

Centronukleär myopati hos danska labradorer



Examensarbete Veterinärprogrammet

Jessica Astermark V9289

Malin Larsson V9348

Handledare: Helle Friis Proschowsky

Biträdande handledare: Susanna Cirera

Januari 2009

Institut for Basal Husdyr- og Veterinærvidenskab

Det Biovidenskabelige Fakultet

Københavns Universitet

Sammanfattning

En sex månader gammal labradortik, född år 2005, remitterades till Hospital for Mindre Husdyr i Köpenhamn och diagnostiserades med centronukleär myopati (CNM). Med detta som utgångspunkt valde författarna att undersöka allelfrekvensen av anlaget för CNM hos danska avelslabradorer med valpkullar födda år 2005 och därmed försöka bidra till att begränsa utbredningen av sjukdomen. En litteraturstudie gjordes över sjukdomens kliniska symptom, parakliniska och histopatologiska fynd, diagnostik, behandling, prognos, differentialdiagnoser och identifiering av orsaken till CNM.

CNM är en autosomalt recessiv myopati som är specifik för labradorer. Sjukdomen orsakas av en homozygot insertion av en short interspersed element (SINE) inom exon 2 i en gen som uttrycks i skelettmuskulatur. En observationell tvärsnittsstudie utformades för att undersöka utbredningen av anlaget för CNM och en förfrågan om deltagande sändes till danska labradorägare. Ägarna uppsamlade själva DNA från sina labradorers kindslemhinnor och överförde det till FTA-kort. Ett mutationstest genomfördes där DNA extraherades från FTA-korten och amplifierades med hjälp av polymerase chain reaction (PCR). Efter gelelektrofores kunde det avläsas om labradorerna var homozygot normala, heterozygoter eller homozygot afficerade.

Grundat på föreliggande undersökning är allelfrekvensen av anlaget för CNM 2,2 % bland danska avelslabradorer med valpkullar födda och registrerade i Dansk Kennel Klub år 2005. Dansk Retriever Klub har upprättat en lista över labradorer testade för CNM i ett försök att få en reell och aktuell bild över utbredningen av sjukdomen i Danmark. Detta kan bli början till en diskussion om ett eventuellt införande av en avelsrestriktion.

Nyckelord: centronukleär myopati, danska labradorer, allelfrekvens, autosomalt recessiv sjukdom, SINE, mutationstest, avelsrestriktion.

Abstract

A six-month old Labrador Retriever bitch, born in 2005, was referred to the Small Animal Veterinary Teaching Hospital, Copenhagen. The bitch was diagnosed with centronuclear myopathy (CNM). Based on this case the frequency of the allele causing CNM in Danish Labrador Retrievers used in breeding in 2005 was defined as the problem formulation and the aim was to contribute to the confinement of the prevalence of the disease. A literature study was made on the clinical symptoms of the disease, the paraclinical and histopathological findings, the diagnosis, the treatment, the prognosis, the differential diagnosis and the identification of the cause of CNM.

CNM is an autosomal recessive myopathy specific to Labrador Retrievers. The disease is caused by a homozygote insertion of a short interspersed element (SINE) within exon 2 in a gene expressed in skeletal muscles. An observational cross-sectional study was designed and owners of Danish Labrador Retrievers were inquired to participate. The owners were asked to collect a DNA sample from their Labrador Retriever by transferring a cheek swab to a FTA-card. A test for the mutation causing CNM was performed by extracting DNA from the FTA-cards and amplifying it with polymerase chain reaction (PCR). A gel electrophoresis showed whether the Labrador Retrievers were normal homozygotes, heterozygotes or affected homozygotes.

Based on this study the frequency of the allele causing CNM is 2.2 % among Danish Labrador Retrievers with litters born and registered in the Danish Kennel Club in 2005. The Danish Retriever Club has established a list of Labradors Retrievers tested for CNM as an attempt to get a picture of the prevalence of the disease in Denmark. This could start a discussion about a possible breeding restriction.

Keywords: centronuclear myopathy, Danish Labrador Retriever, allele frequency, autosomal recessive disorder, SINE, mutation test, breeding restriction.

Förord

Syftet med rapporten är att belysa centronukleär myopati (CNM) för personer som är involverade i avel av labradorer och därmed försöka bidra till att begränsa utbredningen av sjukdomen. Intresset för CNM väcktes våren 2007 då vi som en del av vår smådjursdifferentiering på Det Biovidenskabelige Fakultet, Københavns Universitet fick till uppgift att skriva en case-rapport inom genetik om en labrador som drabbats av CNM. Den för oss tidigare okända recessiva labradorsjukdomen väckte funderingar kring allelfrekvensen av anlaget för CNM i Danmark. Funderingarna växte till ett gemensamt beslut om att undersöka detta närmare i ett examensarbete.

Först och främst riktas ett stort tack till vår handledare, lektor Helle Friis Proschowsky, som stöttat, väglett oss och svarat på oändligt många frågor genom hela processen. Även tack till lektor Susanna Cirera, laboratoriefunktionär Majken Madvig Jansen och Institut for Basal Husdyr- og Veterinærvidenskab, Det Biovidenskabelige Fakultet, Københavns Universitet. Tack till Dansk Kennel Klub som har bidragit både praktiskt och ekonomiskt till projektet. Sist men inte minst tackas samtliga labradorägare inklusive Marianne Jensen, som bidragit med engagemang och material till undersökningen – utan er hade det inte varit möjligt.

Januari 2009, Köpenhamn

Jessica Astermark

Malin Larsson

Innehållsförteckning

1. Inledning	1
1.1 Bakgrund	1
1.2 Problemformulering	1
1.3 Avgränsning	1
1.4 Metodavsnitt.....	1
2. Centronukleär myopati.....	2
2.1 Kliniska symptom	2
2.2 Parakliniska undersökningar	4
2.3 Histopatologiska fynd	4
2.4 Namngivning av sjukdomen.....	6
2.5 Diagnostik	6
2.6 Behandling och prognos.....	7
2.7 Differentialdiagnoser.....	7
2.8 CNM i en dansk labradorkull	9
2.9 En lista över labradorer testade för CNM	11
3. Identifiering av orsaken till CNM.....	11
3.1 Segregation av CNM i ett genealogiskt diagram	11
3.2 Kartläggning av sjukdomslokuset	12
3.3 Identifiering av den humana homologa regionen.....	13
3.4 Identifiering av kandidatgenen.....	13
3.5 Identifiering av mutationen	13
3.6 Kvantifiering av <i>PTPLA^{alf}</i> - och <i>PTPLA</i> transkripterna.....	16
3.7 Orsaken till CNM	17
4. Material och metoder	17
4.1 Undersökning av allelfrekvensen av anlaget för CNM.....	17
4.2 Val av labradorer till att ingå i undersökningen	17
4.3 Insamling av DNA från de utvalda labradorerna	18
4.4 Insamling av kontroll-DNA	18

4.5	Utvinning av DNA från FTA-kort	18
4.6	Amplifiering av DNA.....	19
4.7	Separering av DNA fragment.....	19
4.8	Utskick av attester	20
5.	Resultat.....	20
6.	Diskussion	23
7.	Slutsats.....	27
8.	Perspektivering.....	27
	Referenser	28

Bilagsförteckning

- Bilaga 1: FTA-kort
- Bilaga 2: Muskelfysiologi
- Bilaga 3: Genetiska facktermer
- Bilaga 4: Informationsbrev med svarstalong
- Bilaga 5: Vägledning till uppsamling av DNA
- Bilaga 6: Attest
- Bilaga 7: Hardy-Weinberg lagen
- Bilaga 8: Avelsrestriktioner

1. Inledning

1.1 Bakgrund

En sex månader gammal labradortik, född år 2005, remitterades år 2006 till Hospital for Mindre Husdyr i Köpenhamn. Vid undersökning uppvisade labradoren bunny jump, kyfos, stel gång och ataxi som förvärrades vid motion. Labradoren var underviktig, hade muskelatrofi och bilateral avsaknad av patellareflexer och visade dessutom utmattning och muskeltremor efter mild motion. Ägaren upplyste att labradoren var inappetent sedan lång tid tillbaka. Myasthenia gravis avvisades med hjälp av mätning av antikroppar mot acetylcholinreceptorer. Vid elektromyografi och mätning av motorisk nervledning mättes normal aktivitet och normal nervledningstid. Borrelia och *Neospora caninum* avvisades efter mätning av antikroppar. Centronukleär myopati (CNM) misstänktes och DNA från labradoren skickades till Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort i Frankrike där CNM påvisades. Labradoren avlivades tre månader senare efter progression av symptomen (Hospital for Mindre Husdyr Köpenhamn 2007).

1.2 Problemformulering

Hur stor är allelfrekvensen av anlaget för centronukleär myopati hos danska avelslabradorer med valpkullar födda år 2005?

1.3 Avgränsning

Vid avgränsning av urval av labradorer till att delta i undersökningen valdes det att fokusera på avelslabradorer med valpkullar födda år 2005. För att avgränsa den teoretiska delen av rapporten om differentialdiagnoser till CNM, valdes det att fokusera på endast två andra former av myopati hos labradorer.

1.4 Metodavsnitt

Undersökningen utformades som en observationell tvärsnittsstudie. Både Dansk Kennel Klub (DKK) och Dansk Jagthunde Registrering (DJR) kontaktades med en inbjudan om att delta i undersökningen. DKK tackade ja till att delta medan DJR avböjde. Det sändes en förfrågan om deltagande och material till uttagande av DNA till 100 ägare av avelslabradorer med valpkullar födda och registrerade i DKK år 2005. Utav de 100 labradorerna var 50 hanar och 50 var tikar. Ägarna uppsamlade själva DNA från sina labradorers kindslemhinnor och

överförde det till FTA-kort (Bilaga 1) som sändes till Institut for Basal Husdyr og Veterinærvidenskab, Det Biovidenskabelige Fakultet, Københavns Universitet. I september 2008 hade 44 FTA-kort returnerats. Ett mutationstest genomfördes där DNA extraherades från FTA-korten och amplifierades med hjälp av polymerase chain reaction (PCR). Efter gelelektrofores kunde det avläsas om labradorerna var homozygot normala, heterozygoter eller homozygot afficerade.

2. Centronukleär myopati

2.1 Kliniska symptom

De kliniska symptomen på CNM beskrevs första gången i USA av Kramer *et al.* år 1976 då fem labradorer vid skilda tillfällen remitterades till Washington State University's Veterinary Hospital med en anamnes om onormal gång. De kliniska symptomen, som först sågs vid tre till fem månaders ålder, karakteriserades av oförmåga att hålla huvudet upplyft, muskelsvaghet efter motion, bunny jump och korta tillgjorda steg. Stress i form av motion, kyla eller upphetsning förvärrade symptomen. Vid de tillfällen då frambenen kollapsade fortsatte labradorerna att glida framåt med hjälp av bakbenen. Efter fem minuters vila minskade symptomen men återvände snabbt vid återupptagande av motion. Vid neurologisk undersökning av bl.a. kranial nervfunktion, ögon och spinala och posturala reflexer upptäcktes inget onormalt. Labradorerna var hämmade i växten och hade tydligt mindre muskelmassa jämfört med friska individer i samma ålder och av samma ras. När de afficerade labradorerna blev äldre stabiliserades symptomen (Kramer *et al.* 1976).

I ett annat rapporterat fall kollapsade en labradors bakben vid ansträngning och den fortsatte därefter dra sig framåt med hjälp av frambenen. Det observerades inga tecken på smärta och efter kort vila kunde den gå igen trots svaga bakben (Gortel *et al.* 1996).

CNM har beskrivits vid ett flertal tillfällen i olika länder (Kramer *et al.* 1981; Mckerrell & Braund 1986; Mckerrell & Braund 1987; Moore *et al.* 1987; Watson *et al.* 1988; Sharp *et al.* 1989; Gortel *et al.* 1996; Bley *et al.* 2002). I Storbritannien var sjukdomen år 1989 främst utspridd bland jaktlabradorer samtidigt som den i USA sågs i hela labradorpopulationen (Sharp *et al.* 1989). CNM afficerar båda könen (Bley *et al.* 2002).

McKerrell och Braund beskrev år 1987 fyra oberoende fall av CNM som visade variationer i grad av svårighet av kliniska symptom, i omfattning av muskelatrofi och i progression och utfall av CNM. En av labradorerna skilde sig markant på två punkter från de andra fallen. Det var det första bekräftade fallet av CNM som utvecklade megaesophagus i samband med sjukdomen. Dessutom sågs ingen muskelatrofi, även om muskeltonus var reducerad i både fram- och bakben. En annan av labradorerna utvecklade symptom först vid fem månaders ålder medan de andra skilde sig från sina kullsyskon redan vid några veckors ålder. Gemensamt för alla fyra labradorerna var bl.a. att patella- och tricepsreflexerna var nedsatta eller frånvarande (McKerrell & Braund 1987).

I en studie på Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort i Frankrike utfördes år 2003 en experimentell parning mellan labradorer för att följa utvecklingen av CNM från födseln. Det sågs ingen skillnad mellan de afficerade valparna och deras friska kullsyskon vid födseln. Från två veckors ålder observerades en progressiv viktninskning hos de afficerade valparna. Vid en månads ålder noterades avsaknad av senreflexer, vilket användes som ett tidigt diagnostiskt symptom. Vid två till fem månaders ålder observerades klumpig gång, minskad motionstolerans och generell muskelsvaghet. Neurologisk undersökning av labradorerna visade vid samma ålder inget onormalt förutom fortsatt avsaknad av senreflexer. De kliniska symptomen stabiliserades vid ett års ålder. Atrofi av temporal-, cervikal- och benmuskulatur ledde till ventroflexion av nacken och onormal hållning och rörelse. Detta var det mest kännetecknande för sjukdomen i vuxen ålder. Figur 1 visar en normal och en afficerad labrador (Tiret *et al.* 2003).



Figur 1. En 34 månader gammal normal labrador (A) och en afficerad labrador i samma ålder (B). A. Den normala labradoren är muskulös. Huvudet är upplyft och benen är parallella. B. Den afficerade labradoren har minskad muskelmassa, ventroflexion av nacken och står med benen in under kroppen (Tiret *et al.* 2003).

2.2 Parakliniska undersökningar

Kreatinkinas har vid blodprovsanalys visat sig vara låg (Kramer *et al.* 1976), normal (Bley *et al.* 2002; Tired *et al.* 2003) eller förhöjd (Mckerrell & Braund 1987; Watson *et al.* 1988; Gortel *et al.* 1996) hos labradorer afficerade av CNM. Vid injektion av edrofonium klorid till labradorer med CNM har ingen förändring (Watson *et al.* 1988), en tillfällig förvärrning av symptom (Kramer *et al.* 1976) eller fördröjd återhämtning efter ansträngning observerats (Gortel *et al.* 1996). Röntgenundersökning har visat normala höftleder och normal ryggrad (Kramer *et al.* 1976).

Elektromyografi kan användas vid misstanke om myopati för att bekräfta diagnosen (Couto & Nelson 2003). Många fall har rapporterats där labradorer med CNM som undersökts med elektromyografi i bl.a. bakbensmuskulatur har visat fibrillationspotentialer och positiva skarpa vågor (Mckerrell & Braund 1987; Moore *et al.* 1987; Watson *et al.* 1988; Bley *et al.* 2002). Dessutom har det observerats bisarra högfrekventa urladdningar (Mckerrell & Braund 1987; Moore *et al.* 1987).

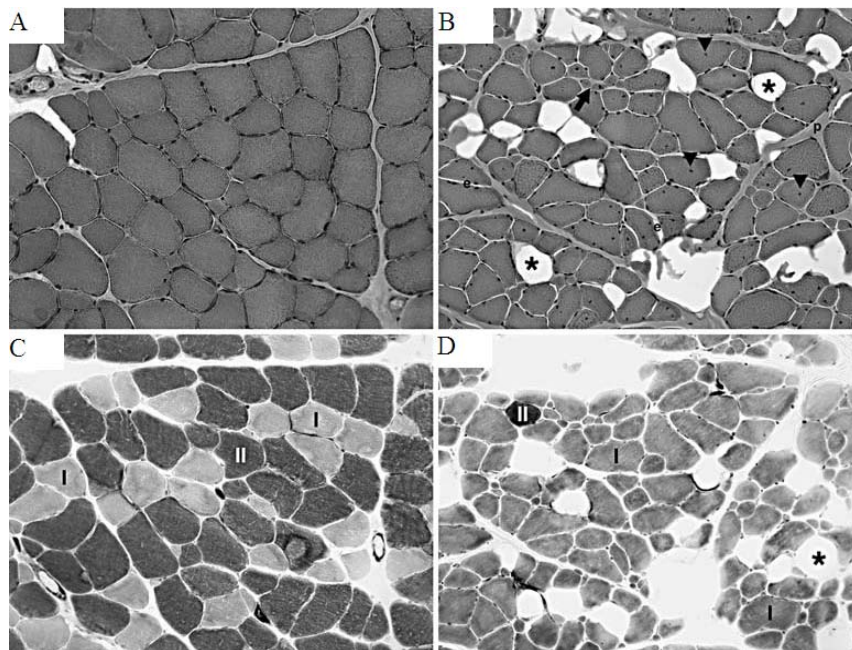
För att utesluta en neurologisk bakgrund till de kliniska symptomen kan motorisk nervledning mätas (Couto & Nelson 2003). Mätningar hos labradorer med CNM har visat normal nervledningshastighet (Kramer *et al.* 1976; Moore *et al.* 1987; Watson *et al.* 1988; Bley *et al.* 2002).

2.3 Histopatologiska fynd

De första beskrivna histopatologiska undersökningarna av ben- och ryggmuskulatur från labradorer afficerade av CNM, visade dominering av muskelfibrer typ I och brist på typ II (för muskelfysiologi, Bilaga 2). Det sågs även variation i muskelfibrernas diameter och en tydlig ökning av endomysial och perimysial bindväv (Kramer *et al.* 1976). Därefter har fler histopatologiska fynd beskrivits i litteraturen (Mckerrell & Braund 1986; Amann *et al.* 1988; Gortel *et al.* 1996; Bley *et al.* 2002; Tired *et al.* 2003).

I en morfologisk studie utförd år 1986 togs biopsier från frambens-, bakbens-, rygg-, tugg- och laryngealmuskulatur från tolv afficerade labradorer. Biopsierna visade variation i grad av atrofi och hypertrofi av både muskelfibrer typ I och typ II. Graden av atrofi av muskelfibrerna varierade från ett fåtal små kantiga fibrer utspridda bland fibrer av normal storlek, till muskelfascikler där majoriteten av fibrerna var små och runda med endast en eller två fibrer

av normal storlek. Genomsnittsdiametern av de minsta muskelfibrerna var cirka 3-5 μm och av de största muskelfibrerna cirka 150 μm . I 74 % av biopsierna sågs en centralt placerad kärna i muskelfibrer av både typ I och II. Andelen centralt placerade kärnor kunde variera från 1,1 % till 23,9 % i en och samma muskel. I 90 % av biopsierna sågs arkitektoniska förändringar som t.ex. spiralbildning av muskelfibrer. Nekros av muskelfibrer sågs i 82 % av biopsierna. Graden av nekros varierade och involverade muskelfibrer av både typ I och typ II. Infiltration av inflammatoriska celler sågs endast i några få muskelbiopsier. I 80 % av biopsierna observerades en ökning av perimysial och/eller endomysial bindväv. Generellt ökade graden av muskelförändringar långsamt med stigande ålder. Det sågs inget onormalt i intramuskulära nerver. Hälften av biopsierna från tio utav de tolv afficerade labradorerna visade en statistisk signifikant minskning av muskelfibrer typ II. Brist på muskelfibrer typ II sågs endast i muskler som hos normala labradorer domineras av typ II eller har en lika fördelning av typ I och typ II (Mckerrell & Braund 1986). Figur 2 visar histologiska snitt från en homozygot normal och en homozygot afficerad labrador (Tiret *et al.* 2003).



Figur 2. Transversala snitt från en biopsi från biceps femoris hos en 34 månader gammal homozygot normal labrador (**A, C**) och en homozygot afficerad labrador i samma ålder (**B, D**). Snitten är färgade med hematoxylin och eosin (**A, B**) eller för myosin ATPas aktivitet vid pH 9,4 (**C, D**). **A, C.** I normala muskler är formen och storleken av muskelfibrerna regelbundna. Muskelfibrer typ I (*I*) och typ II (*II*) är jämnt fördelade, med kärnor som ligger i periferin av muskelfibrerna. **B, D.** I afficerade muskler inkluderar förändringarna hypertrofiska och atrofiska, eller små runda fibrer (*pil*). Mängden endomysial (*e*) och perimysial (*p*) bindväv är förökad och flera fibrer är ersatta med fett (*asterisk*). Rikligt med centralt placerade kärnor kan ses i myofibrerna (*pilhuvud*) (Tiret *et al.* 2003).

En annan studie visade att ration mellan typ I och typ II muskelfibrer i bakbensmuskulatur hos afficerade labradorer progressivt ökade till 90:10. Normalt är förhållandet 40:60 i samma typ av muskulatur (Tiret *et al.* 2003). Det har observerats att muskelfibrer har ersatts med fett hos afficerade labradorer (Bley *et al.* 2002).

2.4 Namngivning av sjukdomen

Namnet centronukleär myopati grundar sig på den karakteristiska histologiska bilden med centralisering av kärnan i muskelfibrerna (Tiret *et al.* 2003; Pele *et al.* 2005). Tidigare har sjukdomen kallats Labrador Retriever Myopathy (LRM) (Watson *et al.* 1988; Sharp *et al.* 1989; Gortel *et al.* 1996; Bley *et al.* 2002), Hereditary Myopathy in Labrador Retrievers (HMLR) (Mckerrell & Braund 1986; Mckerrell & Braund 1987; Amann *et al.* 1988) och Type II Muscle Fiber Deficiency (MFD) (Kramer *et al.* 1976; Moore *et al.* 1987).

2.5 Diagnostik

Den säkraste och minst invasiva metod till att diagnostisera CNM är att genomföra ett mutationstest med DNA antingen från kindsrap eller från blod (CNM Project - ENV Alfort 2008b). Mutationstestet kan utföras på olika laboratorier i världen (Laboklin 2008; VetGen 2008; CNM Project - ENV Alfort 2008b). Tidigare har CNM enbart kunnat diagnostiseras med hjälp av kliniska symptom, elektromyografi och histopatologiska undersökningar av muskelbiopsier (Kramer *et al.* 1976; Kramer *et al.* 1981; Mckerrell & Braund 1987; Watson *et al.* 1988; Gortel *et al.* 1996; Bley *et al.* 2002). Hematologiska och biokemiska analyser är till ringa hjälp när CNM ska diagnostiseras (Gortel *et al.* 1996) eftersom aktiviteten av kreatinkinas kan variera (Kramer *et al.* 1976; Mckerrell & Braund 1987; Watson *et al.* 1988; Gortel *et al.* 1996; Bley *et al.* 2002; Tiret *et al.* 2003).

Det är viktigt att notera att symptomen kan vara otydliga i milda fall. Avsaknad eller minskning av triceps- och patellareflexer är ett gemensamt tillstånd för labradorer afficerade av CNM, och är en av de mest värdefulla kliniska indikatorerna i milda fall. Den varierande åldern när sjukdomen debuterar kan också vara ett problem vid diagnostisering (Mckerrell & Braund 1987).

2.6 Behandling och prognos

Det finns inga mediciner som kan hindra eller reversera processen som sker hos labradorer med CNM, eller som kan göra att de saknade muskelfibrerna repareras, återfår styrka eller ersätts. CNM är därför en livslång sjukdom. Ägare vars labrador diagnostiserats med CNM måste överväga om det finns tid och möjlighet att tillgodose dens extra behov (CNM Project - ENV Alfort 2008a). Överexaltering eller stress kan resultera i övergående förvärrning av symptom. Omhändertagande av afficerade labradorer bör därför inriktas på att reducera alla former av stress, och särskilt den stress som kyla och infektioner medför (Mckerrell & Braund 1987).

Labradorer med CNM kan ha svårighet att svälja om musklerna i esophagus afficeras. Därför bör ett foder av hög kvalitet rekommenderas för att maximera näringsintaget. Mat- och vattenskål bör placeras en bit ovanför golvet för att underlätta foderintaget och minska risken för aspirationspneumoni (CNM Project - ENV Alfort 2008a).

Tillståndet som CNM medför kan vara förvirrande för labradoren eftersom den fortfarande har sina rastypiska instinkter och egenskaper kvar. Aktivitetsnivån måste anpassas efter den enskilda labradorens tillstånd (CNM Project - ENV Alfort 2008a). Det finns inga bevis för att livslängden skulle vara förkortad (Mckerrell & Braund 1987), men många ägare väljer avlivning (CNM Project - ENV Alfort 2008a).

2.7 Differential diagnoser

Som differentialdiagnoser till CNM har bl.a. nämnts inflammatoriska muskelsjukdomar som *Toxoplasma gondii* (Sharp *et al.* 1989; Bergman *et al.* 2002) och *Neospora caninum* (Bergman *et al.* 2002) och icke-inflammatoriska muskelsjukdomar som myasthenia gravis (Sharp *et al.* 1989; Gortel *et al.* 1996), nemalin myopati (Bergman *et al.* 2002) och glykogenos (Sharp *et al.* 1989).

Utöver dessa differentialdiagnoser har två myopatier liknande CNM beskrivits hos två olika labradorer (Bergman *et al.* 2002; Cosford *et al.* 2008). En tre och en halv månad gammal hanhund presenterades år 2002 på en klinik i USA med dysfagi, generell svaghet, motionsintolerans, stertor och inspiratorisk stridor. Vid klinisk undersökning konstaterades dåligt hull, generell muskelatrofi, nedsatt sväljningsreflex, hypertrofisk hals- och nackmuskulatur och en förstorad orörlig tunga. De spinala reflexerna konstaterades vara

normala, kreatinkinas var kraftigt förhöjd och *Toxoplasma gondii* och *Neospora caninum* testades negativa. Vid elektromyografi av muskulatur från framben, bakben, rygg, huvud och tunga sågs positiva skarpa vågor. Det registrerades normal motorisk nervledning. En muskelbiopsi från bakbenet visade histopatologiska förändringar såsom varierande muskelfiberstorlek, endomysial fibros, nekros, fagocytos, regenerativa muskelfibrer och kalkutfällningar. Immunohistokemisk färgning visade avsaknad av dystrofin och relaterade proteiner (Bergman *et al.* 2002). Dystrofin är ett 400 kilodalton stort protein (Hoffman *et al.* 1987) som ger mekanisk styrka till sarkolemmat genom att förankra det till det interna cytoskelettet (Zubrzyckagaarn *et al.* 1988). Den kodanden genen för dystrofin är lokaliserad på den korta armen av X-kromosomen (Murray *et al.* 1982) och är på grund av sin stora storlek ofta utsatt för mutationer (Koenig *et al.* 1987).

Labradoren som presenterades på klinken i USA var vid sju månaders ålder utmärkt och visade progression av de sedan tidigare konstaterade kliniska symptomen. Dessutom sågs nedsatta spinala reflexer och ägaren valde att få labradoren avlivad. De kliniska, biokemiska, histopatologiska, immunohistokemiska och elektrofysiologiska förändringarna var förenliga med hundars X-bundna muskeldystrofi (Bergman *et al.* 2002), som karakteriseras av avsaknad av dystrofin (Cooper *et al.* 1988). Det var omöjligt att avgöra om X-bunden muskeldystrofi hos denna labrador var en ärftlig muskeldystrofi eller endast en spontan mutation då varken en studie över labradorens genealogiska diagram eller ett mutationstest genomfördes (Bergman *et al.* 2002).

År 2008 remitterades en fem månader gammal labradorhane till en klinik i Canada med anamnes om svaghet, letargi, inappetens och muskelatrofi av tre veckors varighet. Enligt ägaren var symptomen nytillkomna. Labradoren uppvisade vid klinisk undersökning svår generell muskelatrofi, hull under medel, ventroflexion av nacken, kyfos och en stående position med båda bakbenen införda under kroppen. Gången var kort och ojämn och labradoren kollapsade efter ett fåtal steg. Patellareflexerna var frånvarande och övriga spinala reflexer bedömdes vara nedsatta. Kreatinkinas var lätt förhöjd och myasthenia gravis, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* och CNM testades negativa. Efter en vecka hade labradorens symptom förvärrats och den kunde varken stå eller lyfta sitt huvud. Ägaren valde därför att få den avlivad. Histologisk undersökning postmortem av hjärna, ryggmärg och perifera nerver visade inget onormalt. Muskelbiopsier från bakben, framben, huvud och larynx visade histopatologiska förändringar i form av variation i muskelfibrernas storlek och

atrofi av muskelfibrer med centralt täta områden som utgjorde 10-50 % av tvärsnittsdiametern av afficerade fibrer. Elektronmikroskopisk undersökning visade att de centralt täta områdena i muskelfibrerna bestod av ackumulering av mitokondrier, glykogengranuler och splittrade myofibriller. Med hjälp av immunohistokemisk färgning av dystrofin uteslöts X-bunden muskeldystrofi. De histopatologiska fynden med centralt täta områden i muskelfibrerna var identiska med rapporterade fall av ärftlig myopati hos grand danois. Fyra utav labradorens kullsyskon, alla hanhundar, hade utvecklat liknande kliniska symptom mellan tolv och sexton veckors ålder och avlivats utan ytterligare utredning. Dessutom hade tiken tidigare fått två kullar med en annan labradorhane där några av hanvalparna utvecklat liknande kliniska symptom. Med detta i betraktning förmodades arvs gången vara X-bunden recessiv (Cosford *et al.* 2008).

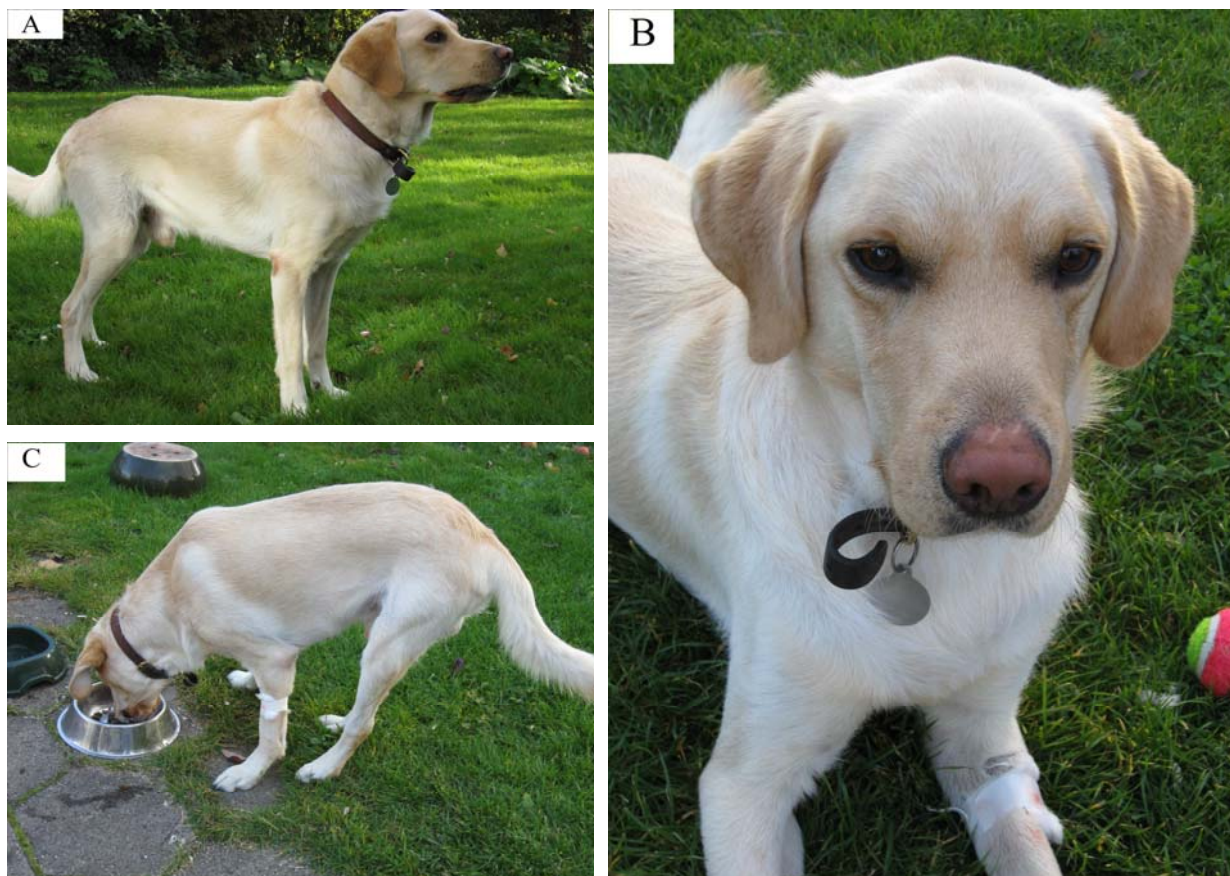
2.8 CNM i en dansk labradorkull

En labradorkull bestående av fyra hanhundar och fem tikar föddes i augusti år 2005 och registrerades i DKK samma år (Dansk Kennel Klub 2008). En av tikarna remitterades vid sex månaders ålder till Hospital for Mindre Husdyr i Köpenhamn. Efter utredning konstaterades det med hjälp av ett mutationstest att labradortiken led av CNM och den avlivades på grund av svåra symptom (Hospital for Mindre Husdyr Köpenhamn 2007). En hanhund från samma kull remitterades vid ett års ålder till Hospital for Mindre Husdyr i Köpenhamn. Efter utredning misstänktes CNM och ett mutationstest rekommenderades. Därefter fanns inga fler besök registrerade i labradorens journal (Hospital for Mindre Husdyr Köpenhamn 2008).

En ägare till en tre år gammal labradorhane som diagnostiserats med CNM fick kännedom om föreliggande undersökningen och kontaktade författarna. Det visade sig att denna hanhund härstammade från samma kull som de två ovannämnda labradorerna (Dansk Kennel Klub 2008). Ägaren berättade att valpen varit liten och tanig ända sedan hemkomsten vid åtta veckors ålder. Valpen haltade något periodvis och ägaren tog därför den till en veterinär som menade att haltheten berodde på växtvärk. När labradoren var ett och ett halvt år gammal började ägaren gå lydnadskurs med den och redan vid första kurstillfället började den halta efter 30 minuters promenad. Haltheten fortgick och ägaren tog återigen labradoren till en veterinär där den fick icke-steroid antiinflammatorisk behandling. Trots behandling fortsatte haltheten och rygg- och höftledsröntgen företogs. Röntgenbilderna visade B-, möjligtvis C-status av höftlederna, på en skala från A till E. Eftersom labradoren var mycket tunn och hade

intermitterande diarré undersöktes även pankreas, men inget onormalt hittades. Ägaren provade diverse metoder som t.ex. Bowenteknik och olika foder, men problemen kvarstod. Under en pensionatvistelse förvärrades problemen och därefter kunde labradoren knappt gå och var kraftigt avmagrad. Ägaren blev rekommenderad en annan veterinär som genast misstänkte CNM och ett mutationstest bekräftade misstanken (Jensen M. 2008).

I oktober 2008 besökte författarna den då treåriga afficierade labradoren, som vid besökstillfället var pigg och intresserad av sin omgivning. Det sågs tydlig atrofi av bakbens- och temporalmuskulatur (Fig. 3A, B) och bilateral avsaknad av patellareflexer noterades. Under besöket observerades bunny jump och mild ataxi vid lek i trädgården. Efter cirka en halvtimme lade sig labradoren ner för att vila korta stunder från leken. När en måltid serverades åt den försiktigt och stod med kyfos och båda bakbenen införda under kroppen (Fig. 3C). Labradoren visade ovilja och svårighet att gå i trappor. Enligt ägaren hade den blivit osäker i mötet med andra hundar den senaste tiden (Jensen M. 2008). Denna labrador är ett exempel på en mildt afficierad individ där ägaren anpassar hundlivet efter dens behov.



Figur 3. En treårig labrador afficierad av CNM. **A.** Det ses atrofi av bakbensmuskulaturen. **B.** Det ses atrofi av temporalmuskulaturen. **C.** Labradoren står med kyfos och båda bakbenen införda under kroppen.

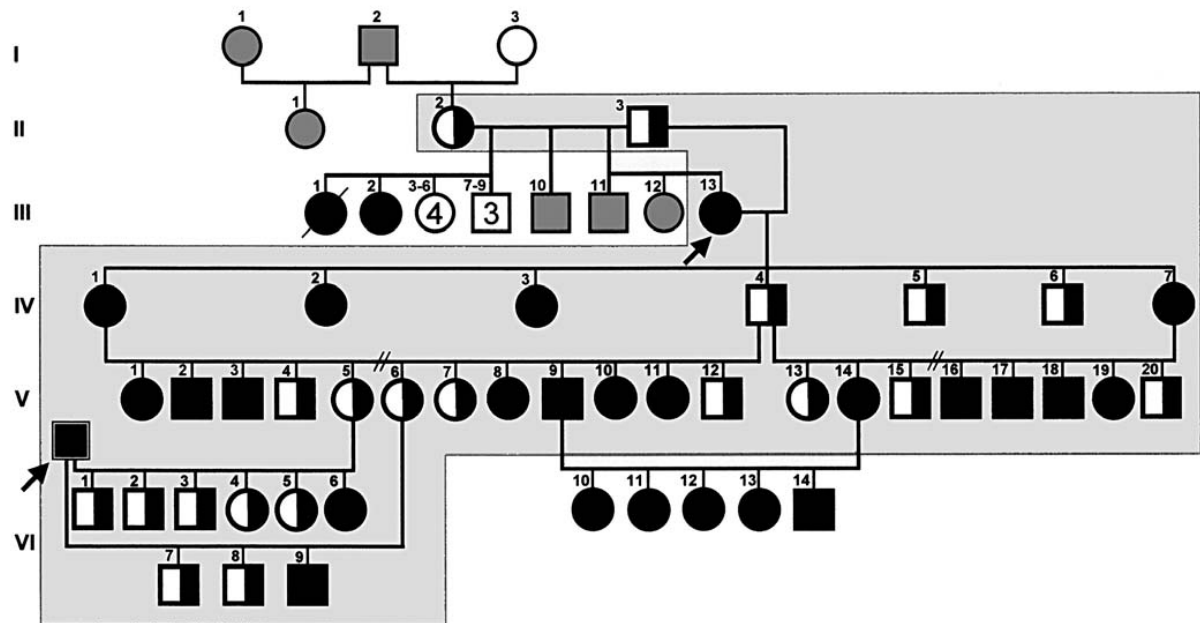
2.9 En lista över labradorer testade för CNM

Dansk Retriever Klub (DRK) har upprättat en lista på sin hemsida över labradorer testade för CNM och i december 2008 var 16 stycken testade. Två utav dem var registrerade som friska bärare och två var registrerade som afficierade (Dansk Retriever Klub 2008a). Styrelsen i DRK har beslutat att på detta sätt följa sjukdomen CNM hos labradorer i Danmark (Dansk Retriever Klub 2008b). De afficierade labradorerna tillhör valpkullen som står omnämnd i kapitel 2.8, och de friska bärarna är deras föräldrar.

3. Identifiering av orsaken till CNM

3.1 Segregation av CNM i ett genealogiskt diagram

Det uppställdes en hypotes om att CNM kunde tillskrivas en mutation på ett enstaka lokus, som kallades *cnm*. För att följa segregationen av CNM utfördes testparningar mellan labradorer med utgångspunkt i en afficierad labrador, proband III.13 (Fig. 4). Föräldrarna (II.2 och II.3) till probandet bedömdes vid en klinisk undersökning vara friska. Detta tydde på en autosomal recessiv nedärvning, även om en dominant nedärvning med variabel penetrans inte kunde uteslutas. För att bekräfta typen av nedärvning parades probandet med sin far (II.3). Därefter parades en frisk avkomma (IV.4) som antogs vara heterozygot, med två afficierade systrar (IV.1 och IV.7) som antogs vara homozygoter. En till probandet avlägset besläktad afficierad labradorhane parades med två friska tikar (V.5 och V.6). Ur det resulterande genealogiska diagrammet valdes fyra generationer omfattande 40 labradorer ut. Hälften av dessa var afficierade (12 tikar och 8 hanhundar). Varje labrador evaluerades under den första levnads månaden och en för liten viktökning och avsaknad av senreflexer gav misstanke om CNM. Vid tre till fem månaders ålder fastställdes diagnosen med hjälp av tecken på muskelsvaghet och histologiska snitt från muskler. Två afficierade labradorer (V.9 och V.14) parades och alla deras valpar (VI.10-VI.14) utvecklade kliniska symptom, vilket tydde på fullständig penetrans (Tiret *et al.* 2003).



Figur 4. Figuren visar ett genealogiskt diagram där varje individ identifieras med hjälp av en romersk siffra som anger generationen och en arabisk siffra som anger positionen i generationen. Parningarna tog utgångspunkt i tiken III.13 och hennes far II.3. De resulterande labradorerna inkluderas i den gråa markeringen. Sneda dubbellinjer skiljer kullar åt. Svarta symboler representerar diagnostiserade afficerade labradorer. Svartvita symboler representerar diagnostiserade icke afficerade labradorer som bekräftats vara heterozygoter med hjälp av genotypning. Gråa symboler representerar diagnostiserade icke afficerade labradorer som inte kunnat genotypas. Vita symboler representerar labradorer som inte genomgått klinisk undersökning. Pilar indikerar det afficerade probandet och en avlögset besläktad labradorhane (Tiret *et al.* 2003).

3.2 Kartläggning av sjukdomslokuset

En genomskanning genomfördes med 66 sedan tidigare kartlagda mikrosatelliter som täckte 78 % av hundens genom (Mellersh *et al.* 1997). Probandet (III.13) och hennes friska far (II.3) genotypades och av de 66 mikrosatelliterna var 15 heterozygota för fadern och homozygota för probandet. DNA från 13 friska och 18 afficerade labradorer genotypades för de 15 markörerna, och resultaten jämfördes. Markörer som endast sågs hos de afficerade labradorerna utsågs till kandidater för koppling till sjukdomens lokus. Alla 40 labradorer ur det genealogiska diagrammet genotypades och en kopplingsanalys genomfördes (Tiret *et al.* 2003). En koppling upptäcktes mellan *cnm* och en mikrosatellit på hundens kromosom 2 (CFA2), FH2087U (LOD score = 7,97; $\theta = 0,03$, (Bilaga 3)) (Werner *et al.* 1999). Labradorerna genotypades därefter med alla markörer som var kartlagda på en radiation hybrid map och en meiotic map runt centromeren på CFA2 (Mellersh *et al.* 2000; Breen *et al.* 2001). En tvåpunkts kopplingsanalys genomfördes och maximalt LOD score (9,93) visade sig

tillhöra markören CPH7 ($\theta = 0,00$), som segregerade med *cnm*. Markörerna FH3006 och AHT132 visade sig vara kopplade till *cnm* med LOD score = 6,63; $\theta = 0,06$ respektive LOD score = 5,54; $\theta = 0,07$. Därefter genomfördes en multipunkt kopplingsanalys som gav det högsta LOD score värdet (7,31) mellan markörerna FH2087U och CPH7 med ett 2,0 LOD unit support intervall på 19,2 cM. Med hjälp av haplotyp analys upptäcktes rekombination mellan *cnm*/CPH7 och antingen FH2087U eller AHT132. Resultatet blev att *cnm* kunde kartläggas till ett intervall på 18,1 cM på CFA2 mellan markörerna FH2087U och AHT132 (Tiret *et al.* 2003).

3.3 Identifiering av den humana homologa regionen

Det var känt sedan tidigare studier att en markör kallad *VIM* kunde tillskrivas samma kopplingsgrupp som FH2087U (Werner *et al.* 1999). *VIM* är hos människor lokaliserad till den korta armen av den humana kromosom 10 (HSA10p13) (McKusick *et al.* 2004). Detta stärkte ortologin mellan den centromera regionen av CFA2 och HSA10p13 (Tiret *et al.* 2003). Regionen på HSA10p vidgades med reciprok kromosomfärgning mellan hundens och människans karyotyp (Breen *et al.* 1999; Yang *et al.* 1999). Med hjälp av fluorescence *in situ* hybridization (FISH) lokaliserades utvalda markörer från HSA10p till CFA2 (Tiret *et al.* 2003).

3.4 Identifiering av kandidatgenen

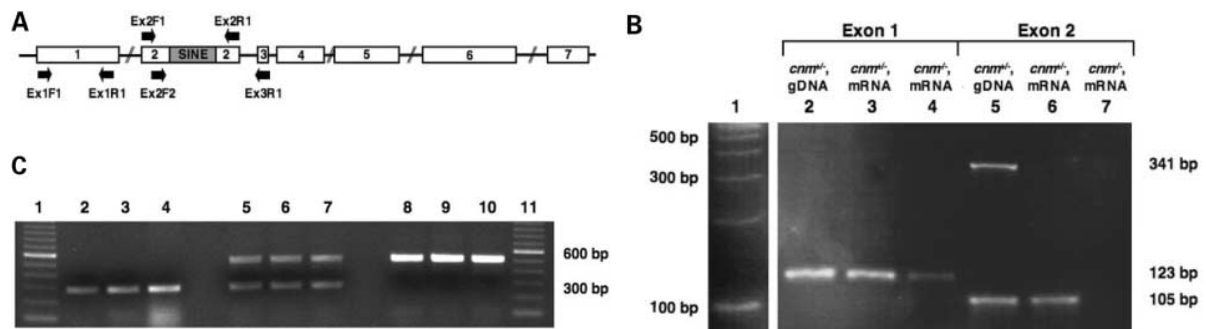
NCBI Map Viewer användes för att identifiera 208 gener inom *cnm* regionen på HSA10p. Det fokuserades på gener som uttrycktes i skelettmuskulatur i samma tidsrum som afficerade labradorer visade symptom (Pele *et al.* 2005). En av dessa gener, protein tyrosine phosphatase-like member A (*PTPLA*), uttrycktes på låg nivå i vuxen human skelettmuskulatur (Li *et al.* 2000). Hos möss uttrycktes *PTPLA* genom hela myogenesen och på hög nivå i vuxen skelettmuskulatur (Uwanogho *et al.* 1999).

3.5 Identifiering av mutationen

Hundens *PTPLA* sträcker sig över mer än 20 kilo baspar (kb) och innehåller sju exoner som kan transkriberas till två isoformer. Dessa isoformer skiljer sig åt genom att antingen bevara exon 5 (*PTPLA^{fl}*, full length) eller exkludera exon 5 (*PTPLA^{d5}*, deleted exon 5). Deletion av exon 5 resulterar i störningar i translationen.

För att ta reda på vilken specifik polymorfism som skulle kunna segregera med CNM i ett genealogiskt diagram, uttogs genomiskt DNA från labradorer som var homozygot normala ($cnm^{+/+}$), heterozygoter ($cnm^{+/-}$) och homozygot afficerade ($cnm^{-/-}$). Detta bröts ned och hybridiserades med en probe omfattande det mesta av *PTPLA* cDNA. En *Bam* HI restriktion fragment length polymorphism (RFLP) upptäcktes i alla DNA-prover från heterozygoter och homozygot afficerade, men upptäcktes inte hos någon homozygot normal labrador. Det konstaterades att detta *Bam* HI RFLP segregerade med CNM.

De sju exonerna inom *PTPLA* från genomiskt DNA och muskulärt mRNA amplifierades individuellt med PCR och RT-PCR. Till detta användes DNA och mRNA från en heterozygot och en homozygot afficerad labrador. Resultatet från exon 1 och 2 ses i Figur 5. PCR och RT-PCR-amplifiering av exon 1 med Ex1F1 och Ex1R1 primers (Fig. 5A) gav ett fragment på 123 baspar (bp) (Fig. 5B). Den enda skillnaden som sågs efter amplifieringen av exon 1 var en svagare signal när mRNA från den homozygot afficerade labradoren användes som template jämfört med mRNA från heterozygoten. PCR-amplifiering av exon 2 med Ex2F1 och Ex2R1 primers (Fig. 5A) gav två fragment, ett på 105 bp och ett på 341 bp (Fig. 5B). Fragmentet på 105 bp motsvarade den förväntade storleken på exon 2. Efter amplifiering av exon 2 från muskulärt mRNA från heterozygoten sågs ett fragment på 105 bp. Detta fragment sågs däremot inte när mRNA från den homozygot afficerade labradoren användes som template (Fig. 5B).



Figur 5. Mutationsanalys av *PTPLA*. **A.** Lokalisering av PCR primers. **B.** Brunn 1: storleksmarkör. PCR av genomiskt DNA från en heterozygot (brunn 2, 5) och RT-PCR av muskulärt mRNA från en heterozygot (brunn 3, 6) och från en homozygot afficerad labrador (brunn 4, 7) av exon 1 (brunn 2-4) och exon 2 (brunn 5-7). **C.** PCR-amplifiering av genomiskt DNA från homozygot normala labradorer (brunn 2-4), heterozygoter (brunn 5-7) och homozygot afficerade labradorer (brunn 8-10) av exon 2 och intron 2. Brunn 1, 11: storleksmarkörer (Pele *et al.* 2005).

För att ytterligare karakterisera fragmentet på 341 bp utfördes PCR-amplifiering av exon 2 och intron 2 med Ex2F2 och Ex3R1 primers. Genomiskt DNA från alla tre kombinationer av alleler (*cnm*^{+/+}, *cnm*^{+/-} och *cnm*^{-/-}) användes. Homozygot normala labradorer gav ett fragment på 282 bp och homozygot afficerade labradorer gav ett fragment på 518 bp. Heterozygoter gav fragment på både 282 bp och 518 bp (Fig. 5C). Fragmentet på 518 bp sekventerades och det visade sig innehålla en tRNA-liknande short interspersed element (SINE) (Bilaga 3) på 236 bp (Fig. 6). SINE flankerades på båda sidor av en duplikation på 13 bp och varje duplikation innehöll en AGGT tetranukleotid. Inom SINE upptäcktes även en *Bam* HI restriktionssekvens (GGATCC) som förklarade varför RFLP sågs hos heterozygoter och homozygot afficerade labradorer. Hundar av andra raser, blandraser och labradorer utan symptom på CNM testades för förekomsten av SINE och alla visade sig vara negativa. Detta styrkte kopplingen mellan SINE och CNM. Härefter refereras *PTPLA* med insertion av SINE i exon 2 som *PTPLA*^{alf}.

```

GTGGTTGGTTCTAGCTATTGCCATGAGTACGTTTTTATATGGAAAAAGGAACACACAAAGGT
TTTTTTTTTTTTTTTTAAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
ATTATTTTATGATAGTCACACACAGATAGAGAGAGAGGCCAGAGACACAGG
CAGAGGGAGAAGCAGGCTCCATGCACCGGGAGCCCGACGTGGGACTCG
ATCCCGGTCTCCAGGATCGCGCCCTGGGCCAAAGGCAGGCGCCAAAC
CGCTGCGCCACCCAGGGATCCCCCACACAAAGGTTTATATAAAAGTATTTCAG
AAGACACATAAATTTTTCCAGACATTGCGCTTGCTTGAG

```

Figur 6. Sekvensen av SINE visas med stora svarta bokstäver. Sekvensen av *PTPLA* exon 2 visas med små grå bokstäver. Duplikationen på 13 bp är understruken. *Bam* HI restriktionssekvensen (GGATCC) är markerat med fetstil. Gråa överstrykningar indikerar sekvenserna (AGGT) som tillåter korrekt splicing av SINE. Cirklar markerar var splicing som leder till syntes av *v1* sker (Pele *et al.* 2005).

För att undersöka om insertionen av SINE inom *PTPLA* exon 2 orsakade transkriptionsdefekter amplifierades mRNA från skelettmuskulatur från alla tre kombinationer av alleler (*cnm*^{+/+}, *cnm*^{+/-} och *cnm*^{-/-}) med RT-PCR (Fig. 7A). Ex1F2 och Ex7F1 primers användes (Fig. 7B). Både *PTPLA*^{fl} och *PTPLA*^{d5} amplifierades från homozygot normala labradorer och heterozygoter. Däremot såg sju RT-PCR produkter från homozygot afficerade labradorer. Dessa sju produkter klonades och sekventerades för att fastställa var splicing skedde vid syntes av transkripterna. Två av de sju produkterna motsvarade *PTPLA*^{fl} och *PTPLA*^{d5} vilket indikerade att SINE splicades ut vid vissa tillfällen. Variant 1 (*v1*) av de resterande fem produkterna (*v1-v5*) saknade en del av exon 2 och dessutom en del av SINE och *v2-v5* saknade en eller flera exoner (Fig. 7B). Efter translation kunde proteinerna härledas från var och en av de sju transkripterna och det konkluderades att insertionen av SINE inom *PTPLA* ledde till felaktiga splicing-mekanismer. Orsaken till att det sågs *PTPLA*^{fl} och

PTPLA^{d5} även hos de homozygot afficerade labradorerna berodde på sekvensen AGGT som flankerade SINE. Detta kunde möjliggöra korrekt splicing vid vissa tillfällen eftersom GT vid 5'-donatorsekvensen för splicing och AG vid 3'-acceptorsekvensen för splicing gav SINE en ovanlig intronliknande status.

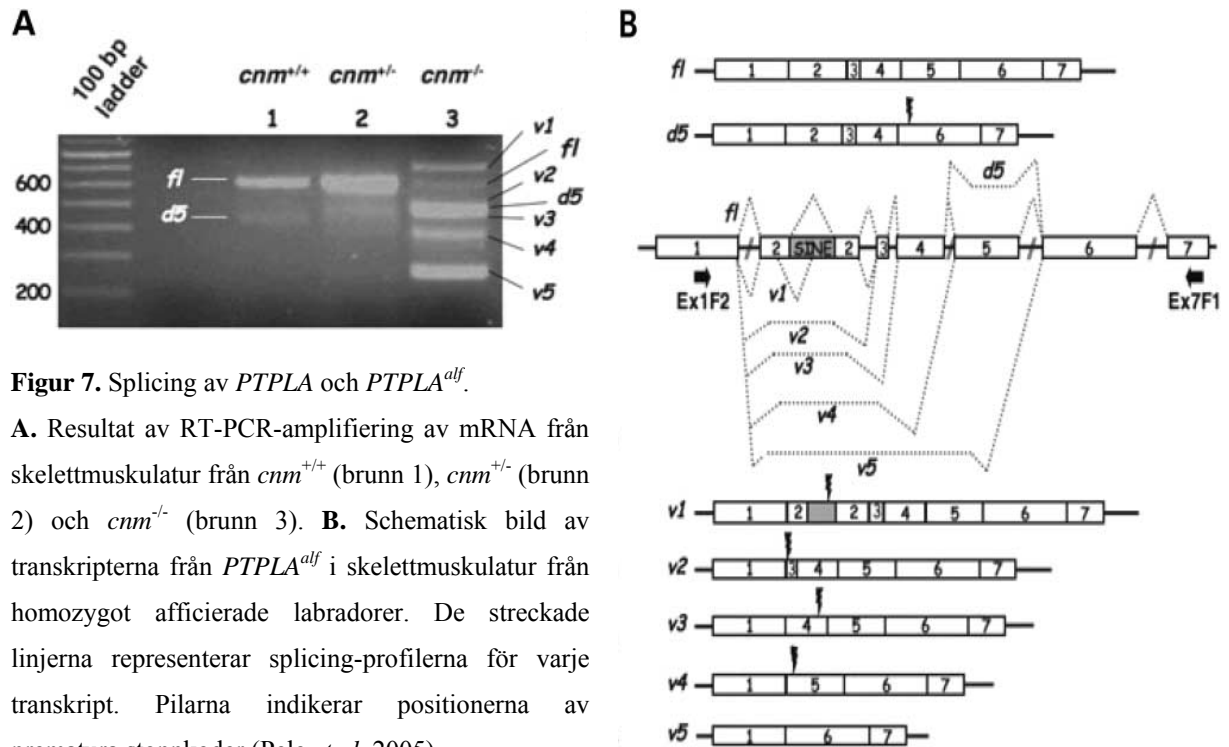


Figure 7. Splicing av *PTPLA* och *PTPLA^{alf}*.

A. Resultat av RT-PCR-amplifiering av mRNA från skelettmuskulatur från *cnm^{+/+}* (brunn 1), *cnm^{+/-}* (brunn 2) och *cnm^{-/-}* (brunn 3). **B.** Schematisk bild av transkripterna från *PTPLA^{alf}* i skelettmuskulatur från homozygot afficerade labradorer. De streckade linjerna representerar splicing-profilerna för varje transkript. Pilarna indikerar positionerna av prematura stoppkoder (Pele *et al.* 2005).

För att undersöka om SINE i sig själv var ansvarig för splicing-defekterna utfördes *ex vivo* analyser med hjälp av exon-trapping (Bilaga 3) experiment. Två *PTPLA* genomfragment (intron 1 till och med intron 4), ett med och ett utan SINE, klonades in i en pSPL3 exon-trapping vektor. Båda plasmiderna transfekterades in i COS-7 celler och de resulterande transkripterna genomgick RT-PCR och nested PCR (Bilaga 3) och analyserades. Plasmiden utan SINE gav produkter motsvarande en normalt splicad transkript (exon 2 till och med exon 4), medan plasmiden med SINE gav kortare produkter på grund av att exon 2 splicats ut. Det konkluderas med hjälp av detta tillvägagångssätt, att splicing-defekterna orsakade av *PTPLA^{alf}* *ex vivo* även skedde när genen transkriberades i muskelceller *in vivo* (Pele *et al.* 2005).

3.6 Kvantifiering av *PTPLA^{alf}*- och *PTPLA* transkripterna

Med hjälp av real-time RT-PCR (Bilaga 3) utfördes kvantitativa analyser för att bestämma både den totala mängden av *PTPLA^{alf}* transkripter och proportionen av normala transkripter

av *PTPLA*^{alf} i homozygot afficerade labradorers muskler i förhållande till heterozygoter. Resultatet visade att *PTPLA*^{alf} transkriberades till 35 % i förhållande till antalet totala transkripter av *PTPLA* i heterozygoters muskler. Normala transkripter hos de homozygot afficerade labradorerna utgjorde mindre än 1 % i förhållande till transkripter hos heterozygoter (Pele *et al.* 2005).

3.7 Orsaken till CNM

En homozygot insertion av en tRNA-liknande SINE inom *PTPLA* exon 2 observerades hos afficerade labradorer och visade sig segregera med CNM. Det konstaterades att SINE ligger bakom transkriptionella fel och att insertionen inom *PTPLA* hos afficerade labradorer verkar som en hypomorfisk mutation på grund av (I) att SINE kan splicas normalt, men endast i mindre än 1 % av tillfällena; (II) att delvis exonisation av SINE kan ske; (III) att exon-skipning involverar flera exoner och (IV) att den totala mängden *PTPLA*^{alf} transkripter är kraftigt reducerad (Pele *et al.* 2005).

4. Material och metoder

4.1 Undersökning av allelfrekvensen av anlaget för CNM

Undersökningen utformades som en observationell tvärsnittsstudie. Forskningen kring mutationen som orsakar CNM, offentliggjord i Pelé *et al.* 2005, användes som vägledning vid genomförandet av mutationstestet.

4.2 Val av labradorer till att ingå i undersökningen

Både Dansk Kennel Klub (DKK) och Dansk Jagthunde Registrering (DJR) kontaktades med en inbjudan om att delta i undersökningen. DKK tackade ja till att delta medan DJR avböjde. I april 2008 mottogs en lista från DKK över fäder till labradorer registrerade i DKK år 2005. Listan innefattade även fäder till labradorer födda andra år, och dessa sorterades därför bort så att den endast innehöll fäder till labradorer födda år 2005. En kull per far valdes ut slumpmässigt och därefter sorterades fäder registrerade i utlandet bort. I ett försök att minska släktskapet mellan utvalda individer valdes slumpmässigt en kull per far per kennelnamn ut. Fäder äldre än tio år sorterades bort och 60 fäder valdes ut med hjälp av lottdragning. Därefter togs det med hjälp av DKK's hunddatabas reda på namnet på mödrarna till de utvalda

kullarna och dessa inkluderades i undersökningen. De labradorer som avlidit sorterades bort och samtidigt togs respektive partner bort från undersökningen.

4.3 Insamling av DNA från de utvalda labradorerna

I maj 2008 sändes brev ut till ägare till 50 fäder och 50 mödrar med hjälp av ägaruppgifter från DKK's hunddatabas. Brevet innehöll ett informationsbrev med svarstalong (Bilaga 4), en vägledning till uppsamling av DNA (Bilaga 5), ett FTA-kort, två sterila provtagningspinnar och ett frankerat och adresserat svarskuvert. Ägarna uppmanades i vägledningen att med hjälp av en steril provtagningspinne ta ett DNA-prov från sin labradors kindslemhinna och överföra detta till ett FTA-kort. De ägare som önskade få ta del av sin labradors provresultat uppmanades att fylla i namn, adress och labradorens fullständiga namn och registreringsnummer på svarstalongen. Ägare som önskade certifikat på provresultatet skulle få sin labradors identitet verifierad av en veterinär vid provtagning.

I augusti 2008 sattes en beskrivning av föreliggande undersökning med en påminnelse till ägarna till de utvalda labradorerna in i DRK's medlemstidning Retrievern. I september samma år hade 44 utav 100 utsända FTA-kort returnerats till Institut for Basal Husdyr og Veterinærvidenskab, Det Biovidenskabelige Fakultet, Københavns Universitet.

4.4 Insamling av kontroll-DNA

För att säkerställa mutationstestets tillförlitlighet behövdes DNA från en homozygot normal, en heterozygot och en homozygot afficierad labrador. Med hjälp av en lista som bygger på enskilda svenska labradorägares inskickade resultat (Lindell 2008) och Svenska Kennelklubbens hunddata (Svenska kennelklubben 2008) lokaliserades och kontaktades en ägare till en heterozygot labrador. Anledningen till att en svensk ägare kontaktades var att det underlättade praktiskt. En dansk ägare till en homozygot afficierad labrador erbjöd självmant sin hjälp efter att ha fått kännedom om föreliggande undersökning. Utöver detta kontaktades en ägare till en labrador som antogs vara homozygot normal, vilket senare kunde bekräftas. Både blodprov och kindsrap togs från alla tre labradorer.

4.5 Utvinning av DNA från FTA-kort

Vid all hantering av FTA-korten användes engångshandskar för att undvika kontamination. En cirkel, 2,0 mm i diameter, utstansades från FTA-korten (Whatman) med en Uni-Core Punch (Harris) med en Cutting Mat (Harris) som underlag. FTA-kort från alla 44 labradorer

som deltog i undersökningen användes. Dessutom användes FTA-kort från en känd homozygot normal ($cnm^{+/+}$), en heterozygot ($cnm^{+/-}$) och en homozygot afficierad labrador ($cnm^{-/-}$) som referenser samt ett FTA-kort utan DNA som blindprov.

De utstansade bitarna placerades i vars ett PCR-amplifieringsrör i en PCR-platta och tvättades med TE^{-1} buffert (10mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8,0). Det tillsattes 200 μ l TE^{-1} buffert med pipett till vardera PCR-amplifieringsrör. Vätskan sögs upp och ner i PCR-amplifieringsrören med pipett tre gånger i ett försök att optimera utvinningen av DNA från FTA-korten. Pipettspetsen byttes mellan varje PCR-amplifieringsrör för att undvika kontamination. Proverna inkuberades vid rumstemperatur i 5 minuter och TE^{-1} bufferten avlägsnades därefter med pipett. Proceduren upprepades fyra gånger, vilket gav totalt fem tvättar.

De utstansade och tvättade FTA-korten torkades i en Combi Thermal Reactor TR2 (Hybaid) vid 56 °C i 10 minuter.

4.6 Amplifiering av DNA

Till varje PCR-amplifikationsrör tillsattes 2 μ l Milli-Q vatten och 18 μ l PCR mastermix innehållande 1,2 μ l $MgCl_2$ (25 mM), 2,0 μ l 10xPCR buffert (15 mM $MgCl_2$), 1,0 μ l dNTP (4 mM), 0,8 μ l primer forward (10 pmol/ μ l), 0,8 primer reverse (10 pmol/ μ l), 0,1 μ l Qiagen Hotstart *Taq* enzym (5 U/ml) och 12,1 μ l Milli-Q vatten. Primer forward (Ex2F2, 5'-GGAAA AAGGAACACACAAAGG-3') och primer reverse (Ex3R1, 5'-ACCAATTAAACAGTGG ACTAT-3') var specifika för exon 2 och exon 3 inom *PTPLA* (Pele *et al.* 2005).

PCR-amplifieringen genomfördes i en DNA Engine Peltier Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories) med följande förhållanden: 94 °C i 3 minuter, två cykler med 94 °C i 30 sekunder, 57 °C i 30 sekunder, 72 °C i 2 minuter, två cykler med 94 °C i 30 sekunder, 55 °C i 30 sekunder, 72 °C i 2 minuter, två cykler med 94 °C i 30 sekunder, 53 °C i 30 sekunder, 72 °C i 2 minuter, 29 cykler med 94 °C i 30 sekunder, 50 °C i 30 sekunder, 72 °C i 2 minuter, 72 °C i 5 minuter (Pele *et al.* 2005) och till sist 12 °C konstant.

4.7 Separering av DNA fragment

En 2 % agarosgel framställdes och placerades i 1xTAE buffert. Det tillsattes 5 μ l 5x orange gel-loading buffert till varje PCR-amplifieringsrör innehållande amplifierat DNA. Det

överfördes 20 µl från ett PCR-amplifieringsrör till en brunn i agarogelen och proceduren upprepades för varje rör. En 100 bp storleksmarkör tillsattes i första och sista brunnen. Gelelektrofores utfördes med 120-125 V i 30 minuter så att fragmenten migrerade. Agarogelen avlägsnades från 1xTAE bufferten och banden på gelen visualiserades med UV-ljus (100 %).

FTA-kort från varje labrador genomgick mutationstestet minst två gånger.

4.8 Utskick av attester

Efter tolkning av resultaten från mutationstestet skrevs och sändes attester till de labradorägare som returnerat svarstalongen. Det skildes på attester till ägare vars labradors identitet verifierats av veterinär och attester till ägare vars labradors identitet endast verifierats av ägaren själv. En mall på attester som sändes till labradorägarna kan ses i Bilaga 6.

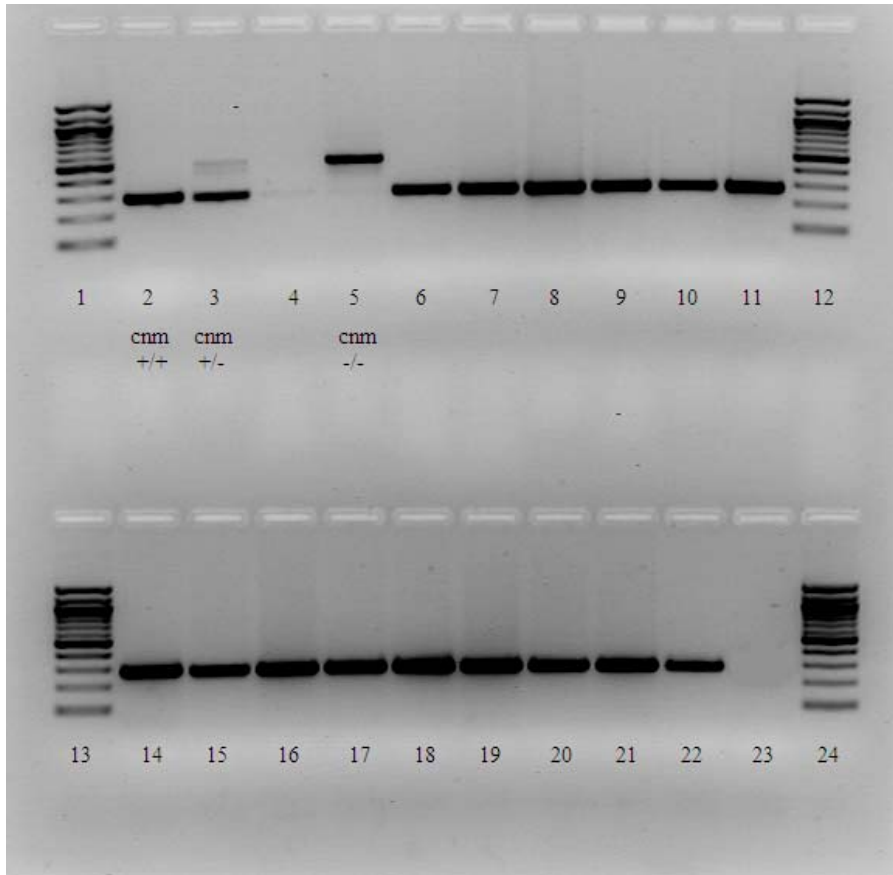
5. Resultat

PCR-amplifiering av DNA från homozygot normala labradorer ($cnm^{+/+}$) gav ett band på 282 bp och homozygot afficerade labradorer ($cnm^{-/-}$) gav ett band på 518 bp på agarogelen. DNA från heterozygoter ($cnm^{+/-}$) gav band på både 282 bp och 518 bp.

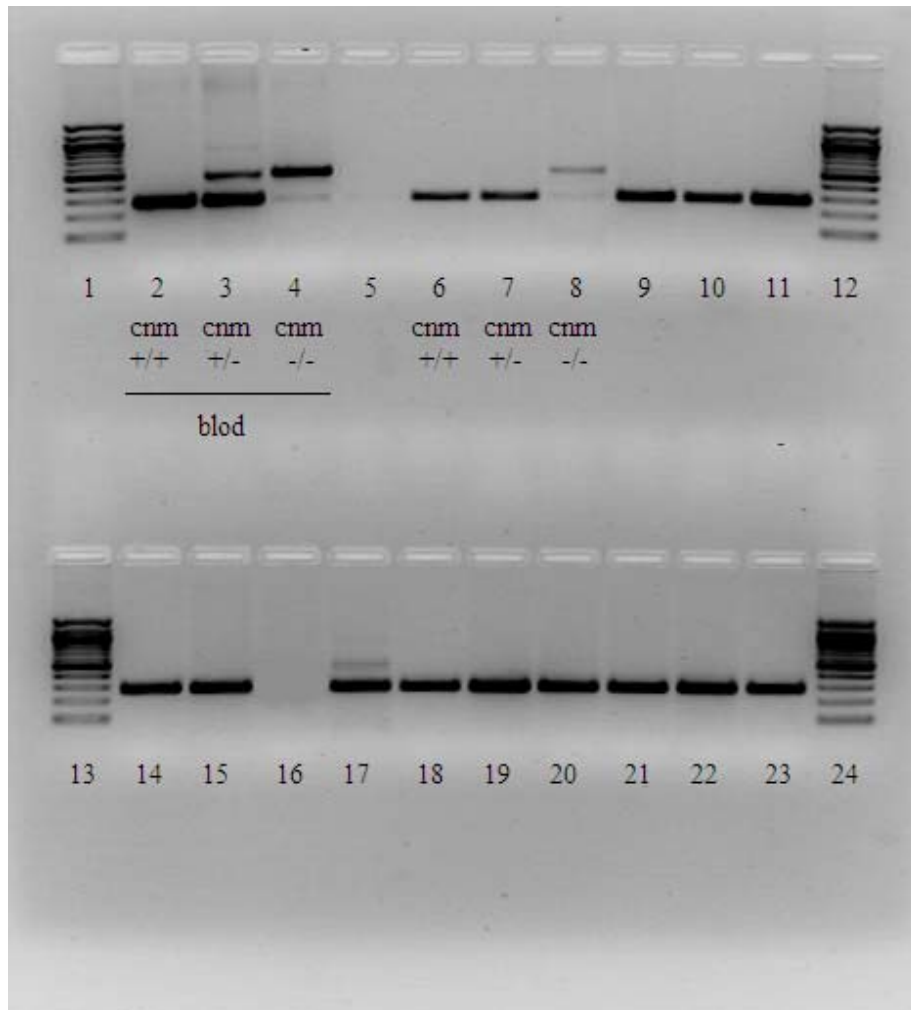
Mutationstestet visade en heterozygot ($cnm^{+/-}$) och 43 homozygot normala labradorer ($cnm^{+/+}$) (Fig. 8-10). Resultatet från heterozygoten ses i Fig. 9, brunn 17.

En utav de 60 utvalda labradorhanarna var far till labradorerna afficerade av CNM nämnda i kapitel 2.8. Efter att ägaren mottagit informationsbrevet meddelade vederbörande att labradoren avlidit. Eftersom labradorhanen producerat valpar afficerade av CNM och därmed var heterozygot, valdes det att inkludera den i resultatet.

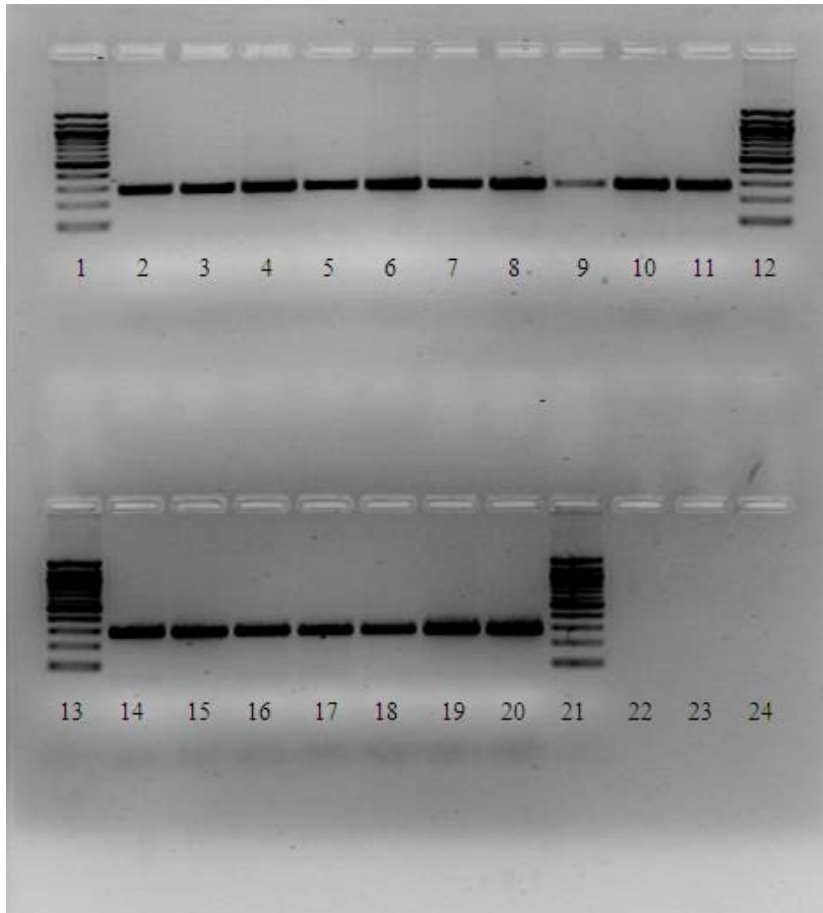
Resultatet av föreliggande undersökning blev två heterozygoter ($cnm^{+/-}$) och 43 homozygot normala labradorer ($cnm^{+/+}$). Grundat på föreliggande undersökning är allelfrekvensen av anlaget för CNM 2,2 % bland danska avelslabradorer med valpkullar födda och registrerade i Dansk Kennel Klub år 2005 (Bilaga 7).



Figur 8. Resultat från mutationstestet. Brunn 1, 12, 13, 24: 100 bp storleksmarkör, brunn 2: kontroll-DNA från FTA-kort från en homozygot normal labrador ($cnm^{+/+}$), brunn 3: kontroll-DNA från FTA-kort från en heterozygot labrador ($cnm^{+/-}$), brunn 4: blindprov från FTA-kort, brunn 5: kontroll-DNA från FTA-kort från en homozygot afficerad labrador ($cnm^{-/-}$), brunn 6-11, 14-22: DNA från 15 labradorer som deltog i undersökningen, brunn 23: hund som ej deltog i undersökningen.



Figur 9. Resultat från mutationstestet. Brunn 1, 12, 13, 24: 100 bp storleksmarkör, brunn 2: kontroll-DNA från blod från en homozygot normal labrador ($cnm^{+/+}$), brunn 3: kontroll-DNA från blod från en heterozygot labrador ($cnm^{+/-}$), brunn 4: kontroll-DNA från blod från en homozygot afficerad labrador ($cnm^{-/-}$), brunn 5: blindprov från FTA-kort, brunn 6: kontroll-DNA från FTA-kort från en homozygot normal labrador ($cnm^{+/+}$), brunn 7: kontroll-DNA från FTA-kort från en heterozygot labrador ($cnm^{+/-}$), brunn 8: kontroll-DNA från FTA-kort från en homozygot afficerad labrador ($cnm^{-/-}$), brunn 9-11, 14, 15, 17-23: DNA från 13 labradorer som deltog i undersökningen, brunn 16: hund som ej deltog i undersökningen.



Figur 10. Resultat från mutationstestet. Brunn 1, 12, 13, 21: 100 bp storleksmarkör, brunn 2-11, 14-20: DNA från 17 labradorer som deltog i undersökningen, brunn 22-24: tomma.

6. Diskussion

Föreliggande undersökning gav en genotypfrekvens av homozygot normala på 95,6 %, av heterozygoter på 4,4 % och av homozygot afficerade på 0 % bland danska avelslabradorer med valpkullar födda och registrerade i Dansk Kennel Klub år 2005. Utifrån detta beräknades allelfrekvensen av anlaget för CNM till 2,2 %. Med denna allelfrekvens som utgångspunkt blir den förväntade genotypfrekvensen av homozygot normala 95,6 %, av heterozygoter 4,3 % och av homozygot afficerade 0,049 % i en population som befinner sig i Hardy-Weinberg jämvikt (Bilaga 7). För att undersöka om testpopulationen befinner sig i Hardy-Weinberg jämvikt kan ett χ^2 -test utföras, men detta blir missvisande eftersom homozygot afficerade labradorer inte inkluderades i föreliggande undersökning och testpopulationen är liten.

På bakgrund av DKK's etiska rekommendationer för uppfödning (Bilaga 8) antogs det att det inte avlas på labradorer med symptom på CNM. Därför antogs det även att det inte fanns några afficerade labradorer i testpopulationen, vilket medförde att dessa inte fanns med i beräkningen av allelfrekvensen av anlaget för CNM.

Mutationstestet genomfördes fyra gånger på DNA från den heterozygota labradoren. I två utav de fyra tillfällena sågs två band, ett på 282 bp och ett på 518 bp. Det bedömdes att risken för ett falskt negativt resultat var större än risken för ett falskt positivt resultat och därför beslutades det att denna labrador skulle bedömas som bärare av CNM. Utstansade bitar från samtliga FTA-kort sändes till Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort i Frankrike för en dubbelbestämning. Den 5 januari 2009 hade resultaten från Frankrike inte anlänt till Institut for Basal Husdyr og Veterinærvidenskab, Det Biovidenskabelige Fakultet, Københavns Universitet.

År 2005 användes 280 labradorer registrerade i DKK i avel. DJR lämnar inte ut motsvarande uppgifter till utomstående. Därför är det inte möjligt att avgöra hur många labradorer registrerade i DJR som använts i avel i förhållande till DKK. Då DJR avböjde förfrågan om att delta i undersökningen är testpopulationen inte representativ för den generella labradorpopulationen i Danmark.

Urval av labradorer till att delta i undersökningen baserades på föräldrar till kullar födda och registrerade i DKK år 2005. För att ha fått en mer aktuell bild av allelfrekvensen i labradorpopulationen, kunde urvalet ha skett bland föräldrar till kullar födda ett senare år. Urvalet av labradortikar hade varit mer slumpmässig om det inte baserat på specifika kullar, utan skett på samma sätt som med hanhundarna. För att ha fått en mer representativ bild av hela labradorpopulationen kunde urvalet t.ex. ha baserats på valpar födda ett specifikt år och då hade inget urval skett baserat på om labradorerna använts i avel eller inte. Vid urval av labradorer till att delta i undersökningen förbisågs föräldrar till kullar födda år 2005, men registrerade år 2006, och detta bör tas i betraktning vid tolkning av resultatet.

En bortsortering av labradorer äldre än 10 år gjordes för att minska risken för att de utvalda labradorerna skulle vara avlidna. Syftet var att minska risken för att FTA-korten inte skulle returneras. Bortsorteringen medförde dock en risk att förbise labradorer äldre än 10 år som fortfarande var i livet.

Det gjordes ett försök att minimera risken för nära släktskap mellan de utvalda individerna genom att endast välja en far per kennelnamn. Ett alternativ vore att jämföra labradorernas stamtavlor då två hundar från olika kennlar kan ha närmre släktskap än två hundar från samma kennel. Detta ansågs dock inte praktiskt genomförbart inom den angivna tidsramen.

För att urvalet skulle ha gjorts helt slumpmässigt skulle lotten fullständigt ha avgjort vilka labradorer registrerade i DKK som skulle delta i undersökningen. Eftersom så inte var fallet bedöms testpopulationen inte vara representativ för samtliga labradorer registrerade i DKK.

Antalet labradorer som valdes ut till att delta i föreliggande undersökning var 100 stycken. Dock returnerades FTA-kort endast från 44 labradorer. För att fler FTA-kort skulle returneras sattes en påminnelse in i DRK's medlemstidning Retrievern, men det kunde även ha skickats en personlig påminnelse per post till labradorägarna.

Blodprov och kindskrap diskuterades som alternativ till uppsamling av DNA från labradorerna. I en artikel publicerad år 2007 beskrivs en studie där storskalig SNP genotypning genomfördes med hjälp av DNA både från kindskrap fixerat på FTA-kort och från blod. Provtagningsmetoderna gav identiska resultat (He *et al.*). Kindskrap och FTA-kort valdes i föreliggande undersökning då provtagningen kunde utföras av labradorägarna själva i hemmet och transporteras i ett vanligt kuvert. För att se om provtagningsmetoderna skulle ge identiska resultat valdes det att inkludera kontroll-DNA både från kindskrap fixerat på FTA-kort och från blod. Resultatet i föreliggande undersökning visade en tydlig skillnad då DNA från blod (Fig. 9, brunn 2-4) gav ett mer pålitligt resultat än DNA från kindskrap fixerat på FTA-kort (Fig. 9 brunn 6-8). En anledning till detta kan vara att DNA från blod gav upphov till ett större antal PCR-produkter jämfört med DNA från kindskrap fixerat på FTA-kort.

Föräldrarna till labradorerna nämnda i kapitel 2.8 är heterozygoter eftersom de producerat valpar afficerade av en autosomalt recessiv sjukdom. Dessa föräldrar ingår i populationen på 280 labradorer som är registrerade i DKK och som användes i avel år 2005. Fadern blev slumpmässigt utvald till att delta i undersökningen, men ägaren meddelade att labradoren avlidit. Modern blev inte utvald till att delta i undersökningen. Totalt har fadern och modern producerat 137 respektive 18 labradorvalpar registrerade i DKK. Labradoren som med hjälp av mutationstestet i denna undersökning visade sig vara heterozygot har producerat en kull med sex valpar registrerade i DKK (Dansk Kennel Klub 2008). Totalt har de tre

avelslabradorerna producerat 152 valpar. Om det antas att dessa avelslabradorer parats med homozygot normala labradorer samt att det recessiva anlaget förts vidare till hälften av valparna enligt Mendelsk nedärvning, innebär det att 76 av dessa valpar är heterozygoter.

DKK har infört avelsrestriktioner för höftledsdysplasi, armbågsledsdysplasi, progressiv retinal atrofi och kryptorchism för labradorer för att förhindra spridning av ärftliga anlag inom rasen (Bilaga 8). För att förhindra att anlaget för CNM förs vidare i labradorpopulationen i Danmark skulle en avelsrestriktion för sjukdomen kunna införas. En avelsrestriktion mot att inkludera heterozygoter och homozygot afficerade i avel kan utrota anlaget för CNM. Detta skulle innebära att 95,6 % av labradorerna får användas i avel men i kombination med de andra avelsrestriktionerna sjunker denna andel ytterligare. Ett sätt att öka andelen är att istället införa en avelsrestriktion för CNM som tillåter att heterozygoter används i avel, men endast paras med homozygot normala labradorer. Detta kan utrota sjukdomen men inte anlaget. Införande av en avelsrestriktion kan även medföra att uppfödare, valpköpare och veterinärer uppmärksammas på att sjukdomen existerar. Nackdelar med en ny avelsrestriktion är att det kan uppfattas som besvärligt av uppfödare med de omkostnader som ytterligare en avelsrestriktion innebär. Detta kan medföra att uppfödare ignorerar alla avelsrestriktioner och börjar avla utanför de stamboksförande organisationerna, vilket i sin tur leder till minskade avelsbestånd och minskad genetisk variation inom de individuella organisationerna.

Alla labradorägare bör informeras om CNM och om den lista upprättad av DRK som står omnämnd i kapitel 2.9. Informationen kan t.ex. ges via föreläsningar och informationsblad. Labradorägare, oavsett om de är uppfödare eller inte, bör rapportera sin labradors resultat om de har fått den testad för CNM. Om det visar sig att sjukdomen är utbredd i labradorpopulationen kan kanske en avelsrestriktion komma på tal.

Det är viktigt att de två differentialdiagnoserna X-bunden muskeldystrofi hos hundar och ärftlig myopati identisk med den som ses hos grand danois också tas i betraktning av veterinärer vid mötet med en labrador med symptom på CNM. Om ett mutationstest visar att en labrador med symptom på CNM inte är afficerad bör en muskelbiopsi tas för att bekräfta eller avvisa dessa diagnoser.

7. Slutsats

Syftet med rapporten är att belysa centronukleär myopati (CNM) för personer som är involverade i avel av labradorer och därmed försöka bidra till att begränsa utbredningen av sjukdomen. CNM är en autosomalt recessiv myopati som orsakas av en homozygot insertion av en tRNA-liknande SINE inom *PTPLA* exon 2 hos labradorer. En undersökning gjordes bland danska avelslabradorer med valpkullar födda och registrerade i Dansk Kennel Klub år 2005. Utav 45 labradorer visade sig två vara heterozygoter för anlaget för CNM, vilket gav en allelfrekvens på 2,2 %.

8. Perspektivering

En reell och aktuell bild över utbredningen av sjukdomen i den danska labradorpopulationen kan erhållas genom en kontinuerligt uppdaterad lista med resultat över labradorer testade för CNM. Detta kan bli början till en diskussion om ett eventuellt införande av en avelsrestriktion. Frågan är om anlaget för CNM är tillräckligt utbrett för att införa en avelsrestriktion. Det skulle kunna utföras en mer omfattande undersökning av allelfrekvensen av anlaget för CNM i Danmark, än undersökningen beskriven i denna rapport. En liknande undersökning skulle även kunna utföras i andra länder för att få ytterligare en bild av utbredningen av sjukdomen.

Ett alternativ till införandet av en avelsrestriktion skulle kunna vara att rekommendera att mutationstest utförs på labradorer med nära släktskap till kända heterozygoter och homozygot afficerade. Ett förslag är att DRK sponsrar detta och därmed ökar chansen att labradorena testas. Ett annat alternativ vore att DKK inför ett frivilligt avelsprogram med en avelsrestriktion som framtida mål.

References

- Amann, J.F., M.H. Laughlin, & R.J. Korthuis (1988): Muscle Hemodynamics in Hereditary Myopathy of Labrador Retrievers. *American Journal of Veterinary Research*. Vol. 49, no. 7, pp. 1127-1130.
- Bergman, R.L., K.D. Inzana, W.E. Monroe, L.G. Shell, L.A. Liu, E. Engvall, & G.D. Shelton (2002): Dystrophin-deficient muscular dystrophy in a labrador retriever. *Journal of the American Animal Hospital Association*. Vol. 38, no. 3, pp. 255-261.
- Bley, T., C. Gaillard, T. Bilzer, K.G. Braund, D. Faissler, F. Steffen, S. Cizinauskas, J. Neumann, T. Vogtli, R. Equey, & A. Jaggy (2002): Genetic aspects of labrador retriever myopathy. *Research in Veterinary Science*. Vol. 73, no. 3, pp. 231-236.
- Breen, M., S. Jouquand, C. Renier, C.S. Mellersh, C. Hitte, N.G. Holmes, A. Cheron, N. Suter, F. Vignaux, A.E. Bristow, C. Priat, E. McCann, C. Andre, S. Boundy, P. Gitsham, R. Thomas, W.L. Bridge, H.F. Spriggs, E.J. Ryder, A. Curson, J. Sampson, E.A. Ostrander, M.M. Binns, & F. Galibert (2001): Chromosome-specific single-locus FISH probes allow anchorage of an 1800-marker integrated radiation-hybrid/linkage map of the domestic dog genome to all chromosomes. *Genome Research*. Vol. 11, no. 10, pp. 1784-1795.
- Breen, M., R. Thomas, M.M. Binns, N.P. Carter, & C.F. Langford (1999): Reciprocal chromosome painting reveals detailed regions of conserved synteny between the karyotypes of the domestic dog (*Canis familiaris*) and human. *Genomics*. Vol. 61, no. 2, pp. 145-155.
- CNM Project - ENV Alfort (2008a): *Clinical Information - Raising a CNM Lab*, [online]. [Access Date: 2008-11-20a]. Last update: 2008a. Availability: http://www.labradorcnm.com/pages/site/0-frame_site.html.
- CNM Project - ENV Alfort (2008b): *For the Veterinarian - Diagnosing CNM*, [online]. [Access Date: 2008-11-20b]. Last update: 2008b. Availability: http://www.labradorcnm.com/pages/site/0-frame_site.html.
- Cooper, B.J., N.J. Winand, H. Stedman, B.A. Valentine, E.P. Hoffman, L.M. Kunkel, M.O. Scott, K.H. Fischbeck, J.N. Kornegay, R.J. Avery, J.R. Williams, R.D. Schmickel, & J.E. Sylvester (1988): The Homolog of the Duchenne Locus Is Defective in X-Linked Muscular-Dystrophy of Dogs. *Nature*. Vol. 334, no. 6178, pp. 154-156.
- Cosford, K.L., S.M. Taylor, L. Thompson, & G.D. Shelton (2008): A possible new inherited myopathy in a young Labrador retriever. *Canadian Veterinary Journal-Revue Veterinaire Canadienne*. Vol. 49, no. 4, pp. 393-397.
- Couto, C.G. & R.W. Nelson (2003): *Small animal internal medicine*. 3. ed. Mosby, St. Louis, Mo., p. 971.
- Dansk Kennel Klub (2008): *DKK Hundedatabasen*, [online]. [Access Date: 2008-11-27]. Last update: 2008. Availability: <http://www.hundeweb.dk/dkkhwh/hw/openPage/hundeweb/index.html>.

Dansk Retriever Klub (2008a): *Avlsrådgivning - Sundhed - CNM resultater for Labrador Retriever*, [online]. [Access Date: 2008-12-09a]. Last update: 2008a. Availability: <http://www.labrador-retriever.dk/>.

Dansk Retriever Klub (2008b): *Nyheder*, [online]. [Access Date: 2008-12-10b]. Last update: 2008b. Availability: <http://www.labrador-retriever.dk/>.

Gortel, K., D.M. Houston, T. Kuiken, C.L. Fries, & B. Boisvert (1996): Inherited myopathy in a litter of Labrador retrievers. *Canadian Veterinary Journal-Revue Veterinaire Canadienne*. Vol. 37, no. 2, pp. 108-110.

He, H.B., L. Argiro, H. Dessein, & C. Chevillard (2007): Improved technique that allows the performance of large-scale SNP genotyping on DNA immobilized by FTA (R) technology. *Infection Genetics and Evolution*. Vol. 7, no. 1, pp. 128-132.

Hoffman, E.P., R.H. Brown, Jr., & L.M. Kunkel (1987): Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell*. Vol. 51, no. 6, pp. 919-928.

Hospital for Mindre Husdyr Köpenhamn. Journal nr 15816. 5-7-2007.
Ref Type: Case

Hospital for Mindre Husdyr Köpenhamn. Journal nr 17860. 10-10-2008.
Ref Type: Case

Jensen M. (2008): Personal Communication.

Koenig, M., E.P. Hoffman, C.J. Bertelson, A.P. Monaco, C. Feener, & L.M. Kunkel (1987): Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell*. Vol. 50, no. 3, pp. 509-517.

Kramer, J.W., G.A. Hegreberg, G.M. Bryan, K. Meyers, & R.L. Ott (1976): Muscle Disorder of Labrador Retrievers Characterized by Deficiency of Type-2 Muscle-Fibers. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. Vol. 169, no. 8, pp. 817-820.

Kramer, J.W., G.A. Hegreberg, & M.J. Hamilton (1981): Inheritance of A Neuromuscular Disorder of Labrador Retriever Dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. Vol. 179, no. 4, pp. 380-381.

Laboklin (2008): *Genetic - Genetic Diseases - Hereditary myopathy - Genetic testing for Hereditary myopathy in Labrador Retrievers (HMLR)*, [online]. [Access Date: 2008-11-20]. Last update: 2008. Availability: <http://www.laboklin.de/frame.php?lang=en>.

Li, D.X., O. Gonzalez, L.L. Bachinski, & R. Roberts (2000): Human protein tyrosine phosphatase-like gene: expression profile, genomic structure, and mutation analysis in families with ARVD. *Gene*. Vol. 256, no. 1-2, pp. 237-243.

Lindell, C. (2008): *Hälsa - Myopati*, [online]. [Access Date: 2008-09-08]. Last update: 2008. Availability: <http://www.minnows.se>.

Mckerrell, R.E. & K.G. Braund (1986): Hereditary Myopathy in Labrador Retrievers - A Morphological-Study. *Veterinary Pathology*. Vol. 23, no. 4, pp. 411-417.

- Mckerrell, R.E. & K.G. Braund (1987): Hereditary Myopathy in Labrador Retrievers - Clinical Variations. *Journal of Small Animal Practice*. Vol. 28, no. 6, p. 479-&.
- McKusick, V.A., C.L. Kniffin & P.A. Hartz (2004): *Online Mendelian Inheritance in Man*, [online]. [Access Date: 2008-12-12]. Last update: 2004. Availability: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=193060>.
- Mellersh, C.S., C. Hitte, M. Richman, F. Vignaux, C. Priat, S. Jouquand, P. Werner, C. Andre, S. DeRose, D.F. Patterson, E.A. Ostrander, & F. Galibert (2000): An integrated linkage-radiation hybrid map of the canine genome. *Mammalian Genome*. Vol. 11, no. 2, pp. 120-130.
- Mellersh, C.S., A.A. Langston, G.M. Acland, M.A. Fleming, K. Ray, N.A. Wiegand, L.V. Francisco, M. Gibbs, G.D. Aguirre, & E.A. Ostrander (1997): A linkage map of the canine genome. *Genomics*. Vol. 46, no. 3, pp. 326-336.
- Moore, M.P., S.M. Reed, G.A. Hegreberg, J.W. Kramer, J.E. Alexander, K.M. Meyer, & G.M. Bryan (1987): Electromyographic Evaluation of Adult Labrador Retrievers with Type-Ii Muscle-Fiber Deficiency. *American Journal of Veterinary Research*. Vol. 48, no. 9, pp. 1332-1336.
- Murray, J.M., K.E. Davies, P.S. Harper, L. Meredith, C.R. Mueller, & R. Williamson (1982): Linkage Relationship of A Cloned Dna-Sequence on the Short Arm of the X-Chromosome to Duchenne Muscular-Dystrophy. *Nature*. Vol. 300, no. 5887, pp. 69-71.
- Pele, M., L. Tiret, J.L. Kessler, S. Blot, & J.J. Panthier (2005): SINE exonic insertion in the PTPLA gene leads to multiple splicing defects and segregates with the autosomal recessive centronuclear myopathy in dog (vol 14, pg 1417, 2005). *Human Molecular Genetics*. Vol. 14, no. 13, pp. 1905-1906.
- Sharp, N.J.H., J.N. Kornegay, & S.B. Lane (1989): The Muscular-Dystrophies. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery-Small Animal*. Vol. 4, no. 2, pp. 133-140.
- Svenska kennelklubben (2008): *SKK Hunddata - Sök hundar*, [online]. [Access Date: 2008-09-08]. Last update: 2008. Availability: http://kennet.skk.se/hunddata/Hund_sok.asp.
- Tiret, L., S. Blot, J.L. Kessler, H. Gaillot, M. Breen, & J.J. Panthier (2003): The cnm locus, a canine homologue of human autosomal forms of centronuclear myopathy, maps to chromosome 2. *Human Genetics*. Vol. 113, no. 4, pp. 297-306.
- Uwanogho, D.A., Z. Hardcastle, P. Balogh, G. Mirza, K.L. Thornburg, J. Ragoussis, & P.T. Sharpe (1999): Molecular cloning, chromosomal mapping, and developmental expression of a novel protein tyrosine phosphatase-like gene. *Genomics*. Vol. 62, no. 3, pp. 406-416.
- VetGen (2008): *CNM - Centronuclear Myopathy*, [online]. [Access Date: 2008-11-20]. Last update: 2008. Availability: <http://www.vetgen.com/canine-centronuclear-myopathy.html>.
- Watson, A.D.J., B.R.H. Farrow, D.J. Middleton, & J.B.A. Smyth (1988): Myopathy in A Labrador Retriever. *Australian Veterinary Journal*. Vol. 65, no. 7, pp. 226-227.

Werner, P., C.S. Mellersh, M.G. Raducha, S. DeRose, G.M. Acland, U. Prociuk, N. Wiegand, G.D. Aguirre, P.S. Henthorn, D.F. Patterson, & E.A. Ostrander (1999): Anchoring of canine linkage groups with chromosome-specific markers. *Mammalian Genome*. Vol. 10, no. 8, pp. 814-823.

Yang, F., P.C.M. O'Brien, B.S. Milne, A.S. Graphodatsky, N. Solanky, V. Trifonov, W. Rens, D. Sargan, & M.A. Ferguson-Smith (1999): A complete comparative chromosome map for the dog, red fox, and human and its integration with canine genetic maps. *Genomics*. Vol. 62, no. 2, pp. 189-202.

Zubrzyckagaarn, E.F., D.E. Bulman, G. Karpati, A.H.M. Burghes, B. Belfall, H.J. Klamut, J. Talbot, R.S. Hodges, P.N. Ray, & R.G. Worton (1988): The Duchenne Muscular-Dystrophy Gene-Product Is Localized in Sarcolemma of Human Skeletal-Muscle. *Nature*. Vol. 333, no. 6172, pp. 466-469.

Bilaga 1: FTA-kort

FTA stod ursprungligen för Flinders Tech Associates, efter det australiensiska universitetet som utvecklat FTA-kortet. Senare började företaget Whatman producera FTA-kort och betydelsen av FTA ändrades till Fast Technology for Analysis of nucleic acid (Statens kriminaltekniska laboratorium 2006). FTA-kort förenklar hantering och behandling av nukleinsyror. Kortet innehåller kemikalier som lyserar celler, denaturerar proteiner och skyddar nukleinsyror från nukleaser, oxidation och UV-strålning. Nukleinsyrorna frigörs och fångas upp i kortets fibrer och är därefter stabila i rumstemperatur i flera år. Detta gör att DNA-provtagning kan genomföras varsomhelst och proverna kan transporteras enkelt. Andra fördelar är att FTA-korten inaktiverar och förhindrar växt av bakterier och andra mikroorganismer och ändrar färg vid applicering av färglösa prover (Whatman 2007).

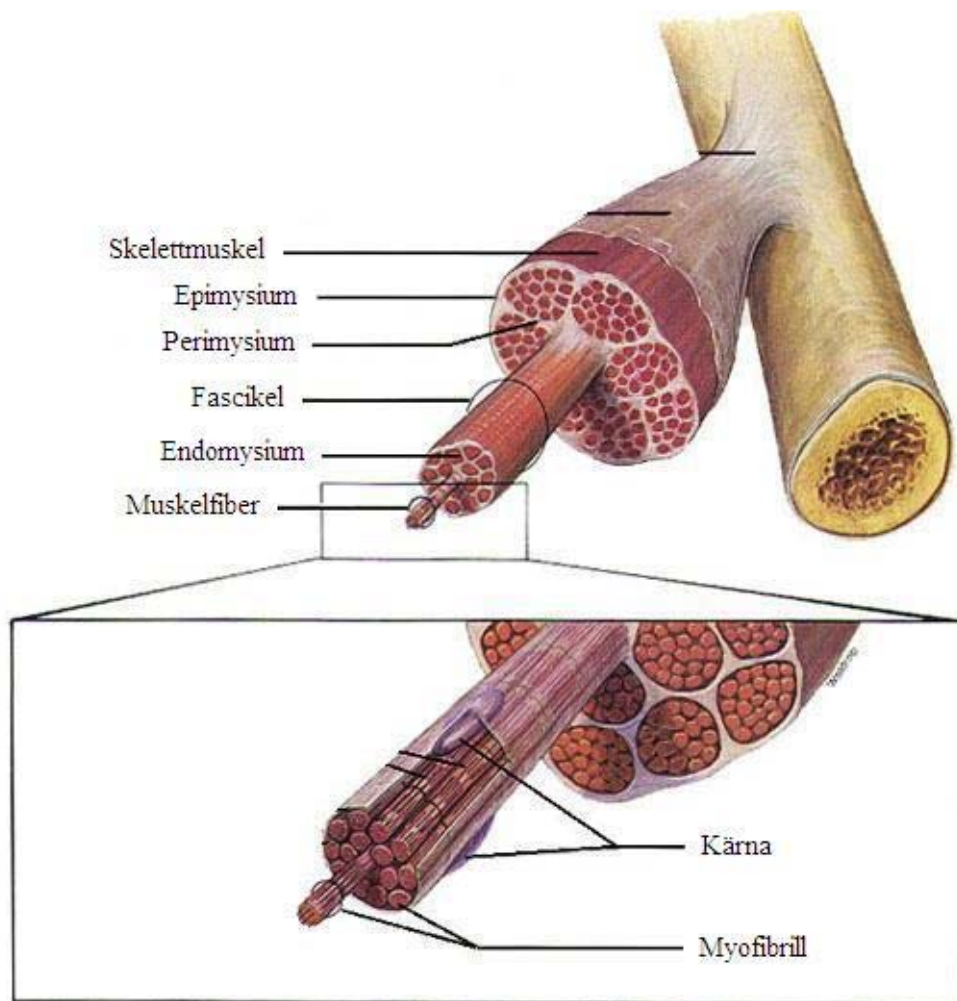
References

Statens kriminaltekniska laboratorium (2006): *Frågor och svar om salivprovtagning för DNA*, [online]. [Access Date: 2008-09-29]. Last update: 2006. Availability: <http://www.polisen.se/inter/nodeid=42974&pageversion=1.jsp>.

Whatman (2007): *FTA[®] Nucleic Acid Collection, Storage and Purification*, [online]. [Access Date: 2008-09-29]. Last update: 2007. Availability: <http://www.whatman.com/FTANucleicAcidCollectionStorageandPurification.aspx>

Bilaga 2: Muskelfysiologi

Figur 1 visar en skelettmuskels uppbyggnad (Fox 1993). En skelettmuskel består av flera muskelfascikler som i sin tur är uppbyggda av muskelceller, även kallade muskelfibrer. Normala muskelfibrer är mellan 10 och 110 μm i diameter, och består av flera myofibriller. Muskelfasciklerna omges av ett perimysium och varje muskelfiber i en fascikel omsluts av ett endomysium. Muskelfascikler grupperas i muskler som omges av ett epimysium (Dellmann H.D. & Eurell J. 1998).



Figur 1. En skelettmuskels uppbyggnad (Fox 1993).

Skelettmuskulatur klassificeras som typ I och typ II. Muskelfibrer typ I kallas även långsamma röda muskelfibrer. De är små och rika på blodkärl, mitokondrier och myoglobin. Dessa muskelfibrer utnyttjar oxidativ metabolism och är lämpade för kontinuerlig kontraktion. Muskelfibrer typ II kallas även snabba vita muskelfibrer. De är stora, har ett

omfattande sarkoplasmiskt retikulum för snabb frigivelse av Ca^{2+} och har få blodkärl och få mitokondrier. Dessa muskelfibrer används vid hopp, sprint och andra kortvariga kraftfulla rörelser. Oftast består en muskel av en blandning av muskelfibrer typ I och typ II och proportionerna varierar i överensstämmelse med muskelns användningsområde (Cunningham 2002).

References

- Cunningham, J.G. (2002): Textbook of veterinary physiology. 3. ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia, Pa., pp. 48-49.
- Dellmann H.D. & Eurell J. (1998): Textbook of veterinary histology. 5. ed. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 80-83.
- Fox, S.I. (1993): Human physiology. 4. ed. William C. Brown Publishers, Dubuque, IA, p. Fig. 12.2.

Bilaga 3: Genetiska facktermer

LOD (logarithm of the odds) score är sannolikheten att det finns en koppling mellan två lokus, relativt till att det inte finns en koppling. Det nedre gränsvärdet för LOD score för koppling mellan två lokus är satt till värdet tre av humana genetiker (Hartwell *et al.* 2004).

θ (theta) är rekombinationsfrekvensen mellan två markörer på en kromosom under meios. θ varierar från 0 (de två markörerna separeras aldrig) till 1,0 (de två markörerna separeras alltid) (Strachan & Read 2004).

Transposabla element (TE)

Cirka 45 % av det humana genomet består av mobila DNA-sekvenser som kallas transposabla element (TE). Vilket som helst segment som utvecklar förmågan att förflyttas från plats till plats inom genomet kallas ett TE oavsett dess ursprung eller funktion. Några TE har utvecklat funktioner som hjälper deras värd, men sekvenserna behöver inte tillföra något till värden. De flesta TE varierar i längd från 50 baspar (bp) till 10 000 bp. Ett specifikt TE kan finnas på flera platser i genomet och kan dessutom uppkomma och försvinna under evolutionens gång.

TE delas in i fyra grupper: long interspersed elements (LINEs), short interspersed elements (SINEs), long terminal repeat (LTR) retroposoner och DNA transposoner. De tre förstnämnda transponerar med hjälp av omvänd transkription och kallas retroposoner. Den sistnämnda gruppen transponerar direkt som DNA. De TE som kan transponeras självständigt kallas autonoma element. Om en deletion omöjliggör transponeringen av ett TE strandas det på dess befintliga plats i genomet och det benämns icke-autonomt. Exempel på detta är inaktivering av genen för omvänd transkriptas i ett retroposon och inaktivering av genen för transposas i ett transposon. En del icke-autonoma TE kan förflyttas med hjälp av autonoma elementet på andra placeringar i genomet.

Insertion av ett TE nära eller inom en gen kan påverka genens uttryck och ändra fenotypen. Om ett TE hamnar inom en exon eller en intron kan det ändra läsramen eller så kan effektiviteten av splicingen minska. Det kan vid vissa tillfällen resultera i att TE avlägsnas från den primära transkripten och ge viss syntes, men mindre än normalt, av det funktionella proteinet. TE kan utlösa spontana kromosomförändringar på flera sätt. Om t.ex. två kopior av

samma TE sitter nära varandra men inte på identiska platser på homologa kromosomer, kan de vid överkorsning resultera i kromosomer med deletioner och duplikationer av intilliggande gener.

Förutom CNM hos labradorer är narkolepsi hos doberman ett exempel på en sjukdom som orsakas av en insertion av en SINE i en gen (Lin *et al.* 1999). SINEs är retroposoner som utgör 13 % av det humana genomet. De är icke-autonoma och 100-300 bp långa. Samtliga SINEs i däggdjurens genom ser ut att ha utvecklats från olika former av RNA, oftast tRNA. SINE har en poly-A svans på 3' änden av cDNA-strängen (Hartwell *et al.* 2004).

Exon trapping är en teknik för att upptäcka sekvenser inom ett klonat genomiskt DNA där exoner kan splicas i en speciell vektor (Strachan & Read 2004).

Nested PCR är ett sätt att öka specificiteten av PCR-reaktionen. Produkterna från den första amplifieringen förtunnas och används som utgångspunkt för en andra reaktion med andra primers. Dessa primers motsvarar sekvenser nära men innanför de primers som användes i den första reaktionen (Strachan & Read 2004).

Real-time PCR är en form av kvantitativ PCR där det används en fluorescens-detekterande termocykler för att amplifiera specifika nukleinsyrasekvenser och samtidigt mäta deras koncentrationer (Strachan & Read 2004).

References

Hartwell, L.H., L. Hood, M.L. Goldberg, A.E. Reynolds, L.M. Silver, & R.C. Veres (2004): Genetics: from genes to genomes. 2. ed. McGraw-Hill Education, Maidenhead, pp. 341, 344, 392-393, 460-465, 724.

Lin, L., J. Faraco, R. Li, H. Kadotani, W. Rogers, X.Y. Lin, X.H. Qiu, P.J. de Jong, S. Nishino, & E. Mignot (1999): The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene. *Cell*. Vol. 98, no. 3, pp. 365-376.

Strachan, T. & A.P. Read (2004): Human molecular genetics 3. 3. ed. ed. Garland Science, London, pp. 124, 215, 634.

Bilaga 4: Informationsbrev med svarstalong

DET BIOVIDENSKABELIGE FAKULTET
FOR FØDEVARER, VETERINÆRMEDICIN OG NATURRESSOURCER
KØBENHAVNS UNIVERSITET
(Tidligere den Kgl. Veterinær- og Landbohøjskole)



Kære labradorejere,

Vi er to dyrlægestuderende, der skal skrive speciale om en arvelig muskelsygdom hos labrador, kaldet CNM. Til vores undersøgelse har vi brug for DNA fra ca. 100 labrador retrievere, tilfældigt udvalgt blandt de hunde der var avlsaktive i 2005.

Din hund _____ er en af de udvalgte, og vi vil være meget taknemmelige hvis du vil deltage i undersøgelsen.

Hvad skal du gøre?

I kuerten finder du udstyr til at udtage en DNA-prøve fra din hunds mundslimhinde. Det er to indpakkede prøvepinde med skumgummihovede samt et lille papkort, der indeholder et stykke lyserødt filterpapir med to sorte cirkler på. Der findes desuden en vejledning, der beskriver hvordan prøven udtages. Når du har udtaget prøven lægges papkortet i den frankerede svarkuvert og postes.

Hvad får du ud af det ?

Når vi modtager kortet med celler fra din hunds mundslimhinde, bruger vi det til at udføre en DNA-test for sygdommen CNM. Din hund er helt sikkert ikke syg – så ville du kunne se det på den (se nedenfor for en beskrivelse af sygdommen). Men den kan være skjult bærer af sygdommen og det er en vigtig oplysning at få, når man ejer en avlshund. Ved at deltage i projektet bidrager du desuden til at øger vores viden om udbredelsen af sygdomsgenet - en viden der bl.a. er nyttig før man går ind og anbefaler brugen af den nye DNA-tests.

Din hunds resultat mht. CNM er fortroligt og vil ikke blive videreformidlet til andre. For at få din hunds resultat at vide, skal du skrive navn, adresse og/eller mail på blanketten nedenfor og sende den med i den frankerede svarkuvert (Dette brev er udsendt af DKK ud fra de ejer-oplysninger der er registreret på hundens stambogsnummer – DKK må ikke udlevere adresseoplysninger, derfor kender vi ikke din adresse).

Det resultat du modtager kan du bruge i dit eget avlsarbejde, men det kan ikke betragtes som en egentlig "CNM-attest". Ønsker du en attest på din hunds CNM-status, kræver det at mundhuleskrabet er udtaget af en dyrlæge der kan verificere hundens identitet med stempel og underskrift.

Mere om CNM

CNM er en forkortelse for diagnosen Centro-Nukleær Myopat. Det er en arvelig muskelsygdom og arvegangen er såkaldt autosomal recessiv. Det vil sige at syge hunde har skal have modtaget et sygt gen fra begge deres forældre.

Symptomerne starter allerede ved to ugers alderen, hvor syge hvalp viser muskelsvaghed og bevægelsesproblemer. Der findes ingen medicin der kan helbrede hunden og det ender oftest med aflivning.

Hvis du vil vide mere om sygdommen kan det findes på www.labradorcnm.com

Har du spørgsmål vedrørende undersøgelsen er du meget velkommen til at kontakte os på cnmspeciale@dsr.life.ku.dk

Med Venlig Hilsen

.....
Jessica Astermark, jessica@dsr.life.ku.dk

.....
Malin Larsson, malin@dsr.life.ku.dk

.....
Helle Friis Proschowsky, hfp@life.ku.dk
Dyrlæge, vejleder på projektet

✂-----

Navn: _____

Adresse: _____

Evt. mailadresse: _____

Hundens fuldstændige navn: _____

Hundens stambogs nummer: _____

Evt. verifikation af hundens ID, dyrlæges stempel og underskrift

Bilaga 5: Vägledning till uppsamling av DNA

VEJLEDNING TIL OPSAMLING AF DNA FRA MUNDSLIMHINDEN

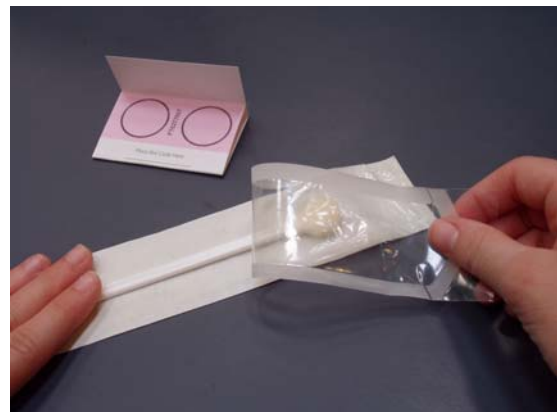


1. Læs vejledningen inden du går i gang.
2. Tænk på følgende:
 - ✓ Din hund skal ikke have spist eller drukket umiddelbart før prøvetagning.
 - ✓ Undgå så vidt muligt at skumgummiet på prøvepinden kommer i kontakt med anden end hundens mundslimhinde og det lyserøde filtrerpapir på FTA-kortet.
 - ✓ Når skumgummipuden har været i kontakt med FTA-kortet skal du ikke bruge den i hundens mund igen. Brug i stedet prøvepind nr. 2, hvis du er i tvivl om der er materiale nok.
3. Placer Jeres FTA-kort på en ren, tør og lige overflade.

4. Skriv hundens komplette navn (inkl. kennelnavn) og stambogsnummer på FTA-kortet.



5. Fjern plastikken fra prøvepindens pakning og åbn FTA-kortet så det lyserøde papir med de to sorte cirkler bliver synligt.



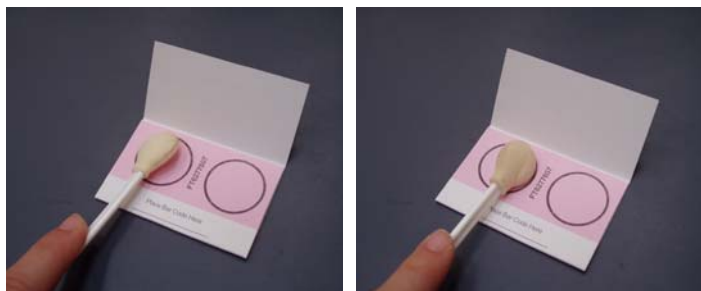
6. Adskil hundens over- og underlæbe ved hjælp af dine fingre. Få evt. en hjælper til at holde hunden hvis den er urolig. Hold prøvepinden i den anden hånd og før den ind på indersiden af kinden. Gnub skumgummiet forsigtigt mod indersiden af kinden i ca. 30 sekunder.



Gentag proceduren med den samme prøvepind i hundens anden kind. Til slut føres prøvepinden ned i bunden af mundhulen – evt. ind under tungen – så skumgummipuden kan opsuge så meget spyt som muligt.



7. Nu skal materialet overføres til FTA-kortet. Tryk skumgummipuden mod papiret indenfor den ene sorte cirkel og vip puden fra side til side med en rullende bevægelse. **GNUB IKKE - papiret går nemt i stykker.** Vend skumgummipuden og overfør resten af materialet til den anden cirkel.



8. Det lyserøde filtrerpapir skifter farve til hvidt når mundhuleskrabet overføres. Hvis dette ikke sker, er der ikke materiale nok, og du kan gentage proceduren med den vedlagte ekstra prøvepind.

9. Placer FTA-kortet som vist på billedet. Lad det lufttørre ved stuetemperatur i ca. 30 minutter.



10. Luk FTA-kortet, put det i den frankerede svarkuvert og send det med posten. Husk at vedlægge blanketten med dit navn og din adresse, så vi kan sende svaret til dig.

TUSIND TAK FOR HJÆLPEN!

Tak til Mette Lybeck Rueløkke, Hospital for Mindre Husdyr, for udlåning af labradoren Vitus

Bilaga 6: Attest

DET BIOVIDENSKABELIGE FAKULTET
FOR FØDEVARER, VETERINÆRMEDICIN OG NATURRESSOURCER
KØBENHAVNS UNIVERSITET

Ägarens namn
och adress



DNA test, centronukleær myopati (CNM), labrador retriever

Udført på Institut for Basal Husdyr- og Veterinærvidenskab, Det Biovidenskabelige Fakultet, Københavns Universitet efter metode beskrevet af Pelé M., Tired L., Kessel J-L., Blot S., Panthier J-J. (2005): *Human Molecular Genetics*. Vol. 14, pp. 1417-1427.

18.november 2008

Hundens navn: xxx
Stambogs nummer: xxx

INSTITUT FOR BASAL HUSDYR- OG
VETERINÆRVIDENSKAB
GENETIK OG BIOINFORMATIK

Hundens identitet verificeret af ejer.

Prøvetype: kindskrab

GRØNNEGÅRDSVEJ 3
1870 FREDERIKSBERG C

Resultat: homozygot $cnm^{+/+}$ (normal)

TLF 35 33 28 28
DIR 35 33 30 67
FAX 35 33 30 42

Tolkning af prøveresultat:

Hunden er homozygot normal for det gen der kan forårsage sygdommen CNM. Der er derfor ingen risiko at hunden udvikler sygdommen. Der er heller ingen risiko at hunden får afkom som udvikler sygdommen. Hvis hunden parres med en hund som er heterozygot (rask bærer) vil 50 % af deres afkom, rent statistisk, blive heterozygote (rask bærer) og 50 % homozygot normale.

hfp@life.ku.dk
www.life.ku.dk

Mulige udfald af DNA test:

homozygot $cnm^{+/+}$ (normal)
heterozygot $cnm^{+/-}$ (rask bærer)
homozygot $cnm^{-/-}$ (syg)

Med Venlig Hilsen

Helle Friis Proschowsky
Dyrlæge, lektor

Jessica Astermark
Specialestuderende

Malin Larsson
Specialestuderende

Bilaga 7: Hardy-Weinberg lagen

Populationer som består av ett stort antal individer, där parning sker slumpmässigt, inga nya mutationer uppstår, ingen migration sker in eller ut från populationen och där förmågan att reproducera sig inte beror på genotypen befinner sig i Hardy-Weinberg jämvikt.

Genotypfrekvensen = andelen av det totala antalet individer i en population som har en specifik genotyp.

Allelfrekvensen = andelen av alla kopior av en gen i en population som är av en given allel. Allelfrekvensen är konstant från generation till generation i en population som befinner sig i Hardy-Weinberg jämvikt.

p = frekvensen av den normala allelen = frekvensen av cnm^+

q = frekvensen av den sjukdomsorsakande allelen = frekvensen av cnm^-

Fördelningen av genotypfrekvensen av zygoter som uppstår i en stor population bestående av sexuellt reproducerande diploida organismer är $p^2 + 2pq + q^2 = 1$.

p^2 = genotypfrekvensen av homozygot normala individer = genotypfrekvensen av $cnm^{+/+}$

$2pq$ = genotypfrekvensen av heterozygota individer = genotypfrekvensen av $cnm^{+/-}$

q^2 = genotypfrekvensen av homozygot afficerade individer = genotypfrekvensen av $cnm^{-/-}$

(Hartwell *et al.* 2004)

Testpopulationen

(danska avelslabradorer med valpkullar födda och registrerade i Dansk Kennel Klub år 2005)

Antal labradorer med genotypen $cnm^{+/+}$: 43 st

Antal labradorer med genotypen $cnm^{+/-}$: 2 st

Antal labradorer med genotypen $cnm^{-/-}$: 0 st

Genotypfrekvensen av $cnm^{+/+}$: $43/(43+2+0) = 0,956 = 95,6 \%$

Genotypfrekvensen av $cnm^{+/-}$: $2/(43+2+0) = 0,044 = 4,4 \%$

Genotypfrekvensen av $cnm^{-/-}$: $0/(43+2+0) = 0 = 0 \%$

Antal alleler av cnm^{+} : $43*2+2 = 88$ st

Antal alleler av cnm^{-} : $0*2+2 = 2$ st

Allelfrekvensen av cnm^{+} : $88/(88+2) = 88/90 = 0,978 = 97,8 \% = p$

Allelfrekvensen av cnm^{-} : $2/(88+2) = 2/90 = 0,022 = 2,2 \% = q$

Beräknad genotypfrekvens utifrån ovanstående allelfrekvens

Genotypfrekvensen av $cnm^{+/+}$: $p^2 = (88/90)^2 = 0,956 = 95,6 \%$

Genotypfrekvensen av $cnm^{+/-}$: $2pq = 2*(88/90)*(2/90) = 0,043 = 4,3 \%$

Genotypfrekvensen av $cnm^{-/-}$: $q^2 = (2/90)^2 = 0,00049 = 0,049 \%$

References

Hartwell, L.H., L. Hood, M.L. Goldberg, A.E. Reynolds, L.M. Silver, & R.C. Veres (2004): Genetics: from genes to genomes. 2. ed. ed. McGraw-Hill Education, Maidenhead, pp. 679-682.

Bilaga 8: Avelsrestriktioner

DKK's definition av avelsrestriktioner är att hundar av vissa raser skall uppfylla bestämda krav för att få ingå i avel. För att en valp ska få ett danskt registreringsbevis krävs det att dess föräldrar uppfyller avelsrestriktionerna för den gällande rasen (Dansk Kennel Klub 2008b).

DKK's avelsrestriktioner för labradorer inkluderar höftledsdysplasi sedan 1 januari 2004, armbågsledsdysplasi sedan 1 januari 2009, progressiv retinal atrofi (PRA) sedan 1 januari 1993 samt kryptorchism (von Rosen Vange 2008). Labradorer med höftledsstatus D eller E, på en skala från A till E, får inte användas i avel. Detsamma gäller för labradorer som har fått konstaterat PRA. Ett intyg från en ögonlysning får inte vara mer än tolv månader gammalt vid parningstillfället och undersökningen måste utföras av en veterinär som är ögonspecialist. Ett DNA-test kan sedan 1 juli 2006 ersätta en ögonlysning. För både höftledsdysplasi och PRA gäller att labradorerna måste vara minst 12 månader gamla vid undersökningstillfället. Hanhundar som ska användas i avel måste ha intyg på att de har två normala testiklar på normal plats. Båda föräldrarna ska röntgas och ha en officiell armbågsstatus registrerad (Dansk Kennel Klub 2008c).

Urval ur DKK's etiska rekommendationer för uppfödning:

- Den som väljer en hund till avel, påtar sig ansvaret att värdera om avelsdjuret är fysiskt och mentalt lämpat till detta.
- Hundar med ärftliga defekter bör inte användas i avel. Parningar som har resulterat i valpar med allvarliga defekter, bör inte upprepas.
- Uppfödaren bör ge valpköparna fullständiga upplysningar om föräldrardjuren.
- Både uppfödare och hanhundsägare bör följa valparnas utveckling till vuxna hundar och löpande utvärdera deras avelsdjur (Dansk Kennel Klub 2006).

DKK's hållning är att uppfödare:

- bör skaffa sig kunskap om eventuella ärftliga sjukdomar inom rasen
- bör undvika att använda ett djur i avel, som är belastat med någon form av sjukdom
- bör prioritera hälsa framför andra egenskaper
- inte ska blunda för eller bortförklara svagheter och brister i uppfödningen (Dansk Kennel Klub 2008a).

References

Dansk Kennel Klub (2006): *Etiske anbefalinger*, [online]. [Access Date: 2008-10-02]. Last update: 2006. Availability: <http://dansk-kennel-klub.dk/500>.

Dansk Kennel Klub (2008a): *Hundenes fysiske sundhed*, [online]. [Access Date: 2008-10-02a]. Last update: 2008a. Availability: <http://dansk-kennel-klub.dk/498>.

Dansk Kennel Klub (2008b): *Hvad er en Avl/sundheds restriktion*, [online]. [Access Date: 2008-09-10b]. Last update: 2008b. Availability: <http://www.dansk-kennel-klub.dk/824>.

Dansk Kennel Klub (2008c): *Labrador retriever*, [online]. [Access Date: 2008-10-08c]. Last update: 2008c. Availability: <http://dansk-kennel-klub.dk/0/553>.

von Rosen Vange, P. (2008-10-08): Personal Communication.