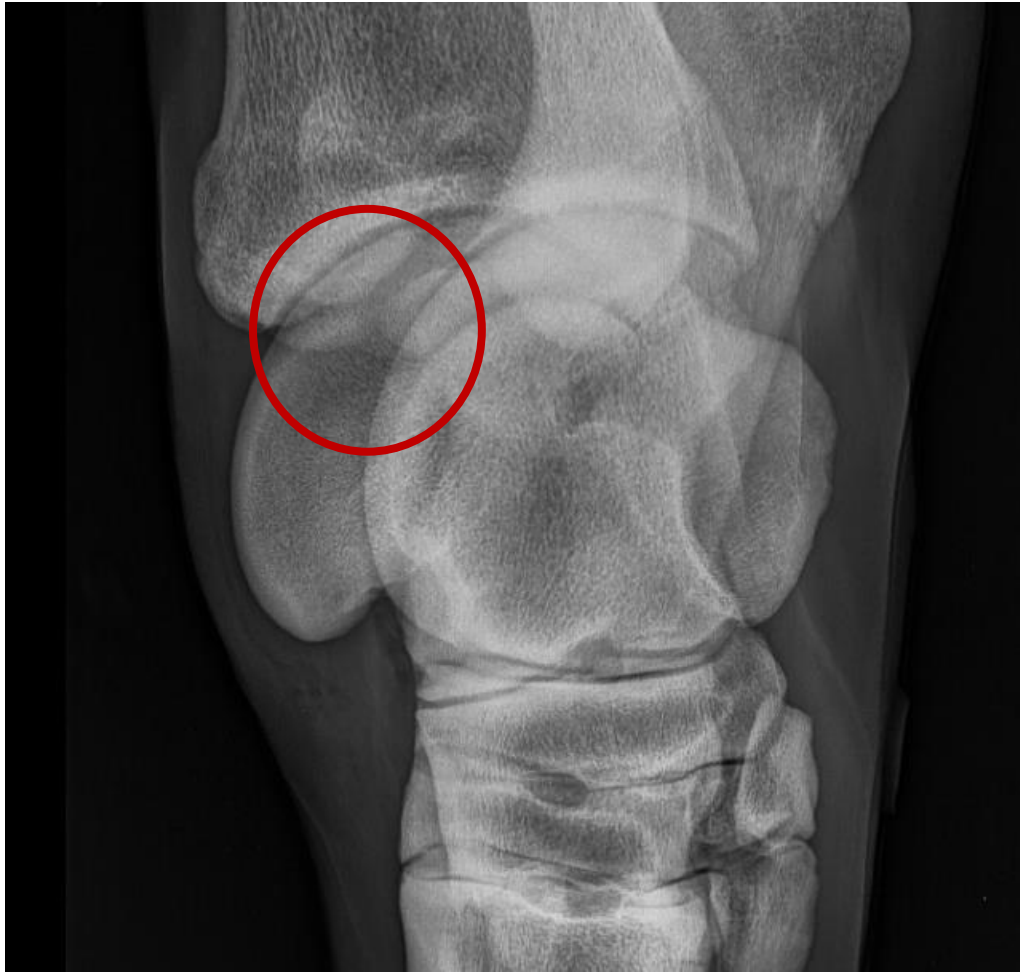
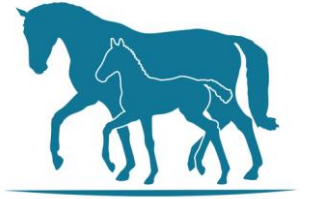
442 mannelijk en 274 merries  
13 stamboeken  
**1 populatie** volgens PCA analyse



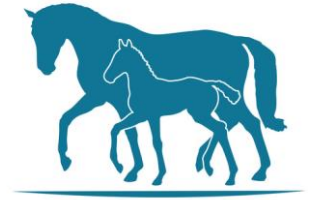
Radiografieën: **42 aspecten** (score 0-4) per paard  
OCD, kogelfragmenten, spat,  
straalbeenkwaliteit, botcysten,...

Stamboek	N
BWP	402
ZANG	177
KWPN	40
SBS	25
SF	21
DUITS	35
AES	14
HSI	1
ETB	1

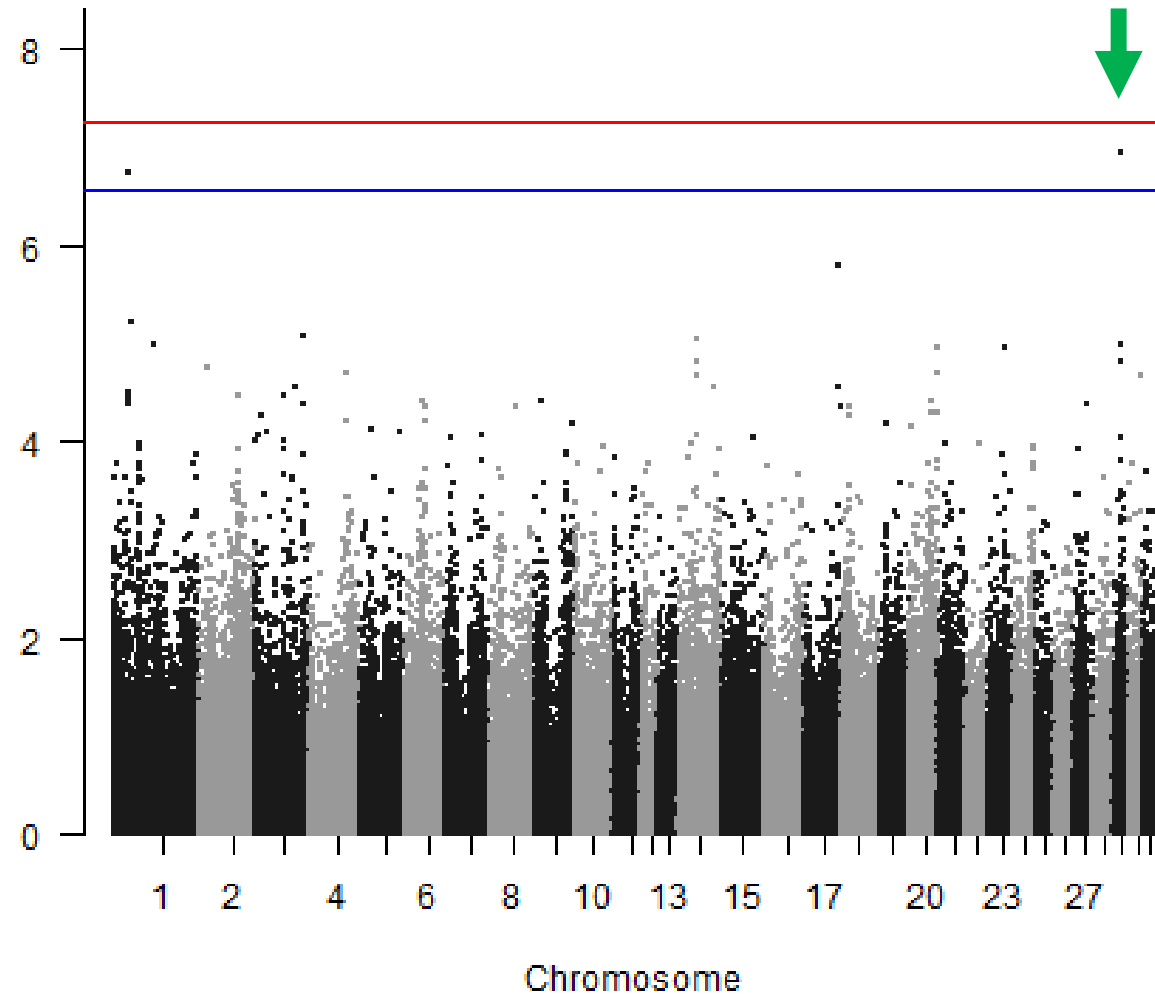
# OC sprong



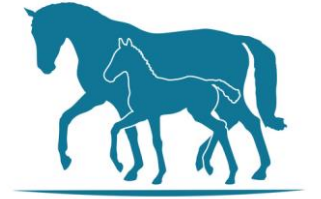
# OC sprong



- Cases met OC sprong  
134 (57 ♀ ; 77 ♂)
- Controles zonder OC sprong  
446 (166 ♀ ; 280 ♂)
- Signaal op chromosoom 29



# Verstrengen definitie fenotype



Eenvoudige definitie

- Cases: OC sprong (DiRT)
- Controles: geen OC sprong (DiRT)

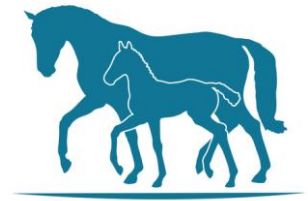
Extra lagen striktheid

- Voor zowel **cases en controles**

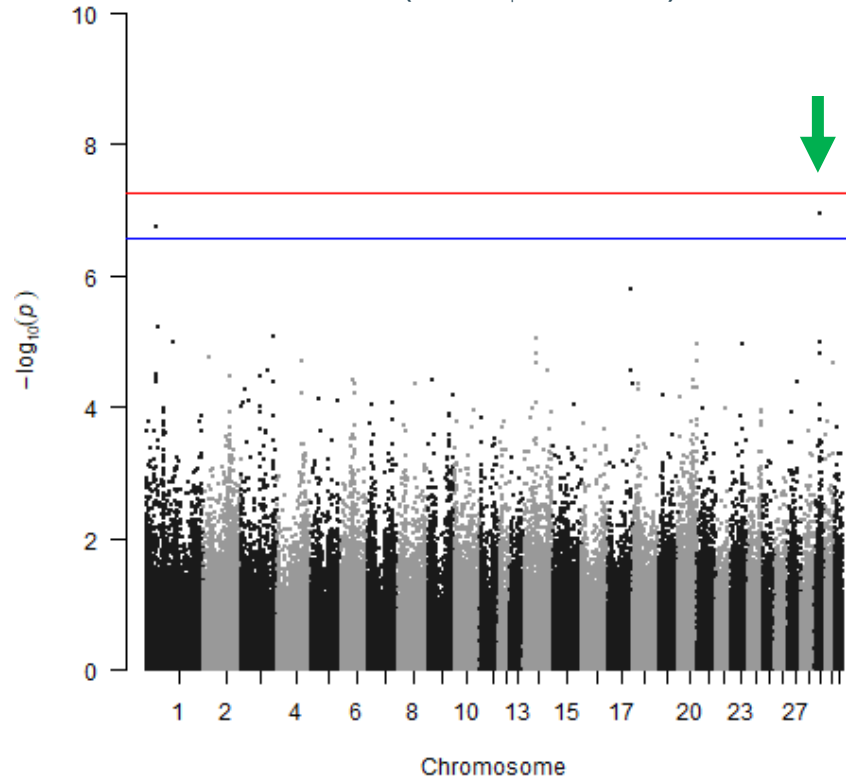
Striktere definitie  
→ ↓ aantal dieren

- Cases: : **OC sprong** +  
geen andere OC + geen botcysten  
+ ...
- Controles: **geen OC sprong** +  
geen andere OC + geen botcysten  
+ ...

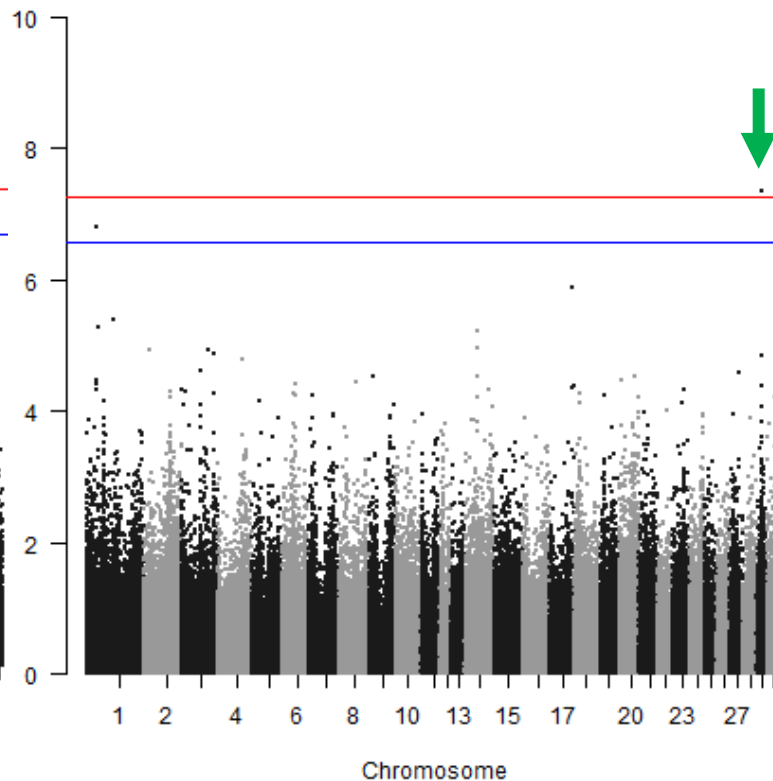
# OC sprong



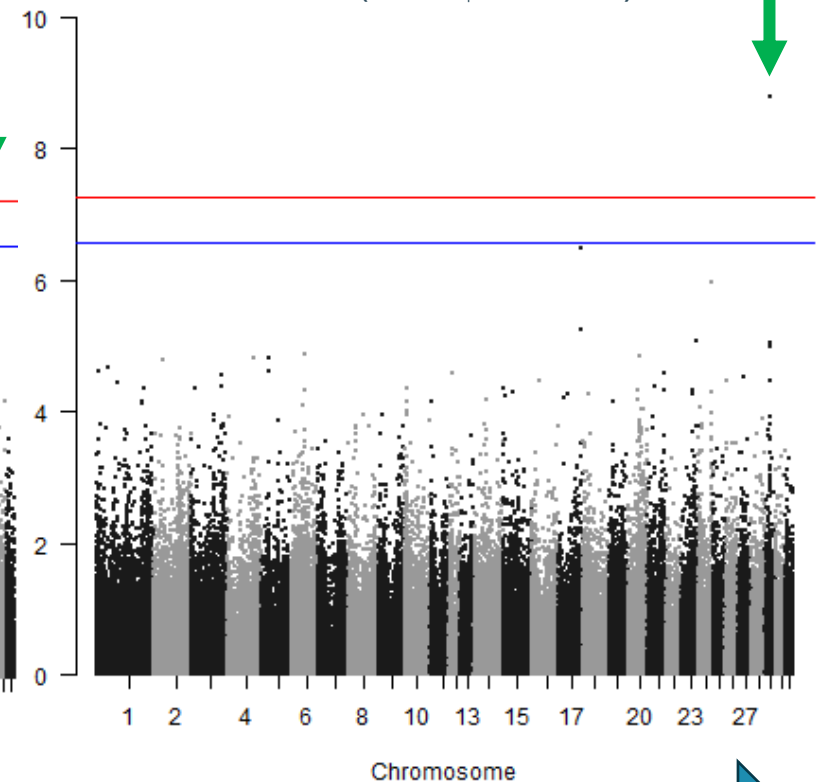
Case: 134 (57 ♀ ; 77 ♂)  
Controle: 446 (166 ♀ ; 280 ♂)



Case: 132 (56 ♀ ; 76 ♂)  
Controle: 442 (163 ♀ ; 279 ♂)

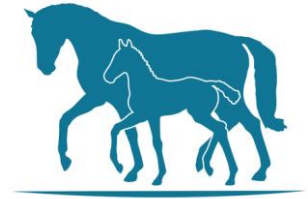


Case: 87 (40 ♀ ; 47 ♂)  
Controle: 298 (108 ♀ ; 190 ♂)

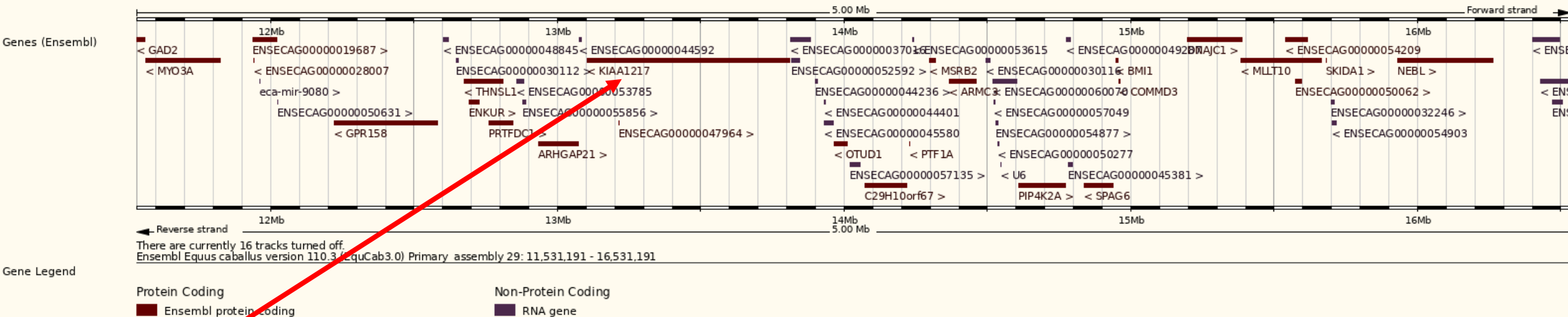


↑ striktheid definitie cases en controles

# OC sprong



- CHR 29: merker (nucleotide) 14031191



## KIAA1217:

- Belangrijk voor de **embryonale skeletale ontwikkeling**
- Belangrijk voor de ontwikkeling van de cervicale discs → is er een relatie?



# Andere gewrichten

Fenotype	Chr	BP	Significantie
OC algemeen	3	108278183	6.6
Sprong	4	10154007	7.7
Kogel	6	65253009	7.9
Kogel	9	65328285	8.3
Sprong en knie	17	19047945	6.5
Sprong DiRT		72130310	6.5
Sprong	20	35577858	6.5
OC algemeen		37377724	6.8
POF		56524409	11.7
POF	24	44083538	9.1
Sprong en knie	29	14031191	8.3
Sprong DiRT		14031191	8.8
OC algemeen	31	4948736	6.4

Hannoveraanse en Nederlandse Warmbloeden (Naccache et al., 2018; Orr et al. 2013)

Zweedse warmbloeden (Lampe et al., 2009)

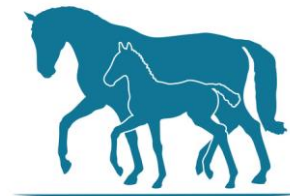


# Conclusie GWAS

- **Meerdere merkers** geassocieerd met verschillende vormen OC
- Aanwezigheid merkers → verhoogd risico op OC
- Verder onderzoek:
  - Genetische testen
  - Verbeteren **management** (voeding, huisvesting, ...)
  - Ondersteunen fokkerijbeslissingen:  
**aanvullend op de RX keuring**

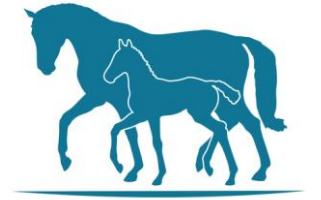
- **Ondersteunen fokkerijbeslissingen**
- **Verder onderzoek noodzakelijk**





# Inteelt (ROH) analyse

# Materiaal en methode



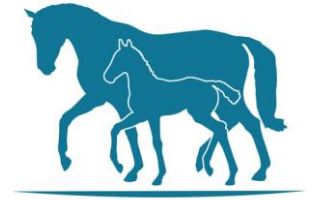
## Materiaal

- 716 paarden:
  - DNA
  - Radiografieën

## Methode

- ROH analyse\*
- **Vergelijken inteelt**
  - Tussen BWP en ZANG
  - Tussen paarden met en zonder OC sprong

# Resultaten inteelt analyse

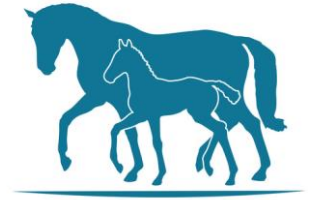


- Gemiddelde inteelt ( $F_{ROH}$ ) BWP and ZANG is **niet significant verschillend**
- Gemiddelde inteelt CASES en CONTROLES is **niet significant verschillend**
- **MAAR** cases meer recente (sinds  $\pm 100$  jaar) inteelt

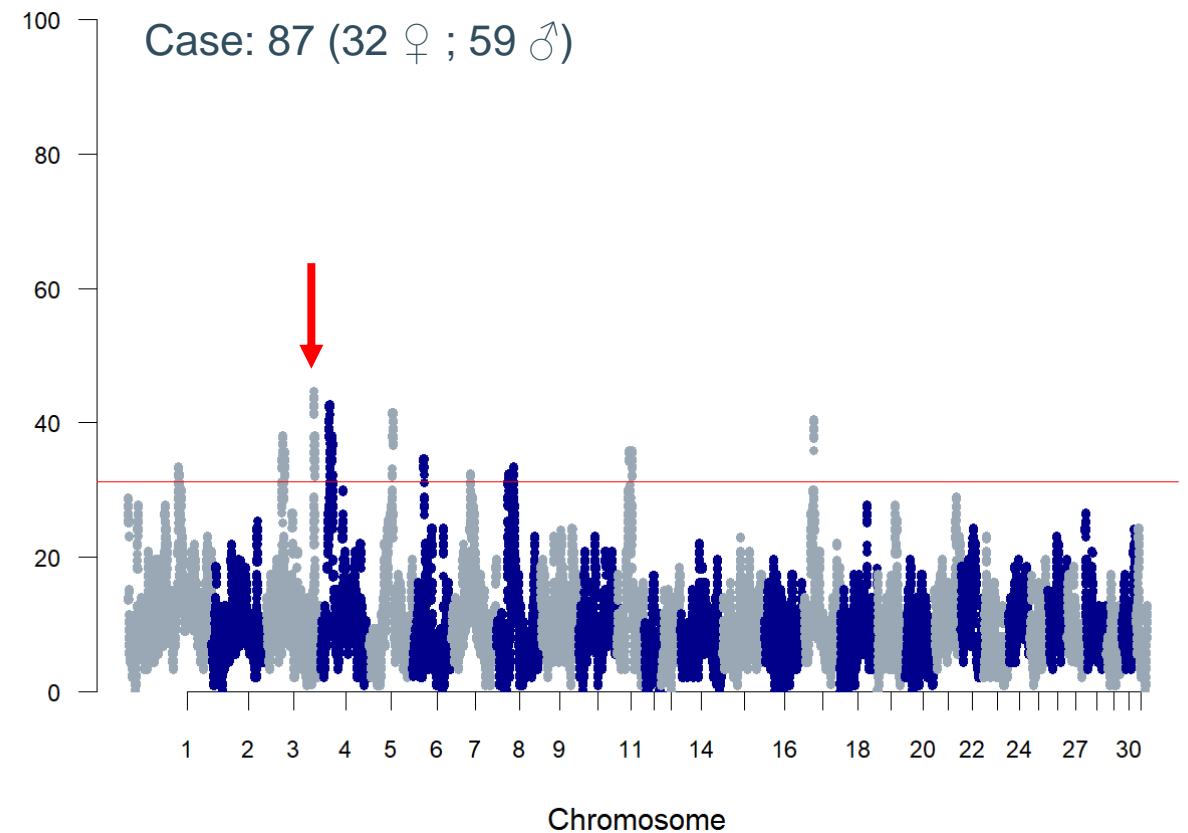
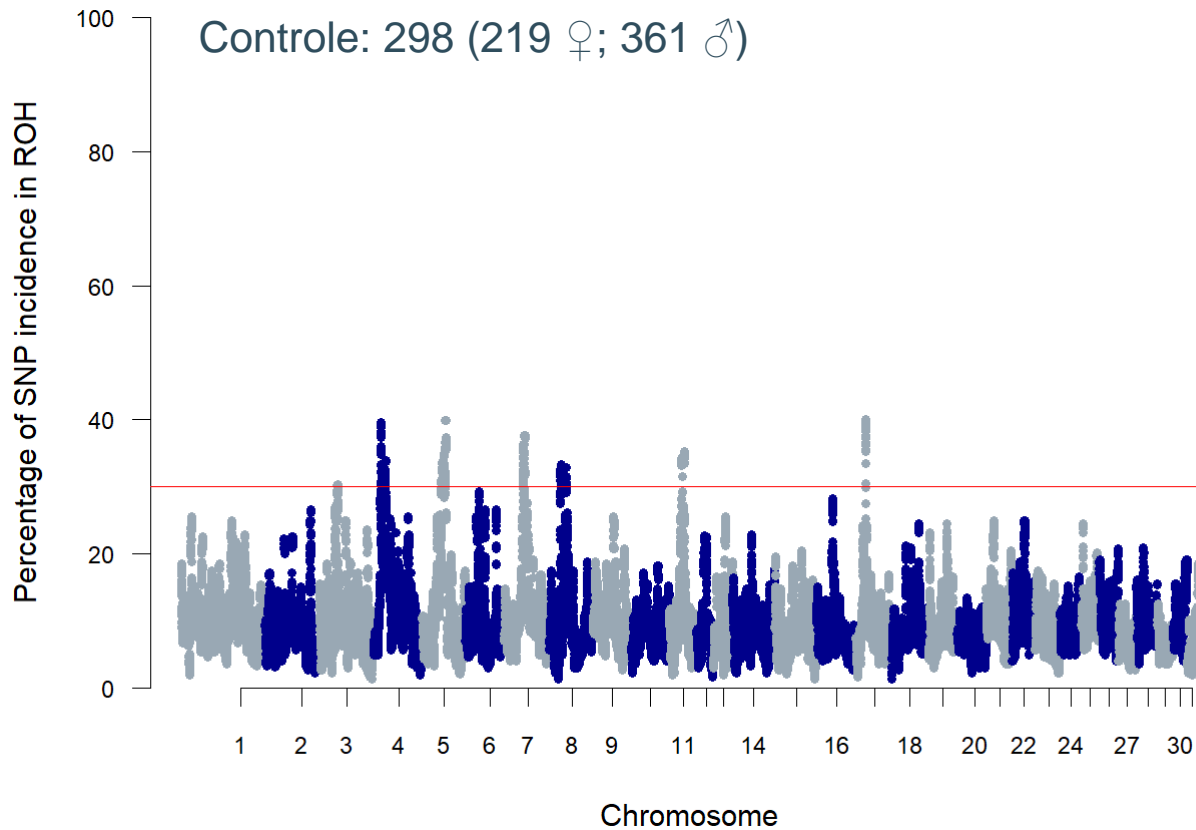
	BWP	ZANG	BEL
$N_{\text{animals}}$	402	177	579
$F_{ROH}$	9.46	9.61	9.51

	CONTROLE	CASE
$N_{\text{animals}}$	298	87
$F_{ROH}$	9.75	9.75
$F_{ROH}$ 1-4 Mb	5.92	5.58
$F_{ROH} > 5$ Mb	2.96	3.32
$F_{ROH} > 16$ Mb	0.26	0.35

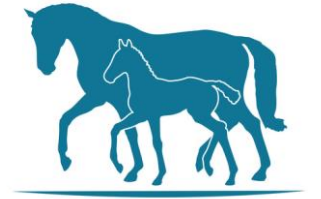
# Inteelt: OC sprong



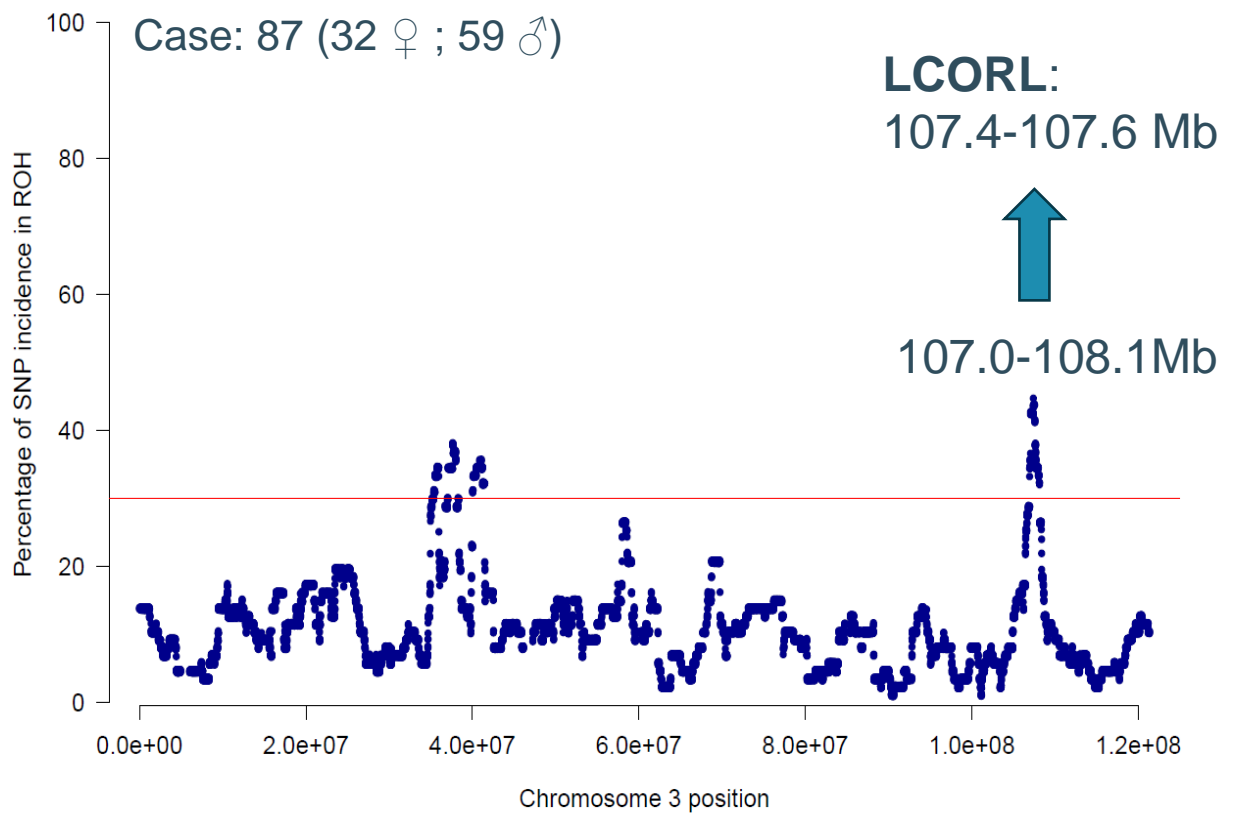
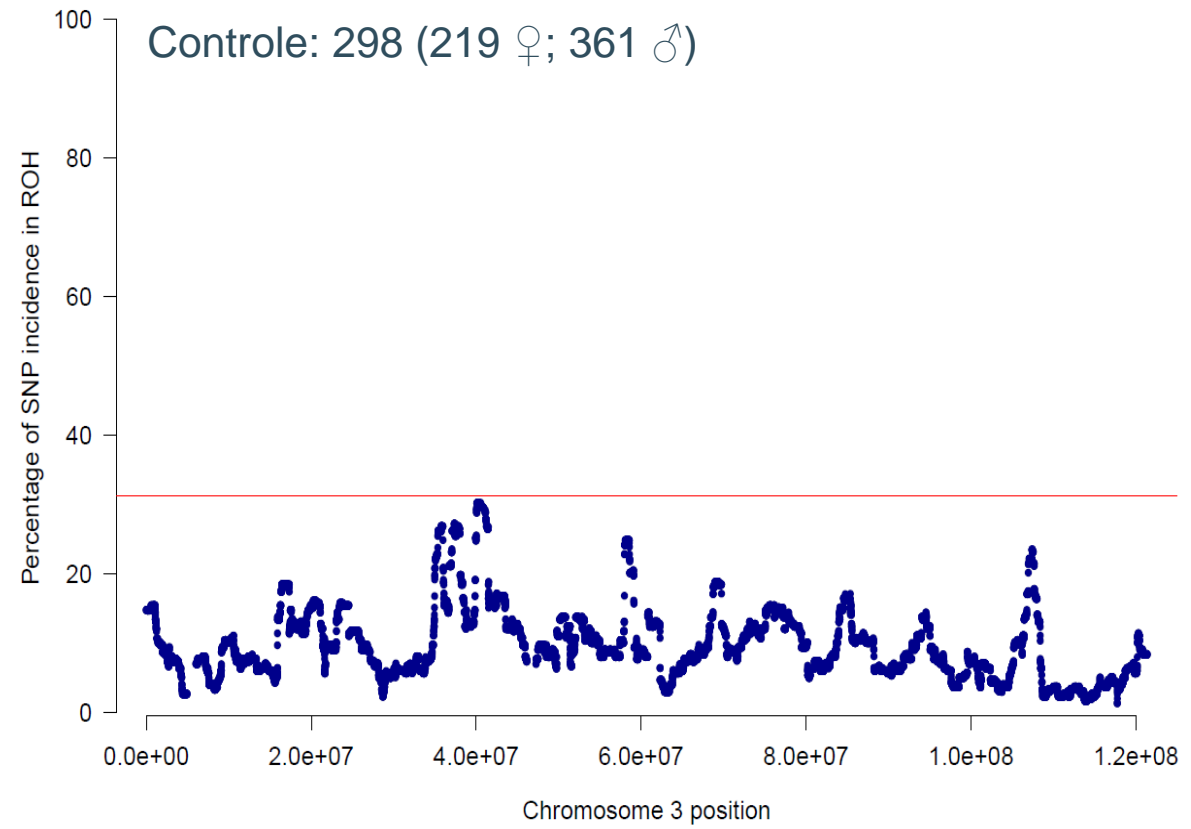
- Gekeken op chromosoom niveau
- Pieken = lokale erg ingeteeld regio's in het DNA



# Inteelt: OC sprong



- **Close-up** beeld van chromosoom 3
- LCORL: gen belangrijk in de bepaling van de **schofthoogte**



# Conclusie inteelt

- Verband met tussen OC en hoeveelheid recente inteelt
- Relatie tussen DNA-locatie (thv schofthoogte-gen) met veel inteelt en **OC van de sprong**

- **Monitoren inteelt (ET en ICSI-OPU)**
- **Nood systematische bepaling DNA info**



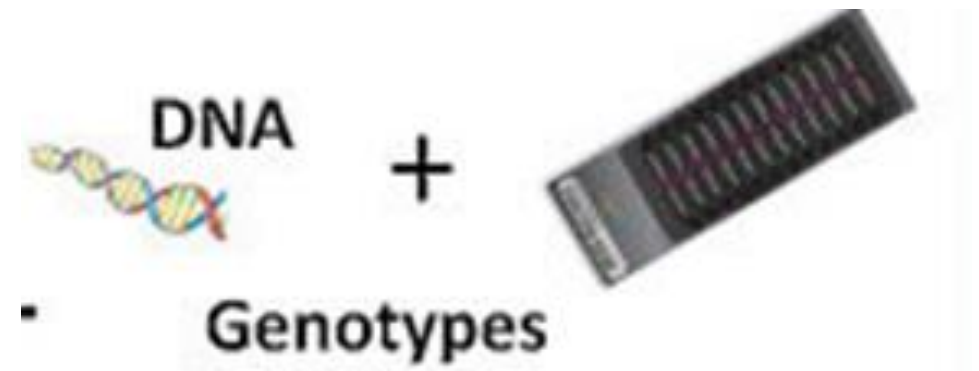


# Toepassingen van genomica bij paarden

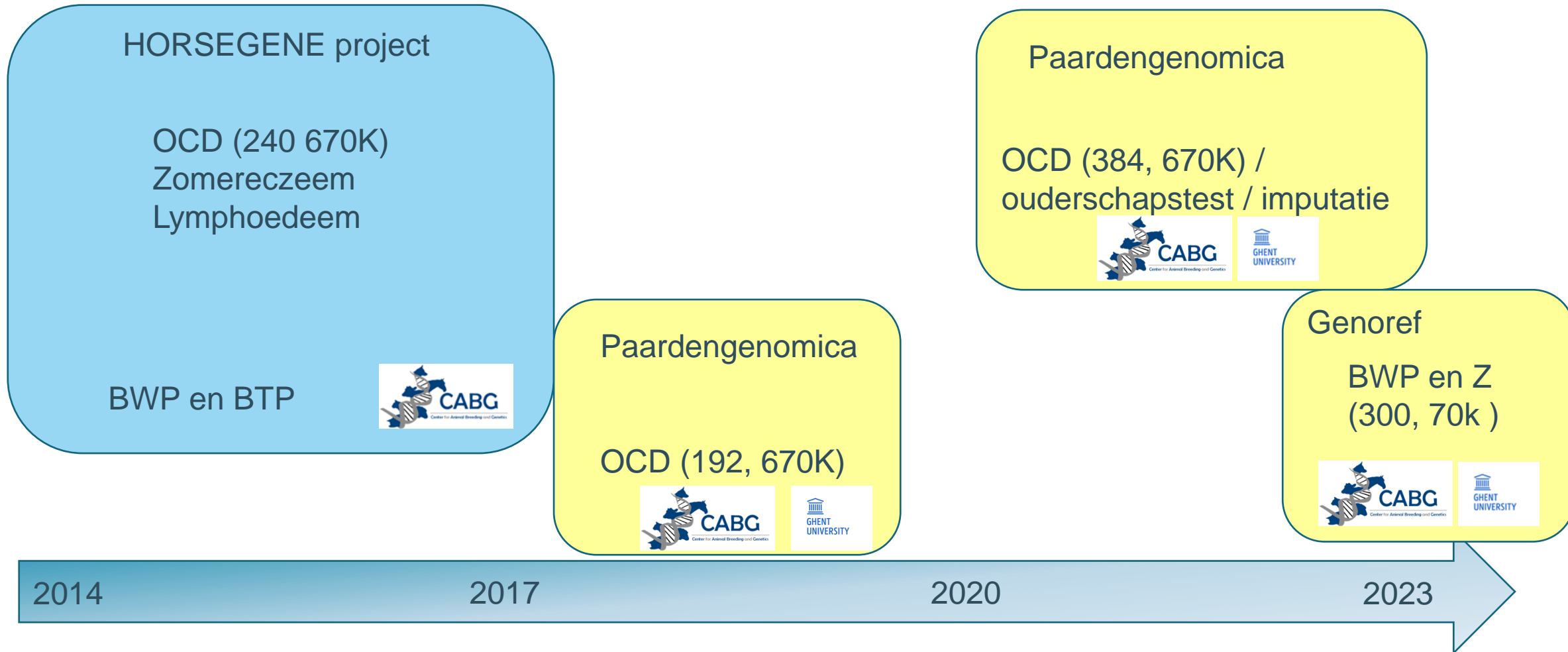
Léa Chapard, Bram Van Mol, Frederik Pille, Maarten Oosterlinck,  
Steven Janssen en Nadine Buys

# Waarom zetten we in op genomica?

- Sinds 2009 is genoom van paard gekend => nieuwe tools komen ter beschikking aan betaalbare prijzen
- Evolutie in de fokkerij van alle diersoorten om DNA informatie direct te benutten voor fokkerij (melkvee is forerunner)
- Heel veel nieuwe mogelijkheden  
...vooral voor gezondheidskenmerken
- Kostprijs daalt



# Genomica Onderzoek Vlaanderen



# SNP arrays zijn een multi-tool



- Major genen (ziekte, kleur, ...)
- Afstammingscontrole
- Fokwaardeschatting (Genomische selectie)
- Verwantschap tussen rassen en genetische samenstelling van een dier
- Inteeltgraad van een dier (ROH cfr Bram)
- Onderzoek naar aandoeningen via GWAS (cfr OCD, Bram)

# Genetische testen op array

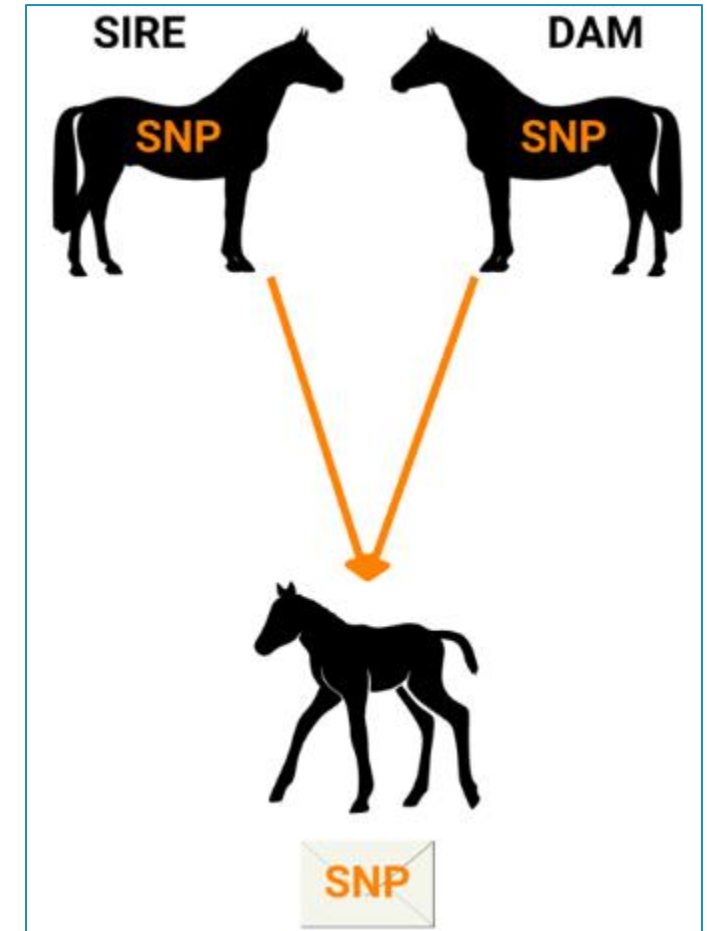
- Voorbeelden:
  - WFFS (Warmbloed)
  - SCID (Arabieren)
  - PSSM (Trekpaard, Vlaams)
  - ...
- Soms royalty-kost
- Mogelijkheid om testen toe te voegen

Health
Cerebellar abiotrophy
Epidermolysis bullosa, junctionalis
Hyperkalemic periodic paralysis II (HYPP)
Dwarfism with joint laxity
HERDA — hereditary equine regional dermal asthenia
Hoof wall separation syndrome
Hydrocephalus
Incontinentia pigmenti
Malignant hyperthermia
Myotonia
Naked foal syndrome
SCID — severe combined immuneodeficiency
Glanzmann thrombasthenia
Multiple ocular defects
Lavender foal syndrome*
Warmblood fragile foal syndrome*
Polysaccharide storage myopathy / exertional rhabdomyolysis*
Congenital stationary night blindness*
Ocular squamous cell carcinoma
Dwarfism, ACAN-related
Androgen insensitivity syndrome (AIS)
Gilbert-meulengracht syndrome
Congenital hepatic fibrosis 1
Foal immunodeficiency syndrome
Risk Variants
Immune-mediated myositis
Lordosis (swayback)
Curiosity and vigilance
Equine recurrent uveitis

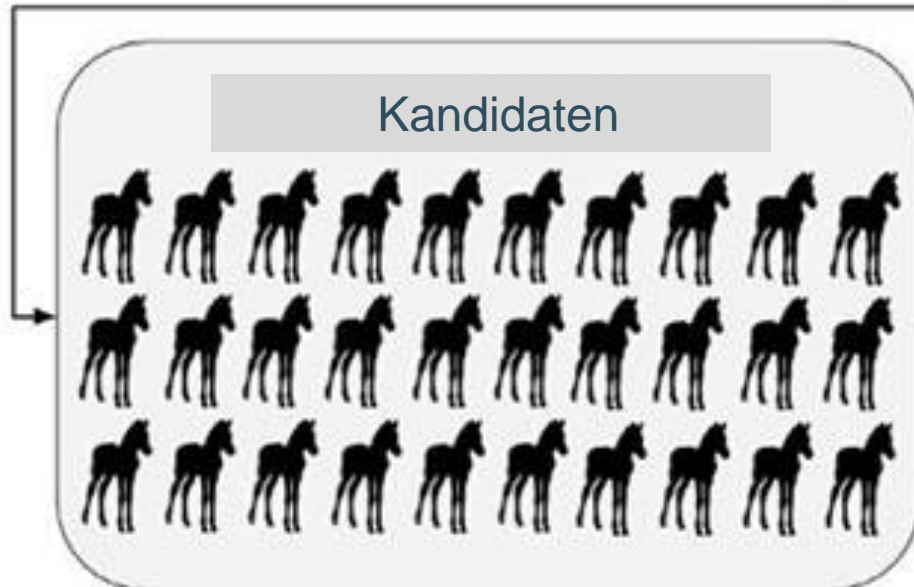
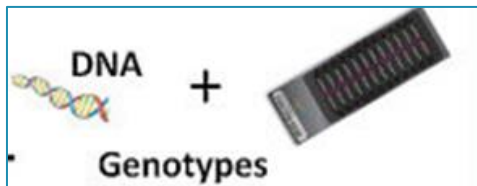
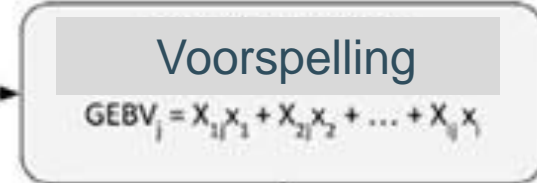
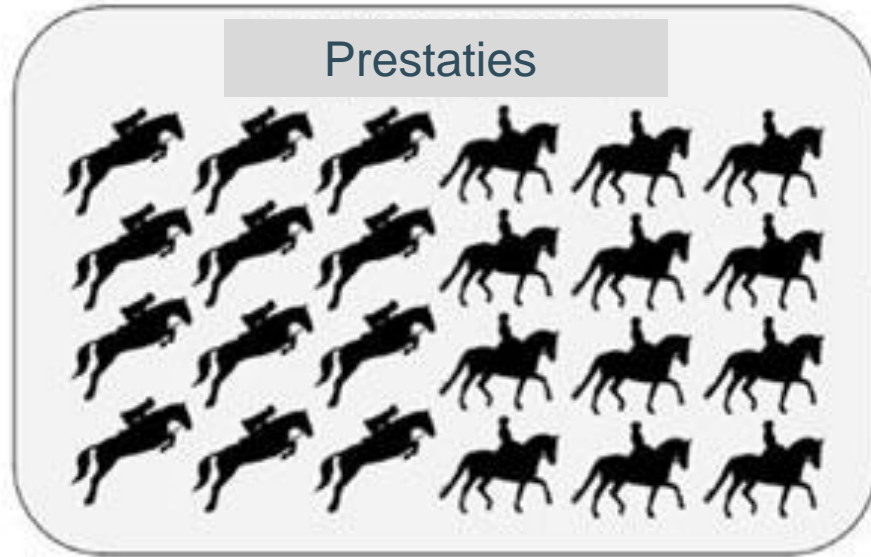
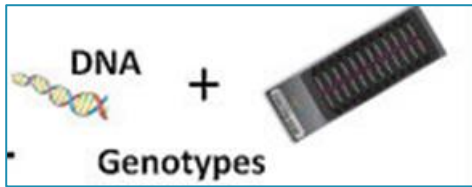
Coat Colors
Extension (red/black factor)
Modifying mutation to extension
Recessive black (agouti)
Cream dilution
Pearl
Non-dun 1
Non-dun 2
Silver
Champagne
Grey
Frame overo (lethal white overo)
Tobiano
Leopard complex spotting*
Curly hair variant 1
Curly hair variant 2
Dominant white (W1-W23)
Macchiato
Brindle / incongenitia pigmenti
Brindle (BR1)
Sabino
Splashed white 1
Splashed white 2
Splashed white 3
Splashed white 4
Pattern 1 (PATN1)
Size Variation
Body size
Pony size

# Ouderschapscontrole met SNP-array

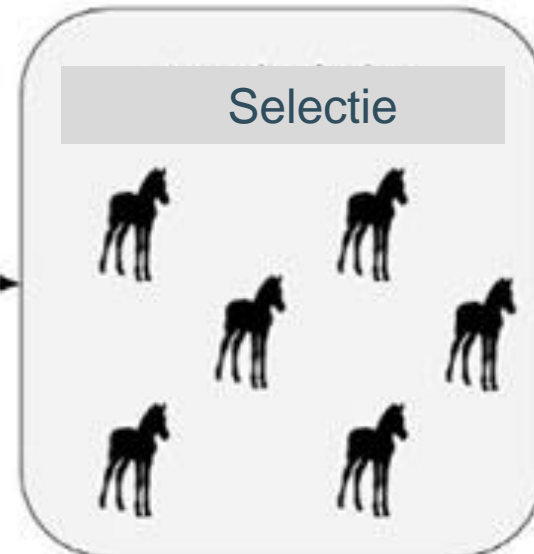
- Momenteel op basis van 17 microsatellieten (ander soort merker – andere analysemethode)
- International Society of Animal Genetics coördineert
- Doel: consensus voor een **set** van gemeenschappelijke SNPs (**2000**)
- Iedere commerciële SNP array zal deze **set** bevatten zodat de profielen kunnen uitgewisseld worden



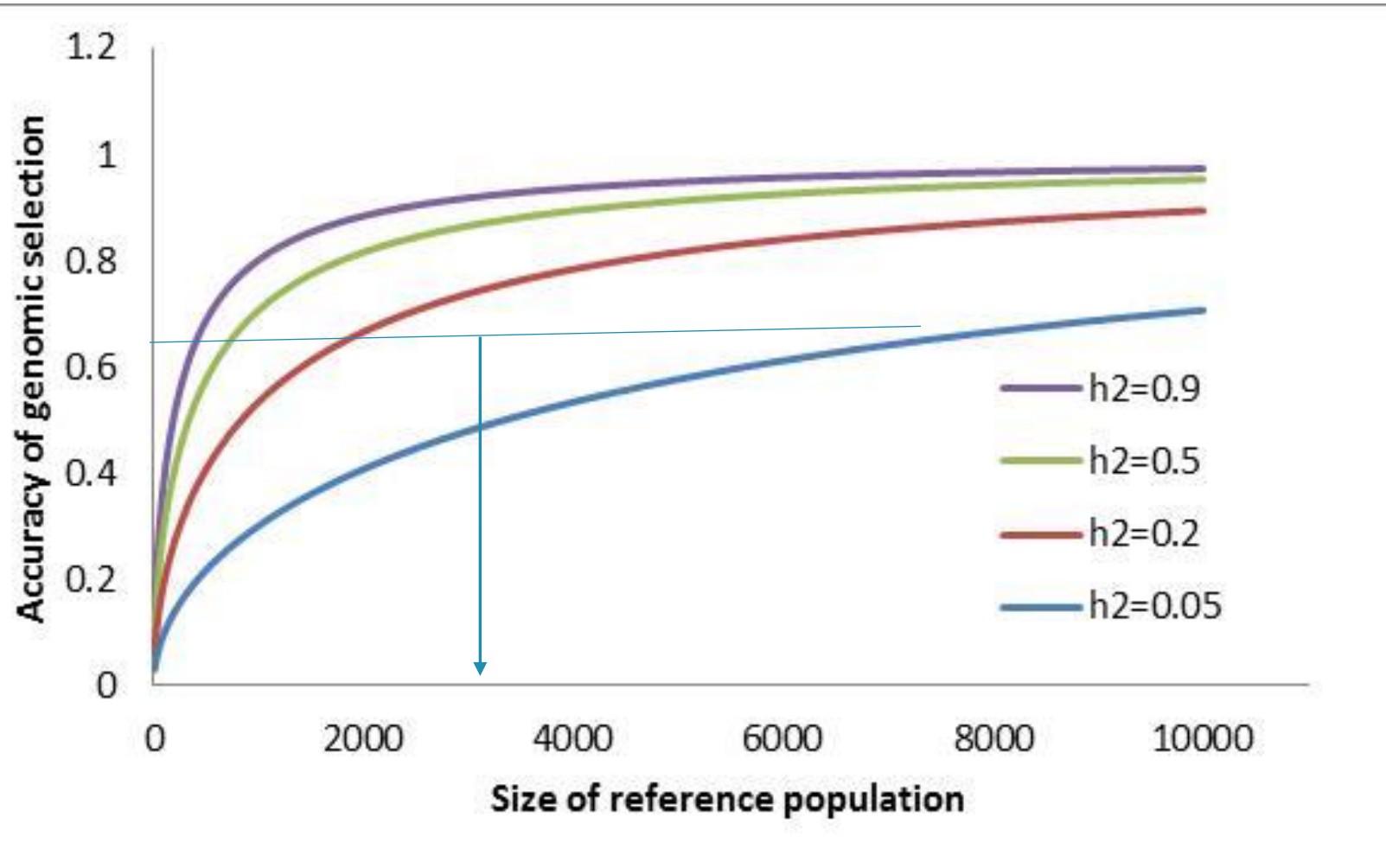
# Genomische selectie (GBLUP)



GEBV



# Hoe groot moet de referentiepopulatie zijn?

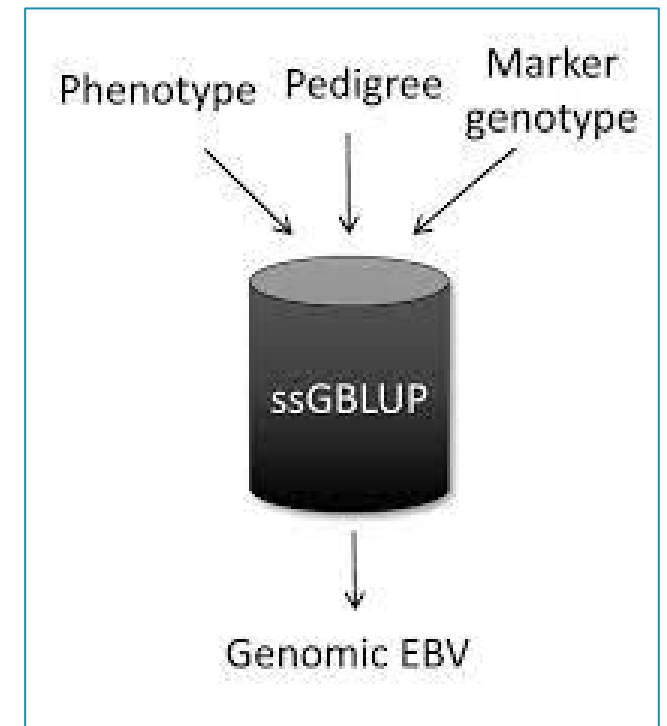


- Schofthoogte  $h^2=0.7$
- Sportprestatie  $h^2=0.15$
  
- 3000 dieren => betrouwbaarheid van veulen is 65% voor kenmerk met  $h^2=0,15$  (~ jonge hengst eigenprestaties)



# Wat speelt een grote rol bij Genomische Selectie

- Blijven meten is nodig !!!
- Preciesere metingen => hogere erfelijkheidsgraad  
=> Genomische Selectie nog accurater
- Meer dieren meten (en genotyperen) verhoogt precisie
- Nieuwe techniek *Single Step GBLUP*  
combineert “*metingen, pedigree en genotypes*”  
in één stap  
(ipv. de 2 stappen)



# Effecten van genomische selectie.... ..... ivm. klassieke selectie

- Genetische vooruitgang +20% tot +50%
- Door voorspelling fokwaarde op jonge leeftijd
- Voor kenmerken die moeilijk te meten, kostelijk of geslachtgebonden zijn
- Maar door strengere selectie meer risico op verlies van genetische diversiteit



# Uitbouw referentiegroep

- GENOREF: genotypes verzamelen van 300 sportpaarden
- Referentie om genomic selection mogelijk te maken
- Zowel hengsten en merries van BWP en Z
- Hergebruik van bestaand haarstaal / bloedmonster, eventueel extra staal

# Met SNPs inzoomen op het genoom

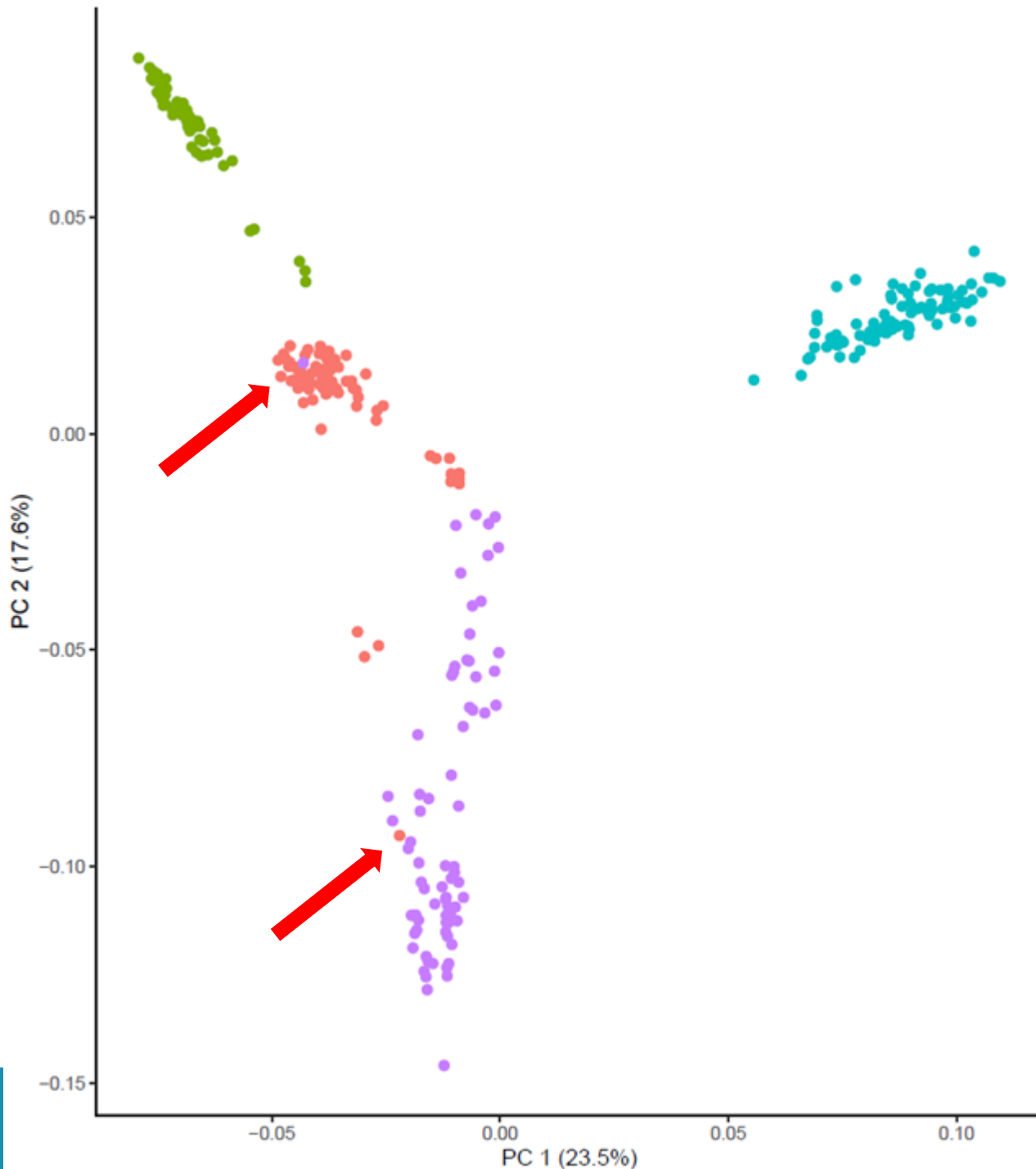
- Werkelijke inteelt van een dier (cfr presentatie Bram)
- Schatting van de diversiteit van een ras
- Aandeel van rassen in een dier
- Verwantschap van rassen
- .....

# Diversiteit van Warmbloed paarden

	BWP + Z paarden (n=579 )
Toename van de inteelt (per generatie)	0.0077
Effectieve grootte	65.1

- Effectieve grootte best >100
- Minder dan 50 is ongunstig
- Veel diersoorten hebben effectieve grootte tussen 50 en 100
- Effecten ICSI en ET (nog) niet zichtbaar want recentste stalen van dieren < 2020

# Positionering dieren volgens ras in databank

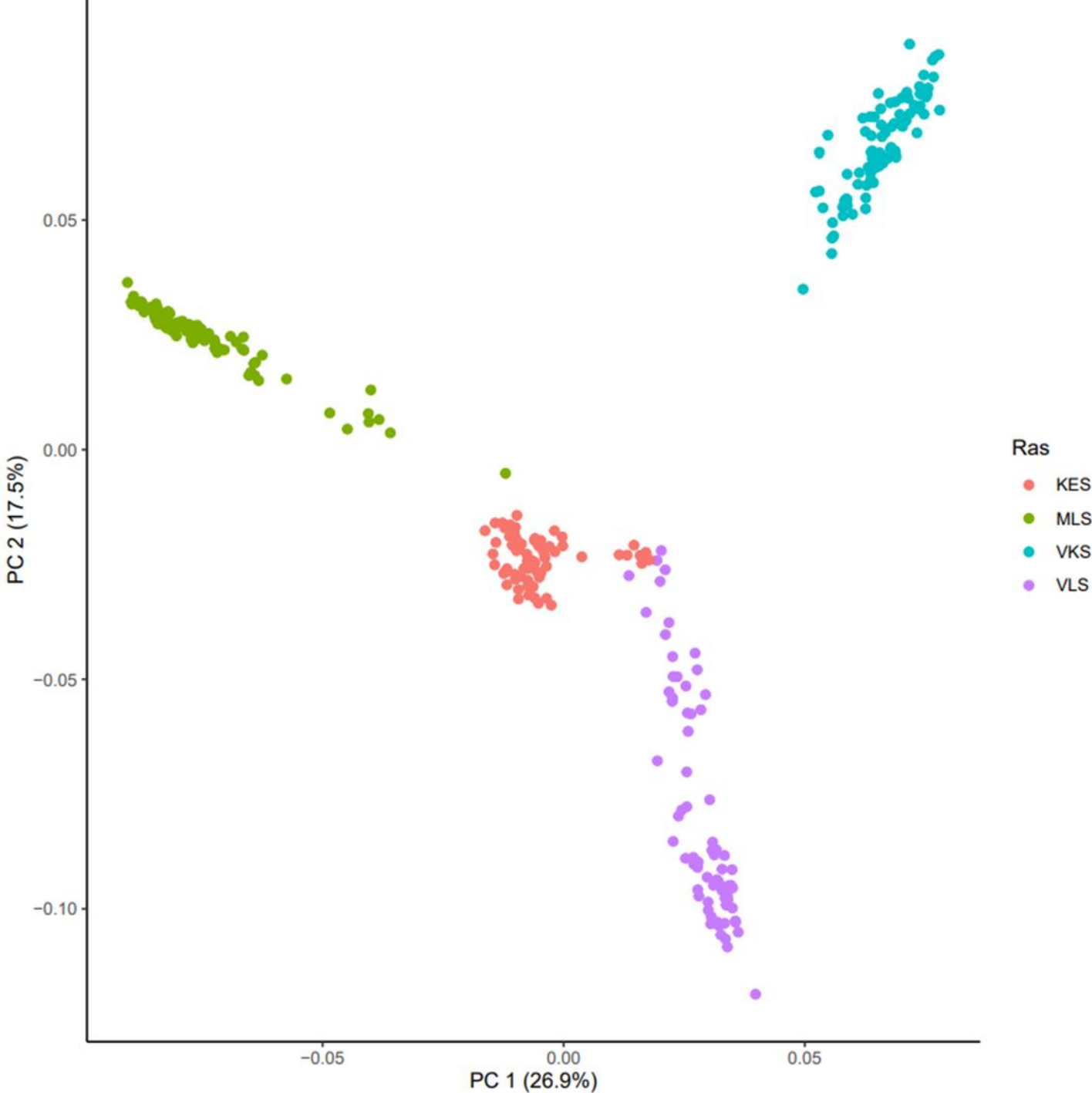


- Elk puntje is een dier en per ras één kleur.  
Dieren worden geclusterd volgens hun genotypes

- Hier eerste 2 dimensies (PC1 en PC2)

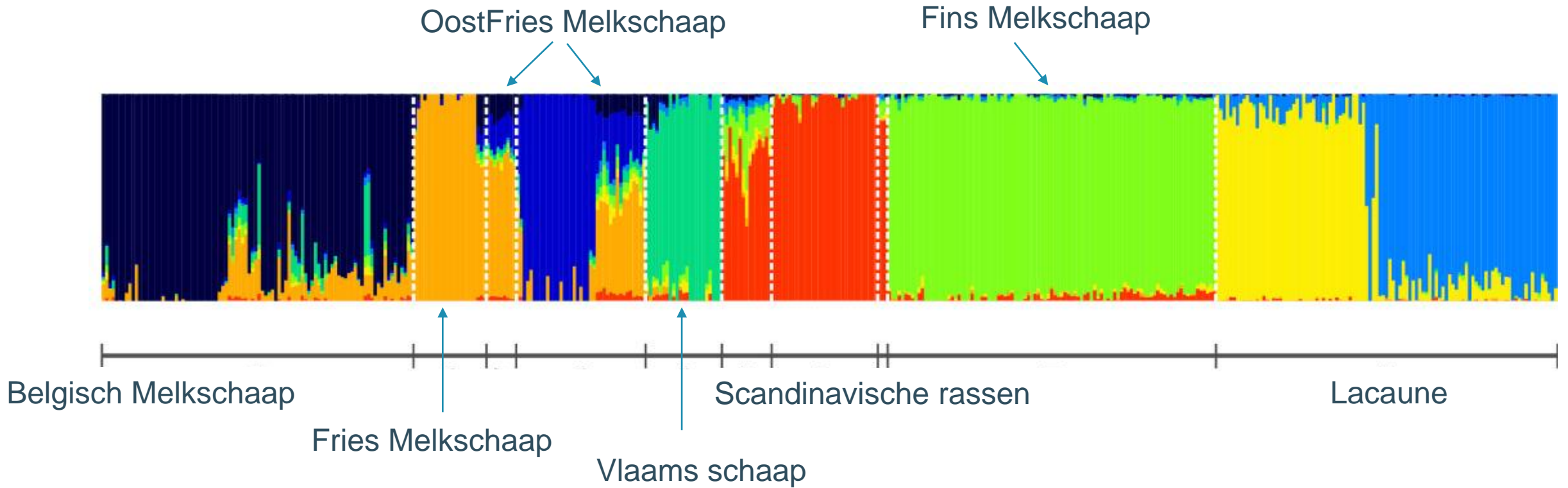
- 2 probleemdieren (rode pijl)

- Methode =  
Principaal Componenten Analyse (PCA)



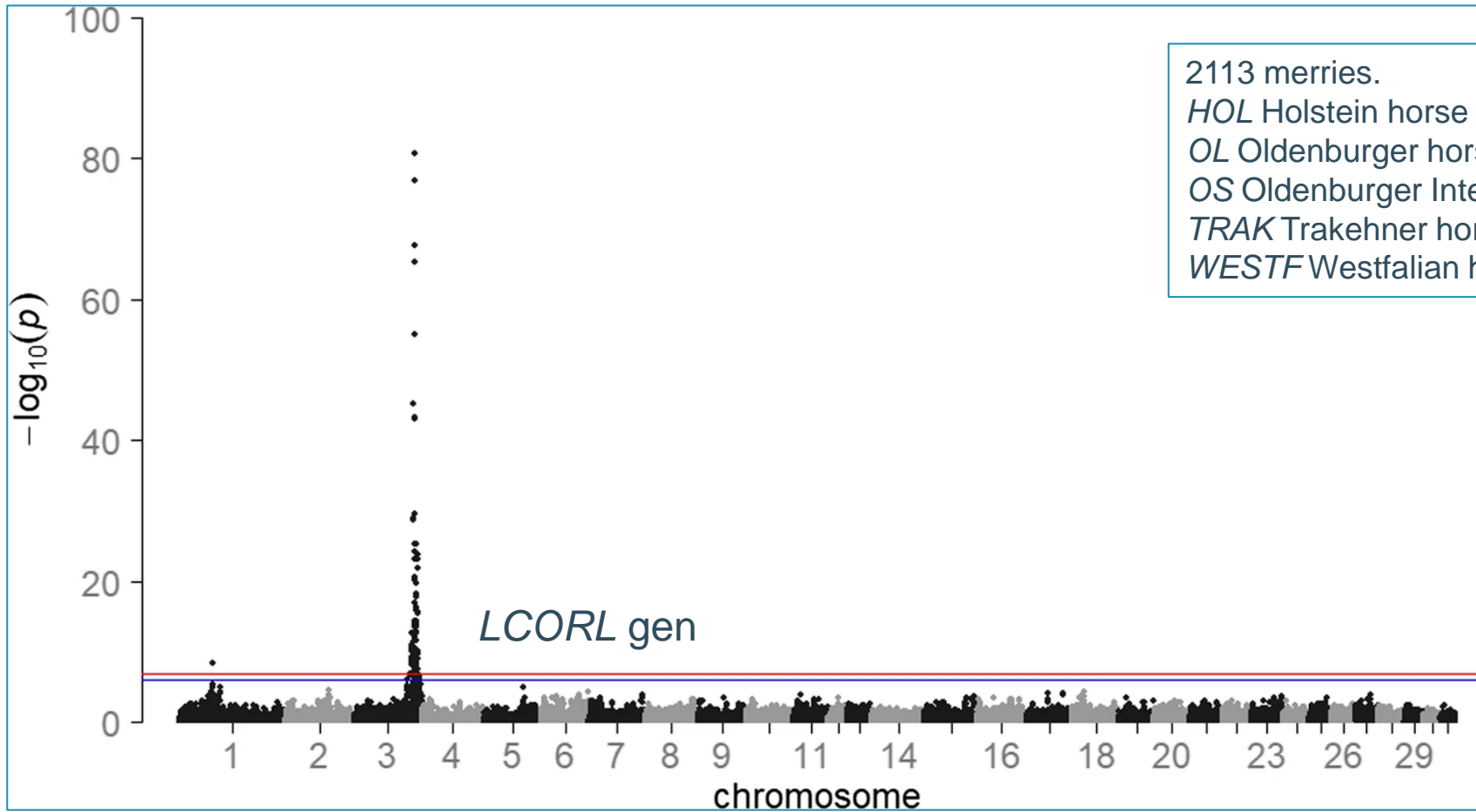
- Zonder de 2 twijfelgevallen
- Afgetekende clusters
- Mogelijkheid om dieren toe te wijzen aan rassen, kruisingen te ontdekken e.d.

# Rasaandeed schatten (vb schapen)



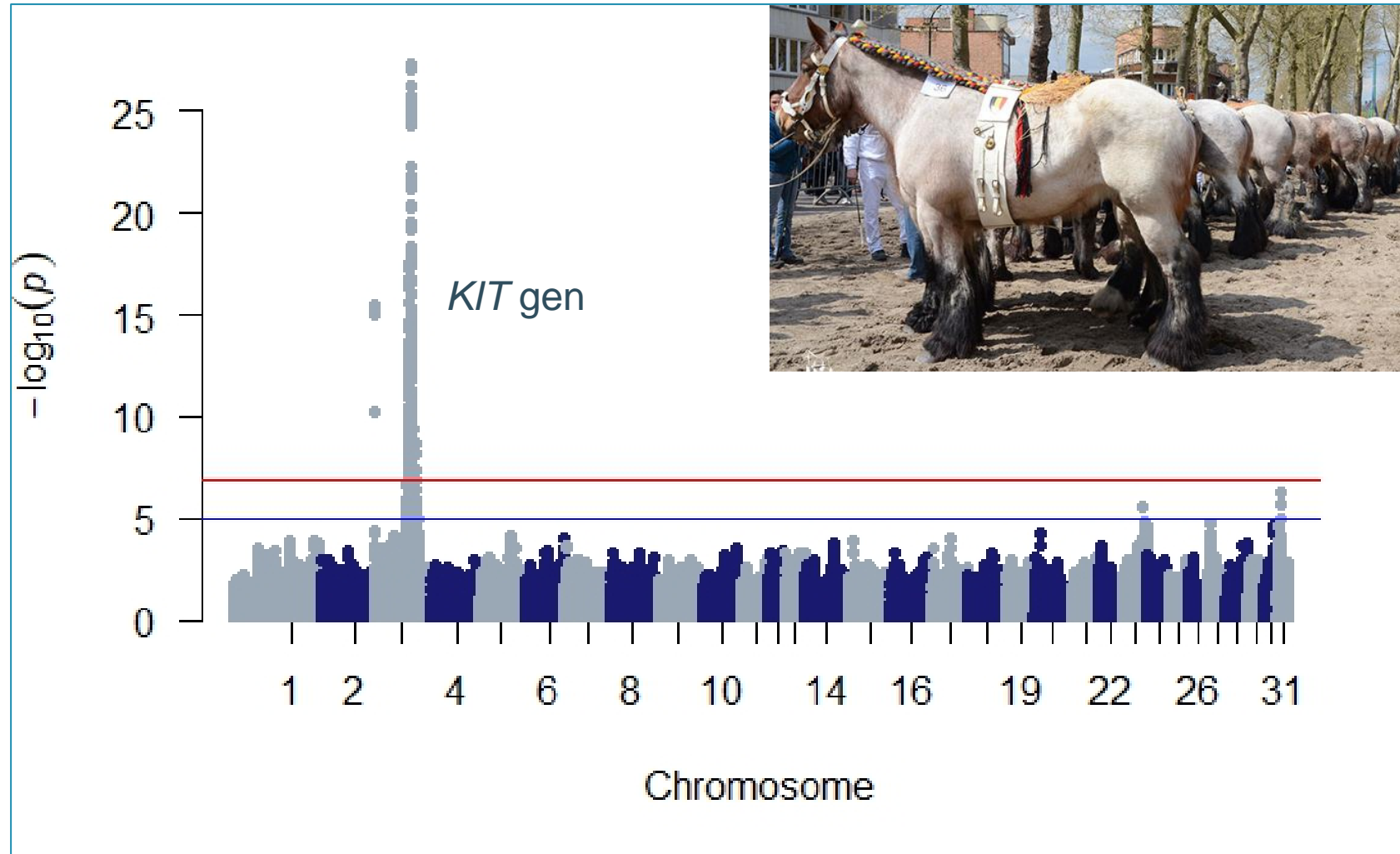


# Associatie met schofthoogte bij Warmbloeden



2113 merries.  
*HOL* Holstein horse breed ( $n = 982$ ),  
*OL* Oldenburger horse breed ( $n = 444$ ),  
*OS* Oldenburger International horse breed ( $n = 98$ ),  
*TRAK* Trakehner horse breed ( $n = 416$ ),  
*WESTF* Westfalian horse breed ( $n = 173$ ).

# De haarkleur “schimmel” bij het Belgisch Trekpaard



# Besluiten

- SNP merkers openen weg naar verschillende toepassingen
- Kostprijs voor 70k array is nu onder de 30 euro gedaald
- Voor deze prijs krijg je als fokker/eigenaar ouderschapscontrole, testen op kleurgenen en erfelijke testen en een betere fokwaardeschatting (indien dat systeem ingevoerd is)
- Onderzoek naar nieuwe aandoeningen mogelijk en daarnaast ook gebruik in nieuwe fokwaardeschattingen

Dank voor de  
ondersteuning en voor  
uw aandacht, ...





# Paneldiscussie

# Paneldiscussie



- Omgevingsfactoren:
  - Beweging?
  - Voeding?
- Functioneel belang van OC:
  - Invloed OC op sportprestaties?
  - Worden er niet teveel paarden geopereerd?
- Genetica:
  - Mening over het D-OC predikaat bij KWPN?
  - Kan het dat hengsten die goede springkwaliteit vererven ook meer OC vererven?

