



**DET BIOVIDENSKABELIGE FAKULTET**  
FOR FØDEVARER, VETERINÆRMEDICIN OG NATURRESSOURCER  
KØBENHAVNS UNIVERSITET

**Veterinært speciale (27 ECTS-point)**

**Gry Rauff Mikkelsen V9313**

*Exercise-Induced Collapse*  
*hos*  
*Labrador Retriever*



(Taylor *et al.* 2009)

**Vejleder: Merete Fredholm, Professor**

**Institut for Basal Husdyr- og**

**Veterinærvidenskab/Genetik og Bioinformatik**

**Afleveret den: 28/01/10**



## Forord

Dette speciale er skrevet i fagområdet genetik på Institut for Basal Husdyr- og Veterinærvidenskab, Genetik og Bioinformatik på det Biovidenskabelige Fakultet for Fødevarer, Veterinærmedicin og Naturressourcer, Københavns Universitet, i perioden fra 01.10.2009 til den 28.01.2010.

Formålet med specialet var at bestemme den genetiske status for motions-induceret kollaps (exercise-induced collapse eller EIC) hos 122 labrador retrievere samt at undersøge udbredelsen af EIC i et udsnit af den danske population af labrador retrievere. Afhængig af udbredelsens omfang kunne herefter tages stilling til, hvorvidt der skal være avlsrestriktioner ved brug af genetiske test. Desuden ønskes at give læserne et indblik i syndromet EIC både på molekylært og klinisk niveau.

Målgruppen for dette projekt er alle med interesse for EIC hos labrador retriever og bekæmpelse af EIC hos denne race.

En tak skal lyde til Dansk Kennel Klub for økonomisk bistand. Tak til dyrlæge Jens Erik Sønderup for indsamling af blodprøver fra labrador retrievere. En stor tak til Minna Jakobsen, og det øvrige personale for venlig og tålmodig assistance ved laboratoriearbejdet. Jeg ønsker også at takke stud.med.vet Siff Jensen, stud.psyk. Janne Hellerup Nielsen og stud.med. Michael Martinez for gode råd og gennemlæsning af specialet.

Sidst, men ikke mindst, ønsker jeg at rette en stor tak til Professor dr.med.vet Merete Fredholm, for fantastisk vejledning, støtte og engagement gennem hele processen. Det har betydet meget for mig.

København, d. 28. januar 2009

Gry Rauff Mikkelsen



## Sammendrag

Labrador retrievere er den mest udbredte hunderace i verden. I 2008 fandt Patterson et al. at exercise-induced collapse (EIC) er et udbredt problem hos raske yngre voksne labrador retrievere i USA. Årsagen er en mutation i dynamin 1 (*DNMI*) lokaliseret på kromosom 9 resulterende i en aminosyreænding fra arginine til leucine i codon 256. Dynamin 1 har en essentiel rolle i endocytose, hvor det optimerer den morfologiske adaptation af det synaptiske maskineri ved høj intensitet medieret af det calcium-calmodulin afhængige protein phosphatase calcineurin. Labrador retrievere homozygote for mutationen vil derfor ved intensiv motionering udvise muskelsvaghed, ukoordinerede bevægelsesmønstre og kollaps i værste tilfælde med fatal udgang.

I dette speciale er 122 blodprøver fra labrador retrievere indsendt fra Dansk Kennel Klub blevet undersøgt for mutationen. Deoxyribonukleinsyre (DNA) fra blodprøverne blev oprenset vha. saltfældningsmetoden over to dage og amplificeret ved brug af polymerasekædereaktion (PCR). Resultatet heraf var et PCR produkt bestående af 337 basepar (bp). Ved tilsættelse af restriktionsenzymet *Sma*II, blev T676T allelen (muterede) skåret i to fragmenter af str. 165 bp og 172 bp., mens G767G allelen (normal) forblev intakt. Denne forskel i fragmenternes længde blev visualiseret ved brug af gelelektroforese og undersøgelsen viste følgende fordeling i Danmark: afficerede = 5,9 %, raske = 57,3 % og raske anlægsgæberer = 36,8 %.

EIC er et udbredt problem i den danske population af labrador retrievere, og ydermere har det fra et studie af Taylor et al. 2008 vist sig at have alvorlige konsekvenser for både hund og ejer. Derfor anbefales, at man vha. genetiske test udelukker homozygote med allelen T676T fra avl og tillader parring mellem heterozygot og rask for på sigt at fjerne *DNMI* mutationen i populationen af danske labrador retrievere.



## Abstract

Labrador retrievers are the most common dog breed in the World. In 2008 Patterson et al. have shown exercise-induced collapse (EIC) to be a common problem in young adult Labrador retrievers. The reason is a mutation in dynamin 1 (*DNM1*) at chromosome 9 causing a conversion of the amino acid arginine to leucine at codon 256. Dynamin 1 has an essential role in endocytosis, where it is dedicated to optimize plastic adaptation of the synaptic vesicle recycling machinery to high levels of activity mediated by the calcium- and calmodulin-dependent protein phosphatase calcineurin. Therefore Labrador retrievers homozygous for the mutation develop muscle weakness, incoordination and life-threatening collapse after intense exercise.

In the present project 122 blood samples collected by Danish Kennel Club have been screened for the mutation. Deoxyribonucleic acid (DNA) from the blood samples was extracted and purified using a salting-out method lasting two days and amplified using Polymerase chain reaction (PCR). The result from this was a PCR product consisting of 337 bp. Adding the restriction endonuclease *Sma*II, the T676T allele (the mutated allele) was digested into fragments at size 165 bp and 172 bp while the G767G (the normal allele) remained intact. This distinction in the length of the fragments was visualized using gel electrophoresis and the result of the screening was as follows: affected = 5,9 %, healthy = 57,3 % and healthy carrier = 36,8 %.

Thus EIC is a widespread problem in the Danish population of Labrador retrievers and furthermore a study by Taylor et al. 2008 has revealed that it is resulting in severe consequences for owner as well as dog. It is therefore recommended to use genetic testing to exclude dogs homozygous for the T676T allele and allow mating between heterozygous and healthy dogs to eventually remove the *DNM1* mutation in the population of Danish Labrador retrievers.



## Ordlister

<b>ADBE:</b>	Aktivits-afhængig "bulk" endocytose
<b>AChR:</b>	Acetylcholine receptor
<b>AP2:</b>	Phospholipid-bindende heterotetramerisk adaptor protein complex 2
<b>ATP:</b>	Adenosintriphosphat
<b>BAR:</b>	N-terminal bin-ampiohysin-RVS
<b>Bp:</b>	basepar
<b>Bpm:</b>	Beat per minute
<b>CBC:</b>	Complete blood count
<b>CDK<sub>5</sub>:</b>	Cyklisk-afhængig kinases 5
<b>CK:</b>	Kreatin kinase
<b>CME:</b>	Clathrin-medieret endocytose
<b>DB:</b>	Dense body
<b>DNA:</b>	Deoxyribonukleinsyre
<b>DNM1:</b>	Dynamin 1
<b>EIC:</b>	Exercise-induced collapse
<b>EM:</b>	Elektronmikroskop
<b>GED:</b>	GTPase effektor domænet
<b>GTPase:</b>	N-terminal "RAS-like GTPase superfamily" domænet
<b>G767:</b>	Normal allel med guanine på position 767
<b>G767/G767:</b>	Homozygote, der ikke er anlægsbærer.
<b>G767/T767:</b>	Hetereozygote, raske anlægsbærer
<b>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>:</b>	Bikarbonate
<b>KO:</b>	Knockout mus
<b>N-WASP:</b>	Det neuronale Wiskott-Aldrich syndrome protein.
<b>M:</b>	Mitokondrie
<b>OD:</b>	Optisk densitet
<b>PaCO<sub>2</sub>:</b>	Partial tryk kuldioxid i blod
<b>PaO<sub>2</sub>:</b>	Partial tryk oxygen i blod
<b>PCR:</b>	Polymerasekædereaktion
<b>PH:</b>	Pleckstin homolog domænet
<b>PIP<sub>2</sub>:</b>	Phosphatidylinositol 4,5-bifosfat
<b>PRD:</b>	Proline rigt domænet
<b>RYR1:</b>	Malign hyperthermia ryanodine receptor mutation på kromosom 1
<b>SNP:</b>	Enkeltnukleotidpolymorfi
<b>Shi:</b>	<i>Shibire</i>
<b>SH3:</b>	Src-homolog 3 domænet
<b>SV:</b>	Synapsisk vesikel
<b>T767:</b>	Muteret allel med thymin på position 767
<b>T767/T767:</b>	Homozygote, afficerede hunde



# Inholdsfortegnelse

<b>1 Indledning</b> .....	1
1.1 Problemformulering.....	2
1.2 Metode.....	2
<b>2 Exercise-induced collapse</b> .....	3
2.1 Udløsende årsager og kliniske tegn ved EIC .....	3
2.2 Laboratorie værdier.....	4
2.3 Diagnose.....	5
2.4 Behandling.....	7
<b>3. Dynamin 1</b> .....	8
3.1 Opbygning.....	8
3.2 Funktion.....	9
3.3 Endocytose.....	10
<b>4. EIC &amp; dynamin</b> .....	16
4.1 Identifikation af EIC genet.....	16
4.2 EIC og dynamin.....	16
<b>5 Eksperimentelt arbejde og resultater</b> .....	18
5.1 Formål.....	18
5.2 Datamateriale.....	18
5.21 Stikprøvestørrelse.....	18
5.3 Eksperimentelt arbejde.....	19
5.31 DNA-ekstraktion.....	19
5.32 Touchdown PCR.....	19
5.33 Skæring og gelelektroforese.....	20
5.4 Resultater.....	21
<b>6 Diskussion</b> .....	23



<b>7 Konklusion</b> .....	25
<b>8 Perspektivering</b> .....	26
<b>9 Litteraturliste</b> .....	27

## **Bilag**



## 1 Indledning

Labrador retrievere er den mest avlede hunde race i verden (Patterson *et al.* 2008). I 1993 blev der for første gang beskrevet et syndrom af motions intolerance og kollaps i unge labrador retrievere (Shelton 1993). For nyligt har det vist sig at være et udbredt problem hos raske yngre voksne labrador retrievere i USA. Her har syndromet fået navnet exercise-induced collapse (EIC), karakteriseret ved muskelsvaghed, ukoordinerede bevægelsesmønstre, kollaps i værste tilfælde med fatal udgang, alt sammen udløst af intensiv motionering (Moore 2003; Taylor 2002; Taylor 2000; Taylor *et al.* 2009; Taylor *et al.* 2008; Tilley & Smith 2008).

Tidligere har man stillet diagnosen exercise-induced collapse ud fra eliminering af andre årsager, der kan forårsage intolerance eller kollaps (Taylor *et al.* 2008). Man har nu med stor statistisk signifikans identificeret en enkelt nukleotid mutation i dynamin 1 genet på kromosom 9, på position 767, hvor basen guanin udskiftedes med thymin resulterende i en aminosyreændring fra arginine til leucine i codon 256, hvilket synes at være årsagen til EIC (Patterson *et al.* 2008). Det underbygges af dynamin 1's essentielle rolle i neurotransmission via endocytose (Clayton *et al.* 2009; Clayton & Cousin 2009; Ferguson *et al.* 2007; Liu *et al.* 2006; Marks *et al.* 2001).

EIC har vist sig at være et problem resulterende i f.eks. sterilisering, restriktiv træning, aflivning og kollaps med døden til følge (Taylor *et al.* 2008). I den forbindelse synes det at være af stor relevans at undersøge udbredelsen af EIC i Danmark, for på den måde at kunne tage stilling til eventuelle avlsrestriktioner.





## 1.1 Problemformulering

Exercise-induced collapse hos labrador har for nyligt vist sig at være et udbredt problem hos labrador retriever i USA (Patterson *et al.* 2008). I den forbindelse synes det at være relevant og spændende eksperimentelt at bestemme den genetiske status for EIC hos 122 labrador retrievere vha. 122 tilgængelige blodprøver samt at undersøge udbredelsen af EIC i et udsnit af den danske population af labrador retrievere. Afhængig af udbredelsens omfang kan herefter tages stilling til, hvorvidt der skal være avlsrestriktioner ved brug af genetiske test. Desuden ønsker jeg at belyse syndromet EIC på både molekylært og klinisk niveau ud fra et litteraturstudie.

## 1.2 Metode

Specialet består af en teoretisk del og en praktisk del. Den teoretiske del bygger på et litteraturstudie af syndromet EIC belysende både det molekylære og kliniske ud fra hovedsageligt primærkilder, men også enkelte lærebøger og reviews anvendes. Den praktiske del omfatter bestemmelse af 122 hundes EIC genetiske status. I den forbindelse analyseres deoxyribonukleinsyre (DNA), oprenset fra blodprøver, indsendt af Dansk Kennel Klub. Ved brug af Polymerasekædereaktion (PCR) med specialdesignede primere efterfulgt af skæring med restriktionsenzym er det muligt at påvise, om mutationen i dynamin 1 R256L er tilstede via gelelektroforese. Som positiv kontrol anvendes DNA fra en labrador retriever, der er diagnosticeret "EIC-afficeret" vha. en gentest udført ved "Veterinary Diagnostic Laboratory College of Veterinary Medicine", Minnesota, USA.



## 2 Exercise-induced collapse

Syndromet exercise-induced collapse (EIC) er en almindelig årsag til motionsintolerance hos raske yngre voksne labrador retrievere (Moore 2003; Taylor 2002; Taylor 2000; Taylor *et al.* 2009; Taylor *et al.* 2008; Tilley & Smith 2008).

### 2.1 Udløsende årsager og kliniske tegn ved EIC

Labrador retrievere afficeret med EIC kan klare mild til moderat motion men vil ved kontinuerlig intens aktivitet ledsaget af et højt spændingsniveau blive ataktiske og kollapse efter 5-15 min. Udløsende faktorer er især aktiviteter, der virker ophidsende på hunden, og kan være hundetræning med apportering, konkurrence med andre hunde og fuglejagt. Desuden synes varme fugtige omgivelser at øge sandsynligheden for kollaps, men er ikke en nødvendighed for at kollapse indtræffer (Taylor *et al.* 2008).

De tidligste tegn på kollaps er en unaturlig ukoordineret gyngende gang med en bredsporet stilling i bagpartiet. Stoppes hunden ikke, kan det progredierte til en ikke smertefuld parese med kontroltab i bagpartiet og balanceproblemer. Hunden vil løbe med slæbende bagben, vakle og falde til siderne. Ofte er det kun bagpartiet, der er påvirket, men det kan progredierte til alle fire ben. Hunden kan falde og blive liggende med nedsat muskeltonus i bagbenene, manglende patellarrefleks og øget extensortonus i forbenene. Hele episoden varer 5-10 min og efter 30 min er der ofte komplet reetablering, dog kan det i værste tilfælde ende fatalt. I de fleste tilfælde er hunden mentalt velfungerende (Taylor *et al.* 2009; Taylor *et al.* 2008).



**Figur 1.** Labrador retriever afficeret med EIC. Hunden har sammenkrøblet benstilling i bagpartiet umiddelbart efter 10 minutters hård motion (Taylor *et al.* 2009).



## 2.2 Laboratorie værdier

Når labrador retrievere udføre en aktivitet, må musklerne arbejde. Det kræver adenosintriphosphat (ATP), som dannes via anaerob og/eller aerob nedbrydning af glucose og fedt (Silverthorn *et al.* 2004). Ved intensiv motionering vil oxygenforsyningerne ikke tilsvare musklernes oxygenforbrug, og den anaerobe metabolisme vil derfor dominere. Den anaerobe metabolisme resulterer i dannelse af laktat og hydrogenioner, der bufferes af bikarbonat, hemoglobin og andre intracellulære buffere. Overstiger syreproduktionen buffersystemet kapacitet, vil der ses en metabolisk acidose. Desuden konverteres en del af energien til varme (Cunningham 2002).

Metabolisk acidose, forhøjet kropstemperatur og øget oxygenforbrug resulterer i alveolær hyperventilation, som kan lede til hypocapnia og dermed øget blod pH, en respiratorisk alkalose (Cunningham 2002; Silverthorn *et al.* 2004). Respiratorisk alkalose er associeret med mindre ændringer i elektrolytkoncentrationer. Natrium, kalium og fosfat reduceres som følge af øget cellulært optag, og der ses en reduktion af ioniseret calcium, da fraktionen af proteinbundet calcium øges. Serumchloridkoncentrationerne er normale til let forøgede (Lambert-Drwiega & Byrd Jr 2009). Efter træning vil der derfor i labrador retrievere ses signifikante ændringer i temperatur, syre-base sammensætning og blod-gas spændingen, se tabel 1.

Værdier umiddelbart efter motion

Variabel	Reference hunde i hvile	Raske (n=14 hunde)	EIC (n=14 hunde)	EIC/COLL (n=10 hunde)
Temperatur	37,5°-39,2° C	41,8±0,3	41,8±0,5	42,0±0,03
Hunde >42° C		7	9	9
Puls	60-160 bpm	150±21	169±33	182±26*
PH	7,36-7,46	7,580±0,081	7,578±0,086	7,593±0,079
PaO <sub>2</sub>	85-105 mm Hg	140,3±17,8	116,5±13,3*	120,1±9,4♦
PaCO <sub>2</sub>	30-44 mm Hg	14,7±4,9	12,8±5,5	10,4±2,0♦
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	20-25 mm Hg	13,1±3,2	11,5±3,2	10,4±2,5
CK	0-300 µ/L	143±62	413±367♦	328±289
Glucose	3,3-5,6 mmol/L	6,0±1,7	7,1±1,4	7,6±1,2*

**Tabel 1.** Middelværdier ± standard spredning for variabler målt efter 10 minutters hård motion i henholdsvis 14 normale labrador retrievere, 14 labrador retrievere med EIC (EIC) og 10 labrador retrievere udvisende gang-abnormaliteter som følge af EIC (EIC/COLL). (PaO<sub>2</sub>= partial tryk oxygen, PaCO<sub>2</sub>=partial tryk kuldioxid, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>=bikarbonat, CK= kreatin kinase). \* signifikant forskel fra værdien i normale labrador retrievere, ♦signifikant forskel i værdien fra normale labrador retrievere antaget uens variation (Matwchuk *et al.* 1999; Taylor *et al.* 2009).

Som det fremgår af tabel 1 fra forsøg med både raske og afficerede labrador retrievere, ses der hos de afficerede hunde efter træning statistisk signifikant forskel fra de raske ved følgende 4 variabler: øget mængde kreatin kinase (CK), hyperglykæmi, hyperoksi og hypocapnia. Alle de andre værdier er ikke signifikant forskellige. I forsøget findes koncentrationen af laktat, pyruvat, laktat/pyruvat og total, fri og esterificeret karnitine i plasma samt biopsi af vastus lateralis normale, koncentrationen af fri og total mængde karnitine i musklerne formindskede og urinudskillelse af total, fri og esterificeret karnitine forøgede. (Taylor *et al.* 2009).



## 2.3 Diagnose

Motionsintolerance eller kollaps i labrador retrievere kan skyldes alt fra orthopædisk, kardiovaskulær, pulmonal, metabolisk (systemisk eller primær muskulær) og endokrin, til neuromuskulær sygdom (Shelton 1993; Taylor 2002). For nylig har det endvidere vist sig i raske, yngre voksne labrador retrievere. Her har syndromet fået navnet EIC (Moore 2003; Taylor 2002; Taylor 2000; Taylor *et al.* 2009; Taylor *et al.* 2008; Tilley & Smith 2008).

Tidligere har man stillet diagnosen EIC ud fra eliminering af andre årsager, der kan forårsage intolerance eller kollaps (Taylor *et al.* 2008). For at eliminere de andre årsager udføres følgende undersøgelser:

- Grundig klinisk undersøgelse (inkluderende orthopædisk og neurologisk undersøgelse)
- Røntgenbillede
- Vurdering af den kardiovaskulære- og pulmonale funktion
- Complete blood count (CBC)
- Biokemisk blod profil (natrium, kalium, calcium, fosfat, urea, kreatinin, bilirubin, CK, alkalisk fosfatase, albumin, total protein, glukose, laktat og pyruvat)
- Muskelbiopsi
- Screening af det endokrine system (kortisol, thyroxine)
- Acetylcholine receptor (AChR) antistof-titer
- Karnitine koncentration i plasma, urin og muskel.
- Eliminering af malign hyperthermi ved testning for mutationen V547A ryanodine receptor (RYR1) på kromosom 1 (Shelton 1993; Taylor *et al.* 2009).

Hunde afficeret med EIC findes indenfor normalen ved klinisk og metabolisk evaluering på nær ved følgende variabler: øget mængde CK, hyperglykæmi, hyperoksi, hypocapnia, nedsat koncentrationen af fri og total mængde karnitine i musklerne samt øget urinudskillelse af total, fri og esterificeret karnitine (Taylor *et al.* 2009).

- Øget mængde CK i plasma indikerer cellehenfald (nekrose, infarkt) i skeletmuskulatur eller hjerte. Enzymet CK findes i høj koncentration i skeletmuskulatur og hjerte, hvor det katalyserer spaltningen af kreatinphosphat i forbindelse med energiproduktion og vil ved henfald frigives til plasma (Kjærsgaard *et al.* 2005). Forhøjet CK i plasma hos EIC hunde er ikke i nærheden af det, der er karakteristisk ved dystrofisk myopati, akut myonekrose sekundært til rhabdomyolyse, malign hyperthermi eller hedeslag. Dog kan det ikke udelukkes, at der efter motion hos EIC hunde ses en grad af muskelskade på trods af



manglende fund ved muskelbiopsi (Bjotredt *et al.* 1983; Breitschwerdt *et al.* 1992; Bruchim *et al.* 2006; Kirmayer *et al.* 1984; Shelton & Engvall 2002; Steiss *et al.* 2004; Taylor *et al.* 2009).

- Hyperglykæmi ses hos både de raske og afficerede hunde, da alle middelværdier er over referenceintervallet 7,22mmol/L. Faste-glucose koncentrationen skal overstige 11.1 mmol/l, før der ses kliniske tegn. Det tyder derfor på, at præanalytiske faktorer såsom ophidselse, stress, vanskelig blodprøvetagning, forkert fasteperiode, fodring i tiden op til prøvetagning, mv. kan tænkes at spille ind som generelle konfoundere (Nelson & Couto 2003).
- Hyperoksi ses i alle hundene efter motion dog mindst i hundene med EIC. Hyperoksi er et resultat af hyperventilation (Silverthorn *et al.* 2004).
- Hypocapnia kan forårsage cerebral vasokonstriktion, og dermed reduktion i det cerebrale blodflow resulterende i symptomer som svimmelhed, mental forvirring, synkope og slagtilfælde. (Artru 1987; Artru *et al.* 1989; Lambert-Drwiega & Byrd Jr 2009; Oliver & Greene 1983). Det cerebrale blodflow reduceres yderligere af katekolaminerne og varmen, som genereres ved motion (Rasmussen *et al.* 2006). Desuden kan ekstrem hyperventilation ændre det somatosensorisk signal fra benene resulterende i balancetab samt sænkelse af tærskelværdien for slagtilfælde (Guaranha *et al.* 2005; Sakellari *et al.* 1997).
- Den formindskede koncentration af fri og total mængde karnitine i musklerne og den forøgede urinudskillelse af total, fri og esterificeret karnitine er fundet som uspecifikke resultater ved en bred række af muskulære og neuromuskulære forstyrrelser (Shelton *et al.* 1998).

Kort sagt er der ud fra den kliniske og metaboliske undersøgelse af hunde med EIC ikke fundet en konklusiv årsag til kollapsene. Desuden er der i et forsøg med 13 raske labrador retrievere fundet midlertidig manglende evne til at genvinde balancen efter motion, lignende den observeret i hunde afficeret med EIC (Ferasin & Marcora 2009). Denne anstrengelsesudmattelse kan tillægges flere årsager. Perifer muskeludmattelse, som følge af motionsinducerede forandringer i muskelaktionspotentialer, koncentrationen af ekstracellulære og intracellulære ioner, især calcium samt intracellulære metabolitter (Allen *et al.* 2008). Central muskeludmattelse som følge af ændringer i hjernens metabolisme og neurotransmittere resulterende i forandringer på det spinale og supraspinale niveau eller inhibitorisk afferent feedback fra type 3 og 4 muskler (Gandevia 2001). Ydermere er det muligt, at det øgede pulmonære blodflow og kapillære tryk ved motion aktiverer de pulmonære C fibre udløsende en somatomotor reflex resulterende i en beskyttende hæmning af benmusklerne (Gandevia *et al.* 2000).



I 2008 har Patterson et al. med stort statistisk signifikans identificeret en enkelt nukleotid mutation i dynamine 1 genet på kromosom 9, der synes at være årsagen til EIC. Her fandt man på position 767 en mutation, hvor basen guanin udskiftedes med thymin, resulterende i en aminosyreændring fra arginine til leucine i codon 256 (Patterson *et al.* 2008).

## 2.4 Behandling

Da den præcise årsag til EIC har været usikker, har man forsøgt med forskellige behandlinger. Den mest effektive behandling er at undgå intensiv motion i konjugation med ekstrem ophidselse samt at afslutte træning ved det første tegn på ubalance. Desuden har nogle ejere rapporteret et fald i frekvensen af anfald ved afficerede hunde fodret med en diæt med et højt fedtindhold samt ved hanhunde, der er blevet kastrerede (Taylor 2007; Taylor *et al.* 2008; Tilley & Smith 2008).

Medicinsk har man behandlet hunde afficeret med EIC, med forskellige medikamenter, ingen af dem har vist sig 100 % effektive i alle hunde (Taylor 2007):

Oral supplement af karnitine (50mg/kg 2·/dag), CoEnzyme Q10 (100mg/dag) og riboflavin (100mg/dag), en standardblanding til metaboliske myopathier/neuropathier. karnitine findes i høj koncentration i muskler og hjerne, hvor det er nødvendigt til at transportere fede syrer ind i mitokondrierne til dannelse af energi.

7-KETO (100 mg 2·/dag). 7-KETO er et nedbrydningsprodukt af hormonet dehydro-epiandrosterone, et stereoid der produceres i binyren og hjernen. Effekten af 7-KETO er ukendt.

Phentobarbital (2 mg/kg 2·/dag). Den aktuelle mekanisme for phentobarbital i hunde afficeret med EIC er ukendt, men det synes at nedsætte niveauet af ophidselse i hundene.(Taylor 2007; Taylor *et al.* 2008; Tilley & Smith 2008).



## 3. Dynamin 1

### 3.1 Opbygning

Genet der koder for dynamin 1 hos hund (*DNM1*) er lokaliseret på kromosom 9 i området 58.599.318-58.642.207 basepar (bp). DNA'et indeholder 9028 bp inkluderende 24 exons. Ved transskription og efterfølgende translation dannes proteinproduktet dynamin1 på 864 aminosyre (Patterson *et al.* 2008).

Dynamin 1 består af følgende 4 domæner:

#### 1. N-terminal "RAS-like GTPase superfamily"(GTPase) domæne, placering:6 – 245

"The Ras-like superfamily" af små GTPaser består af min 4 familier i eukaryoter med meget stor lighed i struktur og funktion. Derudover indeholder den også proteiner som GTP translationsfaktorer, Era-lignende GTPaser, og G-alpha kæder af heterotrimeriske G proteiner. "The Ras-like superfamily" regulerer cellulære funktioner såsom: geneekspression, cytoskelet reorganisering, vesikulær trafik, nukleocytoplasmatisk transport og mikrotubulær organisering. Medlemmer af "the Ras-like superfamily" genkendes på GTP bindingsstedet, som er dannet af 5 karakteristiske motiver samt de 2 specifikke DNA sekvenser, såkaldte "*switch regioner*", switch I and switch II (Hinshaw 2000; NCBI 2009; Smirnova *et al.* 1999).

#### 2. Dynamin centralregionen, location:216 – 509

Dynamin centralregionen fungerer som et essentielt oligomerisationsdomæne i dynamins selvsamlingsproces (Hinshaw 2000; NCBI 2009; Ramachandran *et al.* 2007; Smirnova *et al.* 1999)

#### 3. Dynamin pleckstrin homolog (PH) domænet, placering:520 – 629

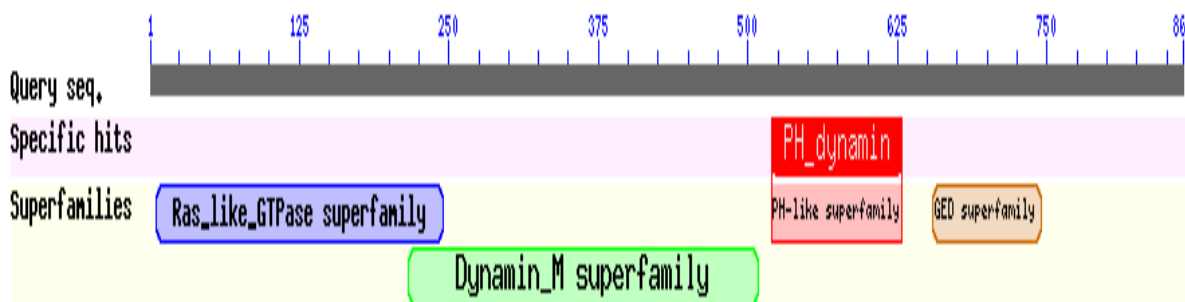
"Pleckstrin homology-like domain" inkluderer flere domæner såsom: PH domænet, det Shc-lignende domæne, det IRS-lignende PTB domæne etc. Alle domænerne har en PH ombøjning og er involveret i at transportere proteiner til den passende cellulære lokalisation og interagere med en bindende partner, som f.eks. inositol fosfat især phosphatidylinositol 4,5-biphospha ( $PIP_2$ ), hvilket muliggør effektivering af dynamins virkning på membranen (Achiriloaie *et al.* 1999; Bethoney *et al.* 2009; Hinshaw 2000; NCBI 2009; Vallis *et al.* 1999).

#### 4. Dynamin GTPase effektor (GED) domænet, placering:654 – 745

Dynamin GTPase effektor domænet er involveret i selvsamling og fungerer som et indre samlende afhængigt GTPase aktiverende protein og et C-terminal proline/arginine (PRD)rigt domæne, som



binder sig til utallige src-homolog 3 (SH3) domæne-indeholdende proteiner, der deltager i endocytose (Hinshaw 2000; Marks *et al.* 2001; NCBI 2009; Smirnova *et al.* 1999; Sweitzer & Hinshaw 1998).

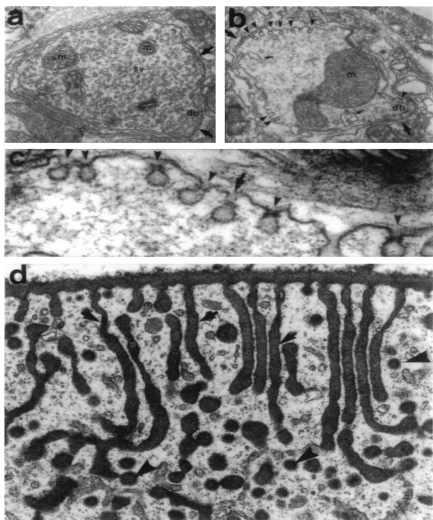


**Figur 2.** Illustration af dynamin. Ras\_like\_GTPase; "Ras-like GTPase superfamily" (GTPase) domænet. Dynamin\_M; Dynamin centralregion. PH\_dynamin; Dynamin pleckstrin homology (PH) domænet. GED; Dynamin GTPase effektor domænet (NCBI 2009).

### 3.2 Funktion

Dynamin 1 er medlem af en stor GTPase superfamilie, der medierer vesikulær trafik. Dynamin 1 kaldes også det neuron-specifikke dynamin, da det nærmest udelukkende ses i centralnervesystemet (Sontag *et al.* 1994; Sweitzer & Hinshaw 1998; Urrutia *et al.* 1997; Vanderblik *et al.* 1993)

Dynamins rolle i endocytose blev opdaget vha. electronmikroskop (EM) af nerveterminalen i *Drosophila* bærende en temperatursensitiv allel af dynamin 1 homologen *shibire (shi)*, afslørende akkumulation af endocytotiske "pits". De fleste af de akkumulerede "pits" på den præsynaptiske membran var omkranset ved deres hals af et enkelt eller dobbelt elektrontæt bånd lignende dynaminringe (Koenig & Ikeda 1989; Kosaka & Ikeda 1983).



**Figur 3.** (Urrutia *et al.* 1997)

Endocytose i neuroner og epitheliale celler hos *Drosophila* mutanten *shi<sup>ts</sup>*.

a) EM af synapse ved 19°C, den fakultative temperatur, hvor der ses mange synaptiske vesikler (SV), mitokondrier (M) samt et præsynaptisk "dense body" (DB).

b) EM af synapse ved 29°C, den restriktive temperatur, her er ingen vesikler men i stedet for mange invaginationer af plasmamembranen. Invaginationerne har en elektrontæt krave omkring halsen men mangler clathrin (pilehoveder).

c) Forstørrelse af (b)

d) EM af *shi<sup>ts</sup>* garland celler 29°C. Her ses ingen elektrontæt krave men i stedet for lange labyrinthlignende kanaler (pile) endende i en clathrin-coated pit (pilehoveder).



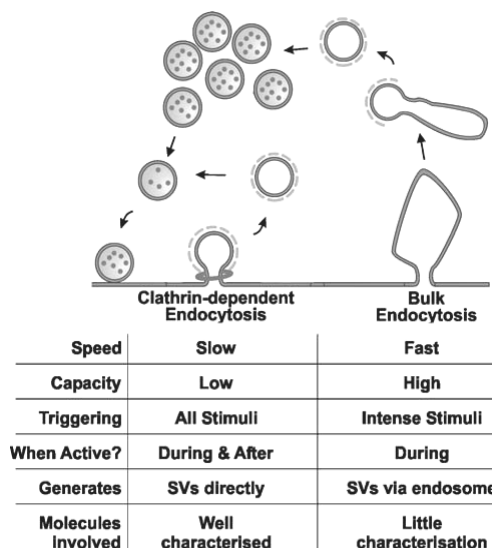


*Drosophila* med mutationen *shi* udviste pga. den reversible blokering af den synaptiske vesikel ”recycling” en hurtig og reversibel paralyse ved den restriktive temperatur (Poodry & Edgar 1979). Tesen om dynamins rolle i endocytosen blev desuden underbygget af studier med dynaminmutanter (Damke *et al.* 1994; Herskovits *et al.* 1993; Vanderbliek *et al.* 1993) samt observation af en *shibire*-lignende blokering af endocytosen i GTP- $\gamma$ S-behandlede synaptosomer (Takei *et al.* 1995). Ydermere er der i et forsøg med dynamin-1 knockout mus (KO) vist at dynamin-1’s rolle i SV endocytose er nødvendig ved høj neuronal aktivitet (Ferguson *et al.* 2007). Modsat er der i et elektrofysisk studie med dynamin-1 KO vist en selektiv forsinkelse af den langsomme endocytose, mens der ikke blev observeret nogen forskel mellem KO og vild-typen ved den hurtige endocytose (Lou *et al.* 2008). En mulig årsag hertil er at dynamin II og/eller dynamin III kompensere for tabet af dynamin 1 under aktivits-afhængig ”bulk” endocytose (ADBE) (Clayton *et al.* 2009; Graham *et al.* 2007).

### 3.3 Endocytose

Dynamin synes at indgå i en clathrin-medieret endocytose (CME) (Baba *et al.* 1999; Damke *et al.* 1994; Herskovits *et al.* 1993; Kosaka & Ikeda 1983; Miaczynska & Stenmark 2008; Sever *et al.* 2000; Takei *et al.* 1995; Vanderbliek *et al.* 1993) og dels en clathrin-uafhængig endocytose (Koenig & Ikeda 1989; Oh *et al.* 1998; Sweitzer & Hinshaw 1998; Vanderbliek *et al.* 1993).

Endocytose er optagelse i en celle via afsnøring af en del af cellemembranen til en vesikel (Andersen *et al.* 1999). Der er mindst tre måder hvormed SV kan dannes. Clathrin-medieret endocytose og kiss-and-run metoden (Edeling *et al.* 2006; Harata *et al.* 2006), som er de dominerende ved stimulering med lav intensitet (Granseth *et al.* 2006; Zhang *et al.* 2009; Zhu *et al.* 2009), samt aktivitets-afhængig ”bulk” endocytose (ADBE), som udløses ved stimulering med høj intensitet se figur 4 (Cousin 2009).

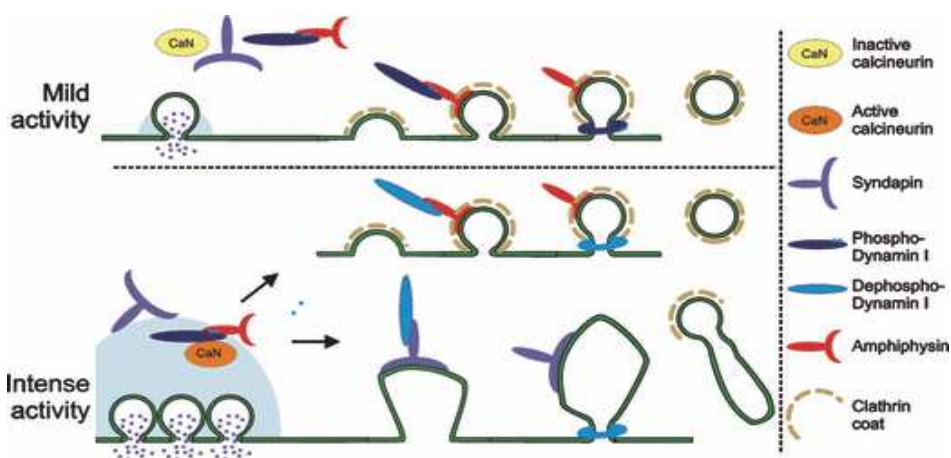


**Figur 4.** Oversigt over ADBE og clathrin-medieret endocytose (Cousin 2009)



Endocytose kan opdeles biokemisk i: samling af coat, rekruttering af receptorer, invaginering af den coatede pit og vesikelbudding (Vanderblik *et al.* 1993). Dynamin 1's rolle i endocytosen er at fungere som et mekanokemisk enzym, der dels er med i de konformationelle forandringer ved vesikeldannelsen samt selve fissionen drevet af GTP hydrolyse (Damke *et al.* 2001; Liu *et al.* 2006; Marks *et al.* 2001; Sever *et al.* 2000; Song *et al.* 2004; Sweitzer & Hinshaw 1998; Takei *et al.* 1995).

Endocytosen startes med et depolariserende calcium-influx (Wu *et al.* 2009). Afhængig af intensiteten af stimuliet påbegyndes enten CME og kiss-and run metoden eller ADBE (Clayton & Cousin 2009; Wu *et al.* 2009; Zhu *et al.* 2009), se figur 5.



Figur 5. Oversigt over de to veje ved endocytosen (Clayton & Cousin 2009).

Ved **lav aktivitet** er det primært CME, der dominerer (Granseth *et al.* 2006).

#### Samling af coat og rekruttering af receptorer

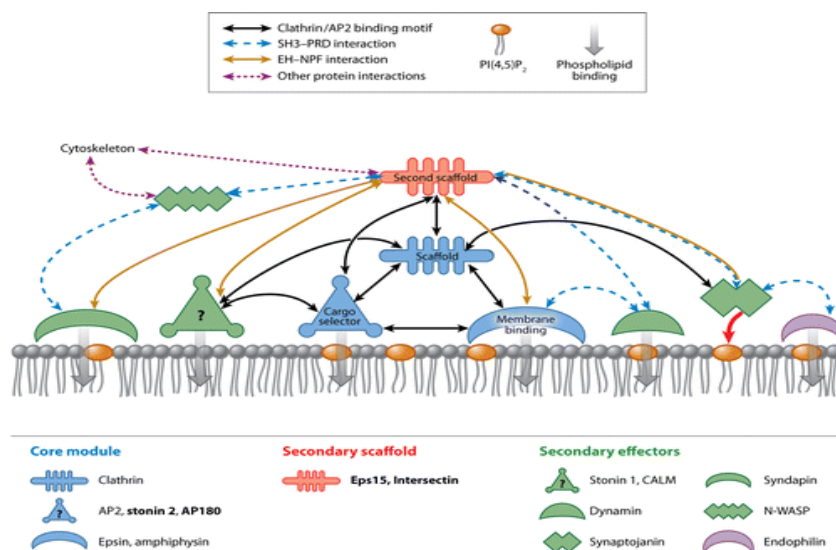
CME's start er endnu ikke helt klarlagt, men størrelsen af calcium-influxet (Wu *et al.* 2009) samt distributionen af phosphatidylinositol 4,5-bifosfat (PIP<sub>2</sub>) synes at spille en vigtig rolle. Distributionen af PIP<sub>2</sub> kan reguleres dels ved rummelig regulering af phosphoinosid-kinase og –phosphatase og dels ved rekruttering samt oligomerisering af phosphoinosid-bindende proteiner resulterende i stabilisering af phosphoinosiderne i membranen (Carlton & Cullen 2005). Endocytiske adaptorproteiner såsom phospholipid-bindende heterotetramerisk adaptor protein complex 2 (AP2), epsin, phospho-dynamin 1, endophilin og amphiphysin genkender PIP<sub>2</sub> og bindes hertil samt til "cargo". Phospho-dynamin 1 bindes til PIP<sub>2</sub> via PH domænet (Achiriloaie *et al.* 1999; Smillie & Cousin 2005; Smirnova *et al.* 1999) samt til N-terminal bin-amphiphysin-RSV (BAR) proteinet amphiphysin SH3 domænet via PRD domænet. (Herskovits *et al.* 1993; Sweitzer &




Hinshaw 2000; Vallis *et al.* 1999). Disse bindinger virker stimulerende på GTPase aktiviteten.(Barylko *et al.* 1998; Herskovits *et al.* 1993; Vallis *et al.* 1999). Desuden bindes clathrin til de endocytiske adaptor proteiner og danner et clathrin-gitter, bestående af trimeriske byggeblokke kaldet triskelia (Edeling *et al.* 2006).

### Invaginering af den coatede pit

Polymerisationen af clathrin og membraninteraktionerne med epsin, endophilin, amphiphysin og dynamin får hurtigt membranen til at begynde invaginationsprocessen, se figur 6 (Dittman & Ryan 2009; Hinshaw & Schmid 1995; Liu *et al.* 2006; Liu *et al.* 2009; Ungewickell & Hinrichsen 2007).



 Dittman J, Ryan TA. 2009. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 25:133–60

**Figur 6.** Oversigt over det synaptiske netværk.

Farvekode "lagdeling": Core module ( blå): det inderste lag, der starter processen og coat-dannelsen. Secondary scaffold (røde): mellemste lag af proteiner virker stabiliserende på det inderste samt rekrutterer effektormolekyler hertil.

Secondary effectors (grønne): det yderste lag der både virker katalyserende og afsluttende for CME. Endophilin (lilla) interagerer med både det inderste lag og det mellemste og har derfor fået en anden farve.

Formkode "virkemekanisme": Stillands (hakkede linier), "cargo-bindere" (trekanter), membranformere (halvmåner), sekundær effektorer (diamander).

Pilekode "interaktioner": se firkantede rubrik øverst på figur. Membraninteraktioner vises med nedadgående pile, og PIP<sub>2</sub> phosphatasen synaptojanin har vist sig at interagere med PIP<sub>2</sub> (*rød pil*) (Dittman & Ryan 2009).

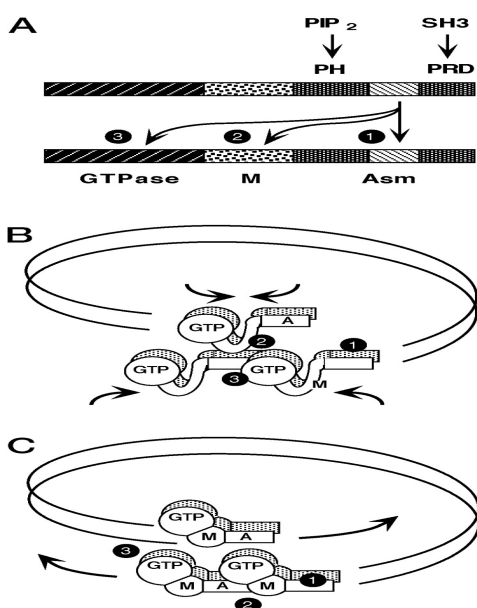
Dynamin, der i starten er fordelt over hele clathringitteret begynder at samle sig, ved at GED bindes til sig selv, til den centrale region og til GTPase domænet.

Disse dynamin-dynamin interaktioner faciliterer ændringer i lipid kompositionen i favør for invaginering samt stimulerer GTPase aktiviteten (Liu *et al.* 2006; Sever *et al.* 2000; Warnock *et al.* 1996). Processen kan dels ske spontant (Hinshaw & Schmid 1995; Takei *et al.* 1995) samt via GTP-binding og resulterer i dannelse af en helical krave omkring halsen af den invaginerede vesikel (Warnock *et al.* 1996).



Den foregår i tre trin:

1. Cytosolisk dynamin danner tetramere ved at samle to dimere.
2. Dynamin oligomere kædes sammen til lange kæder ved plasmamembranen.
3. Efter dynaminspiralen har formet en hel cirkel, kan ringene i cirklen evt. kontakte hinanden i en tredje bindingsinteraktion faciliterende konstriktion (Ramachandran *et al.* 2007; Smirnova *et al.* 1999), se figur 7.



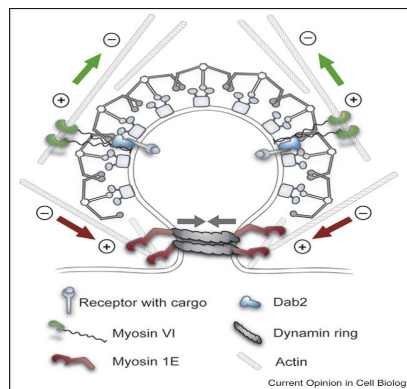
**Figur 7.** Samling af dynamin 1 og begyndende konstriktion. GED(ASM), den centralregion (M). A. Dynamins binding til sig selv. B. Dynamin spiralformet af dynamindimere sat sammen i en kæde, der undergår konformationelle forandringer ledende til konstriktion. C. Dynamindimere sat sammen i en kæde ved at centralregionen af en dimer bindes til GED fra den næste dimer. GTPase domænet kan herefter samle ringene ved at flytte sig mellem de naboliggende GED domæner via energi fra GTPase cyklen (Smirnova *et al.* 1999).

### Vesikelbudding

Konstriktionen synes at være dynaminreguleret med dynamin fungerende som et mekanokemisk enzym, der dels er med i de konformationelle forandringer ved vesikeldannelsen samt selve fissionen drevet af GTP hydrolyse (Bashkirov *et al.* 2008; Damke *et al.* 2001; Liu *et al.* 2006; Marks *et al.* 2001; Ramachandran & Schmid 2008; Sever *et al.* 2000; Sweitzer & Hinshaw 1998; Takei *et al.* 1995). Forsøg har dog vist at dynamin med mutationer der reducerer hastigheden af GTP hydrolyse faktisk øger hastigheden af endocytose (Sever *et al.* 2000), hvilket tyder på at dynamin i stedet for at være et mekano-drevet GTP enzym aktiverer en mediator, såsom aktin (Lee & De Camilli 2002; Merrifield *et al.* 2002) vha. syndapin og det neuronale Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASP). Aktin bindes til clathrin via proteinet HIP1/R og polymeriseres, hvilket skubber den coatede pit væk fra membranen, hvormed halsen strækkes til den brækker af. (Lee & De Camilli 2002; Liu *et al.* 2006; Qualmann *et al.* 2000; Ungewickell & Hinrichsen 2007).



Alternativt har man fundet ud af, at aktin motorproteiner, såsom myosin VI og myosin 1 E, også synes at indgå i processen, ved at myosin 1 E trækker dynamin ringene sammen, mens myosin VI skubber vesiklen ind i cytoplasma, hvormed vesiklen adskilles fra membranen (Ungewickell & Hinrichsen 2007), se figur 8.



**Figur 8.** Vesicle budding (Ungewickell & Hinrichsen 2007).

En anden faktor, der bidrager til invagination og budding er lipid-fase separation. Denne separation stimuleres af lagdelingen og invaginationprocessen (Liu *et al.* 2006), se figur 6. For eksempel har dynamin stor affinitet for anion phospholipider, som den rekrutterer til halsen af den clathrin-coatede pit og på den måde bidrager til ændring i lipidkompositionen til fordel for vesikulation (Bashkirov *et al.* 2008; Sweitzer & Hinshaw 1998; Ungewickell & Hinrichsen 2007).

Det slutter ved at GTP hydrolyse resulterer i opløsning af dynamin1 komplekset (Ramachandran & Schmid 2008; Warnock *et al.* 1996).

Ved **høj aktivitet** er det ADBE, der dominerer. ADBE er karakteriseret ved, at der i stedet for små invaginationer, dannes store invaginationer af plasmamembranen uden brug af clathrin-coat, der resulterer i formationen af endosomer. Herfra kan de SV så afsnøres formentlig via clathrin-medieret endocytose og på den måde forme en ny population af SV (Clayton & Cousin 2009; Richards *et al.* 2000). De molekulære processer under ADBE er ikke veldokumenteret (Clayton & Cousin 2009; Wu *et al.* 2009; Zhu *et al.* 2009). Høj stimulering aktiverer det calcium- og calmodulinafhængige protein phosphatase calcineurin resulterende i dephosphorylering af dynamin 1 samt en aktivering af GTPase funktionen (Hinshaw 2000). Dephosphoryleringen tillader dynamin 1 at binde sig både til syndapin I og amphiphysin. Bindingen til syndapin I indeholdende F-BAR domænet medierer ADBE, ved at F-BAR domænet associerer med membraner med en mere udfladet kurve end B-BAR set ved CME (Anggono *et al.* 2006; Clayton & Cousin 2009; Evans & Cousin 2007). Syndapin I kan desuden også interagere med N-WASP (Kessels & Qualmann 2002). N-WASP rekrutterer herefter arp2/3 komplekset, hvilket medfører en hurtig aktinpolymerisering (Takenawa & Miki 2001). Derfor tyder det ligeledes på at syndapin I også er med til at hverve og koordinere aktins rolle i ADBE (Kessels & Qualmann 2002). Desuden synes calcineurin også at kontrollere synaptojanin phosphatase og på den måde regulere enophilin-synaptojanin interaktionerne samt regulere syntese og metabolisme af PIP<sub>2</sub> ledende til ADBE. Til slut stopper



nervestimuliet og den intracellulære koncentration af calcium falder, hvormed calcineurin inaktiveres. Herved muliggøres cyklisk-afhængig kinases 5 (cdk5)'s rephosphorylering af dynamin 1 ved Ser<sup>774</sup>, Ser<sup>778</sup>, Ser<sup>822</sup>, Ser<sup>851</sup>, Ser<sup>857</sup>, Ser<sup>512</sup> og Ser<sup>347</sup> (Anggono *et al.* 2006; Graham *et al.* 2007) og hæmning af GTPase aktiviteten faciliterende dynamin1's returnering til cytosol, hvor den bliver indtil, den skal bruges igen (Clayton & Cousin 2009; Smillie & Cousin 2005). Aktivering af det calcium- calmodulin afhængige protein phosphatase calcineurin synes altså at spille hovedrollen i ADBE.

Dynamin har derfor både en rolle i endocytosen ved lav og høj intensitetsstimulering, men det er kun ved den høje altså ADBE, at der ses en dephosphorylering af dynamin 1. Rollen er at optimere den morfologiske adaption af det synaptiske maskineri ved høj intensitet dels via konformationelle forandringer og GTP hydrolyse.(Clayton *et al.* 2009; Clayton & Cousin 2009; Ferguson *et al.* 2007; Liu *et al.* 2006; Marks *et al.* 2001).



## 4 EIC og Dynamin

### 4.1 Identifikation af EIC genet

Mutationen ledende til syndromet EIC er først for nyligt detekteret. Patterson et al, 2008 har vha. en scanning af genomet med mikrosatelitter undersøgt for kobling i 6 familier omfattende 96 hunde hvoraf nogle udviste EIC symptomer. Dette har ført til identifikation af et locus på kromosom 9 position 60,4 MB, der med stor sandsynlighed viste kobling til syndromet. Locusets kobling bekræftes herefter af en scanning med CFA9 markører i 8 familier omfattende 252 hunde, hvilket resulterede i en lod score  $>3,3$  og en maximum lod score på 11,4. En efterfølgende haplotype-analyse vha. enkelt nukleotidpolymorfi (SNP) i 310 labrador retrievere reducerede området til en 137 kb haplotype blok fra 58.545-58.953 Mb, hvor dynamin1 genet (*DNMI*) synes at være det mest oplagte kandidatgen. *DNMI* genet bestående af 864 aminosyrer blev herefter sekventeret, og man fandt at en enkelt nukleotid mutation i exon 6 på position 767, hvor basen guanin i de raske hunde ændres til thymin i de afficerede, synes, at være den mest sandsynlige årsag til EIC. Ændringen af guanin til thymin resulterer i en ændring af proteinet arginine i kontrol gruppen til leucine i de afficerede i codon 256 i centralregionen af dynamin 1 proteinet.

Udfra nedarvningsmønstre tyder det på at arvegangen er autosomal recessiv, hvilket indikerer at det kun er de individer, der er homozygote for mutationen, der udviser kliniske tegn. Hertil skal siges, at penetransen ikke har vist sig at være 100 %. Penetransen af den homozygote genotype T676/T676 er  $\approx 80\%$  når labrador retrievere er 4 år. Dog er den kun  $\approx 50\%$  i udstillingshunde og hunde, der bruges som kæledyr (Patterson *et al.* 2008), hvilket gør at det kliniske billede af udbredelsen af mutationen vil være mindre end den aktuelle udbredelse af mutationen påvist ved genetiske test. Årsagerne hertil kan være mange såsom:

- Endocytosens kompleksitet
- Hundenes forskellige miljø (brug, kost, temperatur mm.)
- Den enkelte hunds temperament, der er afgørende for hvor let excitationstadiet nås

### 4.2 EIC og dynamin

Mutationen resulterende i syndromet EIC er lokaliseret i centralregionen af dynamin 1 proteinet. Mutationer i centralregionen har vist sig at ødelægge den tetramere struktur af dynamin 1 (Ramachandran *et al.* 2007) og på den måde hindre selvsamling, som er et vigtigt led i dynamin 1's virke under endocytosen (Bashkirov *et al.* 2008; Damke *et al.* 2001; Liu *et al.* 2006; Marks *et al.* 2001; Ramachandran & Schmid 2008; Sever *et al.* 2000; Sweitzer & Hinshaw 1998; Takei *et al.* 1995).



I et forsøg med *DNMI* KO mus fandt man at musene var normale ved fødsel men døde indenfor 2 uger pga. utrivelighed som følge af nedsat bevægelseskoordination og muskeltonus (Ferguson *et al.* 2007). Der observeredes desuden akkumulering af plasmamembraninvaginationer coated med clathrin samt en forringelse af det SV endocytotiske maskineri ved intensiv stimulation (Ferguson *et al.* 2007), tydende på at dynamin 1's rolle især er at optimere den morfologiske adaptation af det synaptiske maskineri ved høj intensitet via dels konformationelle forandringer og GTP hydrolyse. (Clayton *et al.* 2009; Clayton & Cousin 2009; Ferguson *et al.* 2007; Liu *et al.* 2006; Marks *et al.* 2001). Dette underbygges af teorien om at stor intensitet resulterer i et øget depolariserende calcium-influx (Wu *et al.* 2009), aktiverende det calmodulinafhængige protein phosphatase calcineurin. Calcineurin dephosphorylerer herefter dynamin 1 og aktiverer GTPase aktiviteten (Hinshaw 2000), hvormed dynamin 1 kan bindes til synapin og ADBE påbegyndes (Anggono *et al.* 2006; Clayton & Cousin 2009; Evans & Cousin 2007).

Hunde afficeret med syndromet EIC udviser først kliniske tegn ved intensiv motionering (Taylor *et al.* 2008), hvormed det kliniske billede underbygger tesen om mutationen i dynamin 1 som årsag til syndromet EIC.





## 5. Eksperimentelt arbejde og resultater

I det følgende angives hvilke materialer og metoder, der anvendes i specialets eksperimentelle del. Desuden beskrives stikprøvestørrelsen, blodprøve-udvælgelsen samt forsøgsresultaterne.

### 5.1 Formål

Formålene med det eksperimentelle arbejde er at bestemme hver af de 122 hundes EIC genetiske status samt at undersøge udbredelsen af EIC i et udsnit af den danske population af labrador retrievere for på den måde at kunne tage stilling til, hvorvidt der skal være avlsrestriktioner. Til dette analyseres deoxyribonukleinsyre (DNA) oprenset fra blodprøver, der foretages polymerasekædereaktion (PCR) efterfulgt af skæring med restriktionsenzymmer og til slut gelelektroforese.

### 5.2 Datamateriale

Blodprøverne stammer fra 122 labrador retrievere registreret i Dansk Kennel Klub og er indsamlet af labrador retriever klubben til denne undersøgelse. 17 af de 122 labrador retrievere er i familie med én, der enten er diagnosticeret bærer af EIC, eller er afficeret med EIC.

Blodprøverne er EDTA stabiliseret, og DNA er oprenset vha. metoder beskrevet i bilag 2.

Som positiv kontrol anvendes DNA fra en labrador retriever, der er diagnosticeret ”EIC-afficeret” vha. en gentest udført ved ”Veterinary Diagnostic Laboratory College of Veterinary Medicine”, Minnesota, USA.

#### 5.21 Stikprøvestørrelse

Fra et amerikansk studie med 400 labrador retrievere er det angivet at prævalensen af heterozygote dyr (G767/T767) med DNMI-mutationen er 37 % og prævalensen for homozygote dyr (T767/T767) 3 % (Patterson *et al.* 2008). Disse prævalenser indikerer, at studiet er biased, da prævalensen af heterozygote i forhold til homozygote er i uoverensstemmelse antaget, at populationen er i Hardy-Weinberg ligevægt. Uoverensstemmelsen kan skyldes en underrepræsentation af homozygote dyr blandt de 400 undersøgte. Mulige forklaringer på det lave antal homozygoter er, at hundeejere har været uvillige til at stille afficerede dyr til rådighed, og/eller at en del afficerede hunde er blevet aflivet i den pågældende population, som er en brugshundepopulation. Jeg vælger at estimere allelfrekvenserne og stikprøve under forudsætning at populationen er i Hardy-Weinberg ligevægt (Christensen 2003) velvidende, at allelfrekvensen for de afficerede vil være underestimeret.(bilag 1).



Frekvensen af T767(muteret allel med thymin på position 767) = 0,215

Frekvensen af G767(normal allel med guanin på position 767) = 0,785

Ud fra allelfrekvenserne kan stikprøvestørrelsen  $n$  udregnes med følgende formel:

$$n = (1 - (1 - P)^{1/D}) (N - (D-1) / 2)$$

$P$ , der er sandsynligheden for at observere min. 1 afficeret dyr, sættes til 95 %,  $D$  er antallet af T676-alleler i populationen, antaget mutationen er til stede.  $N$  er det samlede antal alleler i populationen. (Houe H *et al.* 2003).

I bilag 1 fandtes det, at der skulle bruges 13 alleler svarende til 7 labrador retrievere for med 95 % sandsynlighed at kunne detektere mutationen, såfremt den er til stede i populationen med samme frekvens, som i den amerikanske population. Populationen er, i dette tilfælde, hunde registrerede i dansk kennel klub, da det er det bedste estimat for antal labrador retrievere i DK.

### 5.3 Eksperimentelt arbejde

Til de eksperimentelle undersøgelser er anvendt DNA isoleret fra 122 blodprøver. I det følgende beskrives de anvendte metoder.

#### 5.31 DNA-ekstraktion

DNA fra blodprøverne er oprenset vha. saltfældningsmetoden over 2 dage. Første dag startes med at nedbryde cellematerialet vha. en tritonlysebuffer, dernæst kernen vha. af en kernelysebuffer og efterfølgende proteinerne med enzymet protease. Anden dag tilsættes mættet NaCl-opløsning, og efterfølgende fældes DNA'et med isopropanol og opløses i en passende mængde Tris EDTA-buffer, der virker stabiliserende på DNA'et. Tilslut måles den optiske densitet (OD), som et mål for renhed og DNA- mængden, hvorefter prøverne fortyndes til den ønskede koncentration (25 mg/ml). Fremgangsmåden er beskrevet i detaljer i bilag 2.

#### 5.32 Touchdown PCR

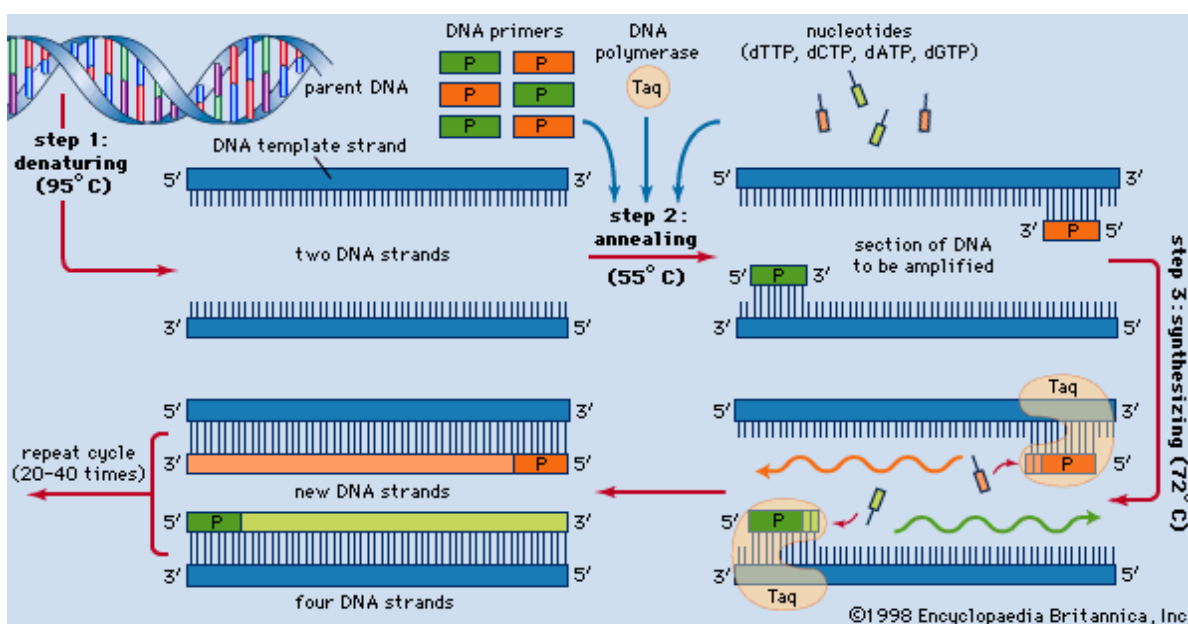
Det oprensede genomiske DNA fortyndes til 25 ng/ $\mu$ l og blandes med en mastermix indeholdende buffer, vand, enzymer og de 2 specifikke oligonucleotide primere:

EIC-Forward: 5`-GTAGGCTCTCCGACCCACTC-3`

EIC-Rerverse: 5`-TGAGGACACTAACCCCTGTTG-3` (Patterson *et al.* 2008)



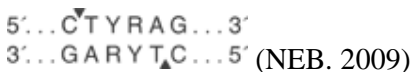
Se bilag 3 for yderligere detaljer. PCR reaktionen opvarmes til 96° C, så DNA'et denaturer. Herefter sænkes temperaturen til 65° C (sænkes med 1° C hver cycle til temperaturen når 60° C) og de to specifikke primere bindes til den enkeltstrengede DNA, EIC-Forward til basesekvensen:(58.627.005-58.626.986 på kromosom 9), EIC-Reverse til basesekvensen: (58.626.689 - 58.626.669 på kromosom 9). Temperaturen hæves til 72° C, hvor DNA strengen syntetiseres vha. Taq polymerasen fra primeren i 3'-retningen. EIC primere amplificerer et fragment på 337 bp omkring *DNMI* G767T mutationen. Der køres 35 cykler, hvorunder mængden af PCR produkt øges logaritmisk for hver cyklus (Hartwall *et al.* 2004; Patterson *et al.* 2008).



Figur 9. Illustration af de forskellige trin i PCR-reaktionen. (Encyclopædia Britannica 1998)

### 5.33 Skæring og gelelektroforese

Det amplificerede PCR produkt på 337 bp tilsættes et mastermix indeholdende Bovine Serum Albumin, NEbuffer 4, MilliQ og enzymet SmlI, se bilag 3 for udspecificering. SmlI er et restriktions enzym, der genkender den specifikke sekvens:



Tilsættes det til T676T allelen, skæres det amplificerede PCR produkt på 337 bp i 2 fragmenter på 165 bp og 172 bp, mens G767G allelen forbliver intakt (Patterson *et al.* 2008).

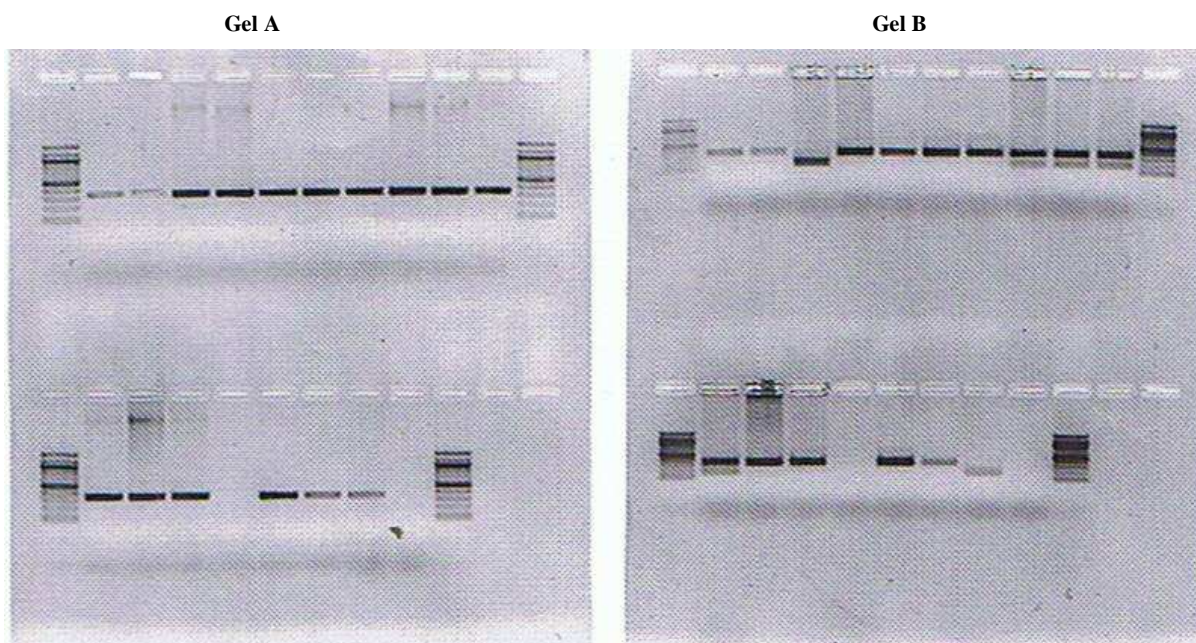
For at adskille de forskellige DNA-fragmenter udføres herefter en gelelektroforese, som er bevægelse af ladede molekyler i et elektrisk ladet felt. Det skårede PCR produkt tilsættes loadingbuffer (5 µl) og loades i brøndene på en ethidiumbromidholdig 2,5 % agarosegel. De yderste



brønne loades med en 100 bp markør, der senere anvendes som målestok til vurdering af fragment str. Gelelektroforesen køres i ca. 25 min ved 120V i en TAE-buffer. Her vandrer de negativt ladede DNA-fragmenter mod den positive pol og jo større de er, des lavere migrationshastighed, da sandsynligheden for at finde en pore at komme igennem vil reduceres med størrelse (Hartwall *et al.* 2004). Endelig overføres gelen til et UV-kammer, og ved belysning med UV-lys visualiseres DNA'et vha. det tilsatte flouroscerende farvestof ethidiumbromid, der binder sig til DNA-strengene. De fremkomne bånd aflæses og fotograferes, hvilket kan ses i figur 10.

## 5.4 Resultater

Efter endt PCR-reaktion, skæring med restriktionsenzym og gelelektroforese, visualiseredes resultatet via affotografering i UV-kammer:



**Figur 10.** Resultat af gelelektroforesen . Begge geler har i alt 24 brønne. Jeg vælger at benævne første øverst i venstre hjørne nr. 1 og så fremdeles indtil nederst højre hjørne, der får nr. 24. Brønd 17, 23 og 24 er uden PCR-produkt.

De to 100 bp størrelsesmarkører i de yderste brønne (1, 12, 13, 22) bruges til at bestemme størrelsen af DNA fragmenterne. Som negativ kontrol anvendes vand (21) til at afsløre evt. DNA-kontamineringer og som positiv kontrol (20) anvendes DNA fra en labrador retriever, der er diagnostiseret "EIC-afficeret" vha. en gentest ved "Veterinary Diagnostic Laboratory College of Veterinary Medicine". Den positive kontrol (20) har et bånd i str. ca 170 bp, svarende til de klippede fragmenter på 165 bp og 172 bp, dvs den har genotypen T676/T676. Bærerne (gel B: 4, 9, 10, 11, 14) har 2 bånd, et i størrelsen 337pb og et i str. ca 170 bp, svarende til de klippede



fragmenter på 165 bp og 172 bp., dvs. den har genotypen G676/T676, mens de raske har et bånd i str. 337 bp, svarende til genotypen G676/G676.

Efter udført gelelektroforese samt aflæsning af resultaterne for de 122 hunde fås følgende fordeling af de 122 hunde:

Genotype	GG (rask)	GT (bærer)	TT (afficeret)
Antal hunde	86	8	28
Antal alleler	172	16	56

**Tabel 2.** Resultat af screeningen

I bilag 1 udregnes allelfrekvenser for screeningen af den danske population af Labrador Retrievere. De totale allelfrekvenser (122 hunde):

$$\text{Frekvensen af T767} = 0,180$$

$$\text{Frekvensen af G767} = 0,820$$

Da flere af de indsamlede blodprøver er fra beslægtede individer, udvælges hunde, der er ubeslægtede for at beregne allelfrekvenser, der er så repræsentative for populationen som muligt.

Allelfrekvenserne blandt 72 hunde, som ikke har fælles forældre:

$$\text{Frekvensen af T767} = 0,271$$

$$\text{Frekvensen af G767} = 0,729$$

Allelfrekvenserne blandt 35 hunde, der ikke har fælles aner til og med bedsteforældre:

$$\text{Frekvensen af T767} = 0,243$$

$$\text{Frekvensen af G767} = 0,757$$

Fra det amerikanske studie med 400 labrador retrievere udregnedes i bilag 1, at der skulle bruges 13 alleler svarende til 7 labrador retrievere for med 95 % sandsynlighed at kunne detektere mutationen såfremt, den er til stede i populationen med samme frekvens i den danske population. Uanset om man udregner allelfrekvenserne baseret på det samlede materiale eller på ubeslægtede hunde i materialet, er allelfrekvenserne i Danmark meget sammenlignelige, med de der er fundet i USA. Dvs. 35 hunde er tilstrækkeligt til at opnå et godt estimat, så det bedste estimat for allelfrekvensen for udbredelsen af mutationen T767G i populationen af danske labrador retrievere er T676 = 0,243.



## 6 Diskussion

EIC har vist sig at være en udbredt årsag til motionsintolerance interfererende med præstationsevnen i raske unge voksne labrador retrievere (Moore 2003; Taylor 2002; Taylor 2000; Taylor 2007; Taylor *et al.* 2008). De kan klare mild til moderat motion, men de vil ved kontinuerlig intens aktivitet ledsaget af et højt spændingsniveau blive ataksiske og kollapse efter 5-15 min. Konsekvensen af at en labrador retriever er afficeret med EIC synes at være primært afhængig af ejerens mål med hunden, idet de ikke er i stand til at fortsætte træning eller konkurrence uden restriktioner. Nogle af hundene lever derfor videre med motions restriktioner, nogle ejere har forsøgt sig med forskellig behandling eller kirurgi såsom phentobabital, sterilisering mm og andre vælger at aflive hunden (Taylor *et al.* 2009; Taylor *et al.* 2008).

For nyligt har man via koblings- og haplotype-association med stor statistisk signifikans identificeret en enkelt nukleotid mutation i dynamine 1 genet på kromosom 9, position 767 hvor basen guanin udskiftedes med thymin resulterende i en aminosyreændring fra arginine til leucine i codon 256, der synes at være årsag til EIC (Patterson *et al.* 2008). Dette underbygges af dynamin 1's virkemekanisme i endocytosen, hvor det synes at optimere den morfologiske adaptation af det synaptiske maskineri ved høj intensitet via dels konformationelle forandringer og GTP hydrolyse (Clayton *et al.* 2009; Clayton & Cousin 2009; Ferguson *et al.* 2007; Liu *et al.* 2006; Marks *et al.* 2001), samt det faktum at der ud fra den kliniske eller metaboliske undersøgelse af hunde med EIC ikke er fundet en konklusiv årsag til kollapsene.

I *Drosophila* med inducerede mutationer i centralregionen og GTPase domænet er der observeret EIC-lignende temperaturafhængig reversibelt tab af motorfunktionen, i værste tilfælde med fatal udgang hvis temperaturen ikke ændres (Poodry & Edgar 1979). I et forsøg med *DNMI* KO mus fandt man at musene var normale ved fødsel men døde indenfor 2 uger pga. utrivelighed som følge af nedsat bevægelseskoordination og muskeltonus (Ferguson *et al.* 2007). EIC synes altså med stor sandsynlighed at skyldes en manglende evne af den homologe mutant leucin i dynamin 1 til at optimere det synaptiske maskineri ved høj intensitet resulterende i reversibel tab af motorfunktionen, hvilket i værste tilfælde kan ende fatalt hvis aktiviteten ikke stoppes (Patterson *et al.* 2008; Taylor *et al.* 2009; Taylor *et al.* 2008).

I et amerikansk studie har Patterson *et al.* 2008 fundet at *DNMI* mutationen er til stede med stor frekvens i labrador retrievere. Efter eksperimentel bestemmelse af den genetiske status for EIC hos



122 labrador retrievere og efterfølgende estimering af allelfrekvenserne i Danmark ( $T767 = 0,243$ ), har vi fundet dem meget sammenlignelige med dem, der er fundet i USA ( $T767 = 0,215$ ). *DNMI* mutationen er derfor også til stede med stor frekvens i Danmark. Da de estimerede allelfrekvenser i Danmark er udregnet ud fra et relativt stort antal ubeslægtede hunde (35 hunde kun nødvendigt med 7, se bilag 1 for uddybelse), må de antages at være meget tæt på den sande populations værdi. I Dansk Kennel Klub vil der derfor være 5,9 % afficerede hunde, 36,8 % anlægsebærere og 57,3% der ikke er anlægsebærere. Ud af de 5,9 % vil alle dog ikke udvise kliniske tegn på EIC, da penetransen ikke har vist sig at være 100 %. Penetransen af den homozygote genotype  $T676/T676$  er  $\approx 80\%$  når labrador retrieverne er 4 år. Dog er den kun  $\approx 50\%$  i udstillingshunde og hunde, der bruges som kæledyr (Patterson *et al.* 2008). Årsagerne hertil kan være mange såsom:

- Endocytosens kompleksitet
- Hundenes forskellige miljø (brug, kost, temperatur mm.)
- Den enkelte hunds temperament, der er afgørende for hvor let excitationstadiet nås

På baggrund af at EIC er et udbredt problem i Danmark med konsekvens for både ejer og hund, er min anbefaling, at man udelukker homozygot afficerede hunde fra avl og kun tillader parring mellem heterozygote og raske (og raske med raske) for på den måde at reducere og på sigt fjerne *DNMI* mutationen i populationen af labrador retrievere i Danmark. Årsagen til at de heterozygote inkluderes i avlen, er at fjernelse af 36,8 % vil ødelægge avlsgrundlaget for racen.



## 7 Konklusion

EIC er et syndrom der har eksisteret længe, men det er først for nylig man har fundet den egentlige årsag: En enkelt nukleotid mutation i dynamine 1 genet på kromosom 9, position 767 hvor basen guanin udskiftedes med thymin resulterende i en aminosyreændring fra arginine til leucine i codon 256.

Dynamamin 1's virke i endocytosen har været belyst dels via *Drosophila* bærende en temperatursensitiv allel af dynamamin 1 homologen *shi*, andre dynamaminmutanter, GTP- $\gamma$ S-behandlede synaptosomer samt KO mus. Resultaterne tyder på at dynamamin 1's rolle i endocytosen er at optimere den morfologiske adaptation af det synaptiske maskineri ved høj intensitet via dels konformationelle forandringer og GTP hydrolyse. Calcium- calmodulin afhængige protein phosphatase calcineurin spiller her en afgørende rolle idet den ved høj stimulering aktiveres resulterende i dephosphorylering af dynamamin 1 og påbegyndelse af ADPE.

Hunde afficeret med EIC udviser ved intensiv motionering muskelsvaghed, ukoordinerede bevægelsesmønstre, kollaps i værste tilfælde med fatal udgang tydende på en manglende evne af den homologe mutant leucin i dynamamin 1 til at optimere det synaptiske maskineri ved høj intensitet.

EIC har efter screening vist sig at være et udbredt problem i Danmark med fordelingen: afficererede = 5,9%, raske = 57,3% og raske anlægsbærere = 36,8%. EIC har ydermere vist sig at have alvorlige konsekvenser for både ejer og hund. Der har været forsøgt med forskellige behandlinger, kirurgi og diæter, men intet synes at eliminere kollapsene. De bedste resultater er opnået ved restriktiv motionering, dog umuliggør det brug af hunden til jagt og konkurrence og nogle ejere har derfor valgt at aflive.

Løsningen på problemet må derfor findes via avlsrestriktioner. Ved at udelukke de homozygote fra avl via genetiske test og kun tillade parring mellem heterozygote og raske (og raske med raske), kan *DNM1* mutationen reduceres og på sigt fjernes fra den danske population af labrador retrievere.





## 8 Perspektivering

Årsagen til EIC er fundet men der er stadig mange spørgsmål der mangler at blive besvaret.

I dette forsøg bestemmes den genetiske status for EIC hos 122 labrador retrievere. Ved at lave en grundig klinisk undersøgelse af de 122 hunde kunne man belyse det kliniske billede af EIC og penetransen, der har vist sig ikke at være 100 %.

På nuværende tidspunkt synes den bedste løsning at være avlsrestriktioner, der på sigt vil eliminere mutationen. Men måske en anden løsning kan findes ved at belyse dynamin 1 's virkemekanisme og sammenspil med andre stoffer i endocytosen. Endocytosen er en kompliceret proces, og det kan være, der viser sig at være et andet stof, der kan kompensere for tabet af dynamin1, som kan bruges til behandling. Det kan også være, at man ved at forstå endocytosen får svaret på, hvorfor penetransen er 80 % når labrador retrieverne er 4 år og kun  $\approx 50$  % i udstillingshunde og hunde, der bruges som kæledyr

Indtil videre har man undersøgt dynamin 1's virkemekanisme i KO mus, men måske kunne man udvide forsøget til KO hund, for på den måde at få et klart billede af dynamin 1's virkemekanisme i hund. Det vil også kun bidrage til den generelle forståelse af endocytose, synaptisk transmission og neuropatobiologi.



## 9 Litteraturliste

Achiriloaie, M., B. Barylko & J.P. Albanesi (1999): Essential role of the dynamin pleckstrin homology domain in receptor-mediated endocytosis  
*Molecular and Cellular Biology*. Vol. 19, nr. 2, pp. 1410-1415.

Allen, D.G., G.D. Lamb & H. Westerblad (2008): Skeletal muscle fatigue: Cellular mechanisms  
*Physiological Reviews*. Vol. 88, nr. 1, pp. 287-332.

Andersen, E., S. Bertelsen, E. Bindseil, O. Bonnevie, P. Bretlau, P. Christoffersen & et al. (1999):  
*Klinisk ordbog*. 15. udgave. Munksgaard, København. 280 pp.

Anggono, V., K.J. Smillie, M.E. Graham, V.A. Valova, M.A. Cousin & P.J. Robinson (2006): Syndapin I is the phosphorylation-regulated dynamin I partner in synaptic vesicle endocytosis  
*Nature Neuroscience*. Vol. 9, nr. 6, pp. 752-760.

Artru, A.A. (1987): Reduction of cerebrospinal fluid pressure by hypocapnia: Changes in cerebral blood volume, cerebrospinal fluid volume, and brain tissue water electrolytes.  
*J Cereb Blood Flow Metab*. Vol. 7, pp. 471-479.

Artru, A.A., R.A. Katz & P.S. Colley (1989): Autoregulation of cerebral blood flow during normocapnia and hypocapnia in dogs.  
*Anesthesiology*. Vol. 70, pp. 288-292.

Baba, T., H. Ueda, N. Terada, Y. Fujii & S. Ohno (1999): Immunocytochemical study of endocytotic structures accumulated in HeLa cells transformed with a temperature-sensitive mutant of dynamin  
*Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. Vol. 47, nr. 5, pp. 637-648.

Barylko, B., D. Binns, K.M. Lin, M.A.L. Atkinson, D.M. Jameson, H.L. Yin & J.P. Albanesi (1998): Synergistic activation of dynamin GTPase by Grb2 and phosphoinositides  
*Journal of Biological Chemistry*. Vol. 273, nr. 6, pp. 3791-3797.

Bashkirov, P.V., S.A. Akimov, A.I. Evseev, S.L. Schmid, J. Zimmerberg & V.A. Frolov (2008): GTPase Cycle of Dynamin Is Coupled to Membrane Squeeze and Release, Leading to Spontaneous Fission  
*Cell*. Vol. 135, nr. 7, pp. 1276-1286.

Bethoney, K.A., M.C. King, J.E. Hinshaw, E.M. Ostap & M.A. Lemmon (2009): A possible effector role for the pleckstrin homology (PH) domain of dynamin  
*Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*. Vol. 106, nr. 32, pp. 13359-13364.

Bjotredt, G., G.M. Hendricks & C.W. Weems (1983): Exertional rhabdomyolysis in a racing greyhound.  
*Vet Med Small Anim Clin*. Vol. 8, pp. 1215-1220.

Breitschwerdt, E.B., J.N. Kornegay, S.J. Wheeler & et al (1992): Episodic weakness associated with exertional lactic acidosis and myopathy in Old English sheepdog littermates.  
*J AM Vet Med Assoc*. Vol. 201, pp. 731-735.

Bruchim, Y., E. Klement, J. Saragusty & et al. (2006): Heat stroke in dogs: a retrospective study of 54 cases and analysis of risk factors for death.  
*J Vet Inter Med*. Vol. 20, pp. 38-46.



- Carlton, J.G. & P.J. Cullen (2005): Coincidence detection in phosphoinositide signaling  
*Trends in Cell Biology*. Vol. 15, nr. 10, pp. 540-547.
- Christensen, K. (2003): *Kompendium i populations genetik for veterinærstuderende*. 6. udgave.  
Samfundslitteratur, KVL-bogladen, København, 142 pp.
- Clayton, E.L., V. Anggono, K.J. Smillie, N. Chau, P.J. Robinson & M.A. Cousin (2009): The Phospho-Dependent Dynamin-Syndapin Interaction Triggers Activity-Dependent Bulk Endocytosis of Synaptic Vesicles  
*Journal of Neuroscience*. Vol. 29, nr. 24, pp. 7706-7717.
- Clayton, E.L. & M.A. Cousin (2009): The molecular physiology of activity-dependent bulk endocytosis of synaptic vesicles  
*Journal of Neurochemistry*. Vol. 111, nr. 4, pp. 901-914.
- Cousin, M.A. (2009): Activity-Dependent Bulk Synaptic Vesicle Endocytosis-A Fast, High Capacity Membrane Retrieval Mechanism  
*Molecular Neurobiology*. Vol. 39, nr. 3, pp. 185-189.
- Cunningham, J.G. (2002): *Textbook of Veterinary Physiology*. W.B.SAUNDERS COMPANY, 130 pp.
- Damke, H., T. Baba, D.E. Warnock & S.L. Schmid (1994): Induction of Mutant Dynamin Specifically Blocks Endocytic Coated Vesicle Formation  
*Journal of Cell Biology*. Vol. 127, nr. 4, pp. 915-934.
- Damke, H., D.D. Binns, H. Ueda, S.L. Schmid & T. Baba (2001): Dynamin GTPase domain mutants block endocytic vesicle formation at morphologically distinct stages  
*Molecular Biology of the Cell*. Vol. 12, nr. 9, pp. 2578-2589.
- Dittman, J. & T.A. Ryan (2009): Molecular Circuitry of Endocytosis at Nerve Terminals  
*Annual Review of Cell and Developmental Biology*. Vol. 25, pp. 133-160.
- DKK (2009): *Dansk Kennel Klub*, [www.dansk-kennel-klub.dk](http://www.dansk-kennel-klub.dk) Dansk Kennel Klub.
- Edeling, M.A., C. Smith & D. Owen (2006): Life of a clathrin coat: insights from clathrin and AP structures  
*Nat Rev Mol Cell Biol*. Vol. 7, nr. 1, pp. 32-44.
- Encyclopædia Britannica (1998): [www.britannica.com/EBchecked/topic/468736/polymerase-chain-reaction](http://www.britannica.com/EBchecked/topic/468736/polymerase-chain-reaction)
- Evans, G.J.O. & M.A. Cousin (2007): Activity-dependent control of slow synaptic vesicle endocytosis by cyclin-dependent kinase 5  
*Journal of Neuroscience*. Vol. 27, nr. 2, pp. 401-411.
- Ferasin, L. & S. Marcora (2009): Reability of an incremental exercise test to evaluate acute blood lactate, heart rate and body temperature responses in Labrador retrievers. J  
*Comp Physiol B*. Vol. 179, pp. 839-845.
- Ferguson, S.M., G. Brasnjo, M. Hayashi, M. Wolfel, C. Collesi, S. Giovedi, A. Raimondi, L.W. Gong, P. Ariel, S. Paradise, E. O'Toole, R. Flavell, O. Cremona, G. Miesenbock, T.A. Ryan & P. De Camilli (2007): A Selective Activity-Dependent Requirement for Dynamin 1 in Synaptic Vesicle Endocytosis  
*Science*. Vol. 316, nr. 5824, pp. 570-574.



- Gandevia, S.C. (2001): Spinal and supraspinal factors in human muscle fatigue  
*Physiological Reviews*. Vol. 81, nr. 4, pp. 1725-1789.
- Gandevia, S.C., J.L. Taylor & J.E. Butler (2000): Stopping exercise: role of pulmonary C fibers and inhibition of motoneurons  
*News in Physiological Sciences*. Vol. 15, pp. 241-245.
- Graham, M.E., V. Anggono, N. Bache, M.R. Larsen, G.E. Craft & P.J. Robinson (2007): The in vivo phosphorylation sites of rat brain dynamin I  
*Journal of Biological Chemistry*. Vol. 282, nr. 20, pp. 14695-14707.
- Granseth, B., B. Odermatt, S.J. Royle & L. Lagnado (2006): Clathrin-mediated endocytosis is the dominant mechanism of vesicle retrieval at hippocampal synapses  
*Neuron*. Vol. 51, nr. 6, pp. 773-786.
- Guaranha, M.S., E. Garzon, C.A. Buchpiguel & et al. (2005): Hyperventilation revisited: physiological affects and efficacy on focal seizure activation in the era of video-EEG monitoring.  
*Epilepsia*. Vol. 46, pp. 69-75.
- Harata, N.C., A.M. Aravanis & R.W. Tsien (2006): Kiss-and-run and full-collapse fusion as modes of exo-endocytosis in neurosecretion  
*Journal of Neurochemistry*. Vol. 97, nr. 6, pp. 1546-1570.
- Hartwall, L.H., L. Hood, M.L. Goldberg, A.E. Reynolds, L.M. Silver & Veres R.C. (2004):  
*Genetics from Genes to Genomes*. 2nd. udgave. McGraw-Hill, 868 pp.
- Herskovits, J.S., C.C. Burgess, R.A. Obar & R.B. Vallee (1993): Effects of Mutant Rat Dynamin on Endocytosis.  
*Journal of Cell Biology*. Vol. 122, nr. 3, pp. 565-578.
- Hinshaw, J.E. (2000): Dynamin and its role in membrane fission  
*Annual Review of Cell and Developmental Biology*. Vol. 16, p. 483-+.
- Hinshaw, J.E. & S.L. Schmid (1995): Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding.  
*Nature*. Vol. 374, pp. 190-192.
- Houé H, A.K. Ersbøll, Toft N & J.T. Agger (2003): *Veterinary epidemiology. from hypothesis to conclusion*. 2nd. udgave. Division of Epidemiology, Department of Animal Science and Animal Health, The Royal Veterinary and Agricultural University, Frederiksberg, Denmark., 265 pp.
- Kessels, M.M. & B. Qualmann (2002): Syndapins integrate N-WASP in receptor-mediated endocytosis  
*Embo Journal*. Vol. 21, nr. 22, pp. 6083-6094.
- Kirmayer, A.H., A.M. Klide & J.E. Purvance (1984): Malignant hyperthermia in a dog: case report and review of the syndrome. J  
*AM Vet Med Assoc*. Vol. 185, pp. 978-982.
- Kjærsgaard, E., N.B. Jørgensen & E. Hippe (2005): *Laboratorie undersøgelse, deres kemiske og kliniske betydning*. 4. udgave. FADL's Forlag, 152 pp.
- Koenig, J.H. & K. Ikeda (1989): Disappearance and Reformation of Synaptic Vesicle Membrane Upon Transmitter Release Observed Under Reversible Blockage of Membrane Retrieval  
*Journal of Neuroscience*. Vol. 9, nr. 11, pp. 3844-3860.



- Kosaka, T. & K. Ikeda (1983): Possible Temperature-Dependent Blockage of Synaptic Vesicle Recycling Induced by A Single Gene Mutation in *Drosophila*  
*Journal of Neurobiology*. Vol. 14, nr. 3, pp. 207-225.
- Lambert-Drwiega, A. & R.P. Byrd Jr (2009): *Respiratorisk alkalosis*,  
[www.emedicine.com/med/topic2009.htm](http://www.emedicine.com/med/topic2009.htm) emedicine.com.
- Lee, E. & P. De Camilli (2002): Dynamin at actin tails  
*Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*. Vol. 99, nr. 1, pp. 161-166.
- Liu, J., M. Kaksonen, D.G. Drubin & G. Oster (2006): Endocytic vesicle scission by lipid phase boundary forces  
*Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*. Vol. 103, nr. 27, pp. 10277-10282.
- Liu, J., Y. Sun, G.F. Oster & D.G. Drubin (2009): Mechanochemical crosstalk during endocytic vesicle formation.  
*Current Opinionin Cell Biology*. Vol. 22, pp. 1-8.
- Lou, X.L., S. Paradise, S.M. Ferguson & P. De Camilli (2008): Selective saturation of slow endocytosis at a giant glutamatergic central synapse lacking dynamin 1  
*Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*. Vol. 105, nr. 45, pp. 17555-17560.
- Marks, B., M.H.B. Stowell, Y. Vallis, I.G. Mills, A. Gibson, C.R. Hopkins & H.T. McMahon (2001): GTPase activity of dynamin and resulting conformation change are essential for endocytosis  
*Nature*. Vol. 410, nr. 6825, pp. 231-235.
- Matwichuk, C.L., S.M. Taylor, C.L. Shmon, P.H. Kass & G.D. Shelton (1999): Changes in rectal temperature and hematologic, biochemical, blood gas, and acid-base values in healthy Labrador Retrievers before and after strenuous exercise.  
*American Journal of Veterinary Research*. Vol. 60, nr. 1, pp. 88-92.
- Merrifield, C.J., M.E. Feldman, L. Wan & W. Almers (2002): Imaging actin and dynamin recruitment during invagination of single clathrin-coated pits  
*Nature Cell Biology*. Vol. 4, nr. 9, pp. 691-698.
- Miaczynska, M. & H. Stenmark (2008): Mechanisms and functions of endocytosis  
*Journal of Cell Biology*. Vol. 180, nr. 1, pp. 7-11.
- Moore, A.K. (2003): Exercise induced collapse.  
*North American Hunting Retriever Association News* pp. 20-21.
- NCBI (2009): *Dynamin 1 conserved domain search*,  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/epf/ernadgang.kb.dk/Structure/cdd/wrpsb.cgi?INPUT\\_TYPE=live&SEQUENCE=NP\\_001124521.1&log\\$=seqview\\_list\\_cdsearch](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/epf/ernadgang.kb.dk/Structure/cdd/wrpsb.cgi?INPUT_TYPE=live&SEQUENCE=NP_001124521.1&log$=seqview_list_cdsearch) NCBI.
- NEB. (2009): *SmII*, <http://www.neb.com/nebecomm/products/productR0597.asp> New England Biolabs.
- Nelson, R.W. & C.G. Couto (2003): *Small Animal Internal Medicine*. 3. udgave. Mosby, 1320 pp.



Oh, P., D.P. McIntosh & J.E. Schnitzer (1998): Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to form transport vesicles by GTP-driven fission from the plasma membrane of endothelium  
*Journal of Cell Biology*. Vol. 141, nr. 1, pp. 101-114.

Oliver, J.E. & C.E. Greene (1983): *Ettinger SJ, ed. Textbook of Veterinary Internal Medicine*. 2. udgave. WB Saunders, Philadelphia. 500 pp.

Patterson, E.E., K.M. Minor, A.V. Tchernatynskaia, S.M. Taylor, G.D. Shelton, K.J. Ekenstedt & J.R. Mickelson (2008): A canine DNMI1 mutation is highly associated with the syndrome of exercise-induced collapse.  
*Nature Genetics*. Vol. 40, nr. 10, pp. 1235-1239.

Poodry, C.A. & L. Edgar (1979): Reversible Alterations in the Neuromuscular-Junctions of *Drosophila-Melanogaster* Bearing A Temperature-Sensitive Mutation, *Shibire*  
*Journal of Cell Biology*. Vol. 81, nr. 3, pp. 520-527.

Qualmann, B., M.M. Kessels & R.B. Kelly (2000): Molecular links between endocytosis and the actin cytoskeleton  
*Journal of Cell Biology*. Vol. 150, nr. 5, p. F111-F116.

Ramachandran, R. & S.L. Schmid (2008): Real-time detection reveals that effectors couple dynamin's GTP-dependent conformational changes to the membrane  
*Embo Journal*. Vol. 27, nr. 1, pp. 27-37.

Ramachandran, R., M. Surka, J.S. Chappie, D.M. Fowler, T.R. Foss, B.D. Song & S.L. Schmid (2007): The dynamin middle domain is critical for tetramerization and higher-order self-assembly  
*EMBO J*. Vol. 26, nr. 2, pp. 559-566.

Rasmussen, P., B. Nielsen & et al. (2006): Enhanced cerebral CO<sub>2</sub> reactivity during strenuous exercise in man.  
*Eur J Appl Physiol*. Vol. 96, pp. 299-304.

Richards, D.A., C. Guatimosim & W.J. Betz (2000): Two endocytic recycling routes selectively fill two vesicle pools in frog motor nerve terminals  
*Neuron*. Vol. 27, nr. 3, pp. 551-559.

Sakellari, V., A.M. Bronstein, S. Corna & et al. (1997): The effect of hyperventilation on postural control mechanisms.  
*Brain*. Vol. 120, pp. 1659-1673.

Sever, S., H. Damke & S.L. Schmid (2000): Dynamin : GTP controls the formation of constricted coated pits, the rate limiting step in clathrin-mediated endocytosis  
*Journal of Cell Biology*. Vol. 150, nr. 5, pp. 1137-1147.

Shelton, G.D. & E. Engvall (2002): Muscular dystrophies and other inherited myopathies.  
*Veterinary Clinics of North America:Small Animal Practice*. Vol. 32, nr. 1, pp. 103-124.

Shelton, G.D. (1993): Exercise intolerance in dogs.  
*Proceedings of the ACVIM Forum*. Vol. 11, pp. 888-891.

Shelton, G.D., W.L. Nyhan, P.H. Kass, B.A. Barshop & R.H. Haas (1998): Analysis of organic acids in dogs with lipid storage myopathy.  
*Muscle and Nerve*. Vol. 21, pp. 1202-1205.



Silverthorn, D.U., W.C. Ober, C.W. Garrison, A.C. Silverthorn & B.R. Johnson (2004): *Human Physiology*. 3. udgave. Pearson Education Benjamin Cummings, 878 pp.

Smillie, K.J. & M.A. Cousin (2005): *Dynamin I phosphorylation and the control of synaptic vesicle endocytosis* 97 pp.

Smirnova, E., D.L. Shurland, E.D. Newman-Smith, B. Pishvae & A.M. van der Blik (1999): A model for dynamin self-assembly based on binding between three different protein domains *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 274, nr. 21, pp. 14942-14947.

Song, B.D., D. Yarar & S.L. Schmid (2004): An assembly-incompetent mutant establishes a requirement for dynamin self-assembly in clathrin-mediated endocytosis in vivo *Molecular Biology of the Cell*. Vol. 15, nr. 5, pp. 2243-2252.

Sontag, J.M., E.M. Fykse, Y. Ushkaryov, J.P. Liu, P.J. Robinson & T.C. Sudhof (1994): Differential Expression and Regulation of Multiple Dynamins *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 269, nr. 6, pp. 4547-4554.

Steiss, J., H.A. Ahmad, P. Cooper & C. Ledford (2004): Physiologic Responses in Healthy Labrador Retrievers during Field Trial Training and Competition. *J Vet Inter Med*. Vol. 18, pp. 147-151.

Sweitzer, S.M. & J.E. Hinshaw (1998): Dynamin undergoes a GTP-dependent conformational change causing vesiculation. *Cell*. Vol. 93, nr. 6, pp. 1021-1029.

Takei, K., P.S. Mcpherson, S.L. Schmid & P. Decamilli (1995): Tubular Membrane Invaginations Coated by Dynamin Rings Are Induced by Gtp-Gamma-S in Nerve-Terminals. *Nature*. Vol. 374, nr. 6518, pp. 186-190.

Takenawa, T. & H. Miki (2001): WASP and WAVE family proteins: key molecules for rapid rearrangement of cortical actin filaments and cell movement *Journal of Cell Science*. Vol. 114, nr. 10, pp. 1801-1809.

Taylor, S.M. (2002): The syndrome of exercise induced collapse in Labrador retrievers. *Proceedings of the ACVIM Forum* pp. 315-318.

Taylor, S.M. (2000): Exercise induced collapse in Labrador retrievers. *Retriever Field Trial News* pp. 24-27.

Taylor, S.M. (2007): Exercise induced collapse in Labrador retrievers "update". *Small Animal Internal Medicine*.

Taylor, S.M., C.L. Shmon, V.J. Adams, J.R. Mickelson, E. Patterson & G.D. Shelton (2009): Evaluations of Labrador Retrievers With Exercise-Induced Collapse, Including Response to a Standardized Strenuous Exercise Protocol. *Journal of the American Animal Hospital Association*. Vol. 45, nr. 1, pp. 3-13.

Taylor, S.M., C.L. Shmon, G.D. Shelton, E. Patterson, K. Minor & J.R. Mickelson (2008): Exercise-Induced Collapse of Labrador Retrievers: Survey Results and Preliminary Investigation of Heritability. *Journal of the American Animal Hospital Association*. Vol. 44, nr. 6, pp. 295-301.

Tilley, L.P. & F.W. Smith (2008): *Blackwell's Five Minute Veterinary Consult: Canine and Feine*. 4. udgave. Blackwell Publishing, 459 pp.



- Ungewickell, E.J. & L. Hinrichsen (2007): Endocytosis: clathrin-mediated membrane budding  
*Current Opinion in Cell Biology*. Vol. 19, nr. 4, pp. 417-425.
- Urrutia, R., J.R. Henley, T. Cook & M.A. McNiven (1997): The dynamins: Redundant or distinct functions for an expanding family of related GTPases?  
*Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*. Vol. 94, nr. 2, pp. 377-384.
- Vallis, Y., P. Wigge, B. Marks, P.R. Evans & H.T. McMahon (1999): Importance of the pleckstrin homology domain of dynamin in clathrin-mediated endocytosis  
*Current Biology*. Vol. 9, nr. 5, pp. 257-260.
- Vanderbliek, A.M., T.E. Redelmeier, H. Damke, E.J. Tisdale, E.M. Meyerowitz & S.L. Schmid (1993): Mutations in Human Dynamin Block An Intermediate Stage in Coated Vesicle Formation  
*Journal of Cell Biology*. Vol. 122, nr. 3, pp. 553-563.
- Warnock, D.E., J.E. Hinshaw & S.L. Schmid (1996): Dynamin self-assembly stimulates its GTPase activity  
*Journal of Biological Chemistry*. Vol. 271, nr. 37, pp. 22310-22314.
- Wu, X.S., B.D. Mcneil, J.H. Xu, J.M. Fan, L. Xue, E. Melicoff, R. Adachi, L. Bai & L.G. Wu (2009): Ca<sup>2+</sup> and calmodulin initiate all forms of endocytosis during depolarization at a nerve terminal  
*Nature Neuroscience*. Vol. 12, nr. 8, pp. 1003-1070.
- Zhang, Q., Y.L. Li & R.W. Tsien (2009): The Dynamic Control of Kiss-And-Run and Vesicular Reuse Probed with Single Nanoparticles  
*Science*. Vol. 323, nr. 5920, pp. 1448-1453.
- Zhu, Y.L., J. Xu & S.F. Heinemann (2009): Two Pathways of Synaptic Vesicle Retrieval Revealed by Single-Vesicle Imaging  
*Neuron*. Vol. 61, nr. 3, pp. 397-411.





## **Bilagsfortegnelse**

Bilag 1: Allelfrekvens og stikprøvestørrelse.....I

Bilag 2: 2.dags DNA-ekstraktion fra EDTA-blod.....III

Bilag 3: PC-mix & Sm1I-mix.....V



## Bilag 1: Allelfrekvens og stikprøvestørrelse

Estimering af allelfrekvenser vha. gentællemetoden antaget at populationen er i Hardy-Weinberg ligevægt. Dvs. følgende betingelser er opfyldt: tilfældig parring, ingen mutationer, ingen selektion, ingen migration samt en stor population, så man kan se bort fra genetisk drift. (Christensen 2003)

### Allelfrekvensen for T767 i USA:

Antal heterozygote labrador retrievere ( $G767/T767$ ) =  $0,37 \cdot 400$  hunde = 148 hunde

Antal homozygote labrador retrievere ( $T767/T767$ ) =  $0,03 \cdot 400$  = 12 hunde

Antal alleler =  $400$  hunde  $\cdot 2$  = 800 alleler

Antal T767 alleler =  $148$  alleler +  $2 \cdot 12$  alleler = 172 alleler

Frekvensen af T767 =  $172$  alleler /  $800$  alleler = 0,215

Frekvensen af G767 =  $1 - 0,215$  = 0,785

Frekvensen af afficerede hunde ( $T767/T767$ ) =  $0,215^2$  = 0,046

Frekvensen af hunde der ikke er anlægsbærere ( $G767/G767$ ) =  $0,785^2$  = 0,616

Frekvensen af raske anlægsbærere =  $2 \cdot 0,215 \cdot 0,785$  = 0,338

### Stikprøvestørrelsen baseret på allelfrekvenser fra USA:

D er antallet af T767-alleler i populationen, antaget mutationen er til stede. Ifølge Dansk Kennel Klub er antal N af labrador retrievere registreret fra 1996-2009 ca.32.000 hunde (DKK 2009). Det svarer til 64.000 alleler, og allelfrekvensen for mutationen T767 er 0,215

$$\begin{aligned} D &= \text{allelfrekvensen af T767} \cdot N \\ &= 0,215 \cdot 64.000 \text{ alleler} \\ &= \underline{13.760 \text{ alleler}} \end{aligned}$$

$n$  er stikprøvestørrelsen. P sættes til 0,95, da jeg ønsker at detektere mutationen i populationen med 95 % sandsynlighed, såfremt denne eksisterer:

$$\begin{aligned} n &= (1 - (1 - P)^{1/D}) (N - (D-1) / 2) \\ &= (1 - (1 - 0,95)^{1/13760 \text{ alleler}}) (64.000 \text{ alleler} - (13.760 \text{ alleler} - 1) / 2) \\ &= \underline{12,4} \approx 13 \text{ alleler} \end{aligned}$$

Altså bør der testes 7 labrador retrievere for at detektere mutationen med 95 % sandsynlighed, hvis den eksisterer i den danske population (Houe H *et al.* 2003)



### **Udregning af T767 -allelfrekvensen i den danske population af labrador retrievere:**

Totale allelfrekvenser fundet ved screening (122 hunde):

Antal heterozygote labrador retrievere (G767/T767) = 28 hunde

Antal homozygote labrador retrievere (T767/T767) = 8 hunde

Antal alleler = 122 hunde  $\cdot$  2 = 244 alleler

Antal T767 alleler = 28 alleler + 2  $\cdot$  8 alleler = 44 alleler

Frekvensen af T767 = 44 alleler / 244 alleler = 0,180

Frekvensen af G767 = 1 - 0,180 = 0,820

Frekvensen af afficerede hunde (T767/T767) =  $0,180^2 = \underline{0,033}$

Frekvensen af hunde der ikke er anlægsbærer (G767/G767) =  $0,820^2 = \underline{0,672}$

Frekvensen af raske anlægsbærer = 2  $\cdot$  0,180  $\cdot$  0,820 = 0,295

Ubeslægtede allelfrekvenser ”ingen fælles forældre” (72 hunde):

Antal heterozygote labrador retrievere (G767/T767) = 15 hunde

Antal homozygote labrador retrievere (T767/T767) = 7 hunde

Antal alleler = 72 hunde  $\cdot$  2 = 144 alleler

Antal T767 alleler = 15 alleler + 2  $\cdot$  7 alleler = 39 alleler

Frekvensen af T767 = 39 alleler / 144 alleler = 0,271

Frekvensen af G767 = 1 - 0,271 = 0,729

Frekvensen af afficerede hunde (T767/T767) =  $0,271^2 = \underline{0,073}$

Frekvensen af hunde der ikke er anlægsbærer (G767/G767) =  $0,729^2 = \underline{0,532}$

Frekvensen af raske anlægsbærer = 2  $\cdot$  0,271  $\cdot$  0,729 = 0,395

Ubeslægtede allelfrekvenser ”ingen fælles aner til og med bedsteforældre” (35):

Antal heterozygote labrador retrievere (G767/T767) = 7 hunde

Antal homozygote labrador retrievere (T767/T767) = 5 hunde

Antal alleler = 35 hunde  $\cdot$  2 = 70 alleler

Antal T767 alleler = 7 alleler + 2  $\cdot$  5 alleler = 17 alleler

Frekvensen af T767 = 17 alleler / 70 alleler = 0,243

Frekvensen af G767 = 1 - 0,243 = 0,757

Frekvensen af afficerede hunde (T767/T767) =  $0,243^2 = \underline{0,059}$

Frekvensen af hunde der ikke er anlægsbærer (G767/G767) =  $0,757^2 = \underline{0,573}$

Frekvensen af raske anlægsbærer = 2  $\cdot$  0,243  $\cdot$  0,757 = 0,368



## Bilag 2:

### 2. dags DNA ekstraktion fra EDTA-blod.

#### 1. dag

Husk at tænde for en kølecentrifuge 4°C.

1. **Sid ved stinkskalet med blodprøverne og benyt handsker.** Tilsæt tritonlysebuffer:

10 ml blod = 40 ml tritonlysebuffer

5 ml blod = 20 ml tritonlysebuffer

2,5 ml blod = 10 ml tritonlysebuffer

1,25 ml blod = tritonlysebuffer

2. Prøverne rystes godt og sættes i køleskalet i 30 min. Ryst prøverne engang imellem.
3. Centrifugeres 15 min ved 2500 rpm, 4°C.
4. Supernatanten kasseres. **Benyt stinkskalet og brug handsker.** Vær opmærksom på at pellet kan sidde løst.
5. Tilsæt 0,9 % NaCl:

10 ml blod = 2 ml 0,9 % NaCl

5 ml blod = 1 ml 0,9 % NaCl

2,5 ml blod = 0,5 ml 0,9 % NaCl

1,25 ml blod = 0,25 0,9 % NaCl

6. Vortex til pellet er rimeligt opløst.
7. Centrifugér 10 min ved 2500 rpm, 4°C.
8. Tag pronase (20 mg/ml) ud af fryseren og forbered pronase-blanding til det antal prøver du har.
9. Supernatanten kasseres. Hæld forsigtigt! Pellet kan sidde løst.
10. Tilsæt kernelysebuffer:

10 ml blod = 3 ml

5 ml blod = 1,5 ml

2,5 ml blod = 0,75 ml

1,25 ml blod = 0,375 ml

11. Tilsæt 20 % SDS:

10 ml blod = 100 µl

5 ml blod = 50 µl

2,5 ml blod = 25 µl

1,25 ml blod = 12,5 µl

#### **Pronase blanding:**

1 prøve = 10 ml blod!

1 prøve:

896 µl vand

50 µl pronase (20mg/ml)

50 µl 20 % SDS

4 µl 0,5 M Na<sub>2</sub>EDTA, pH 8,0



12. Tilsæt pronase-blandingen:

10 ml blod = 1,0 ml

5 ml blod = 0,5 ml

2,5 ml blod = 0,25 ml

1,25 ml blod = 0,125 ml

13. Ryst pellet op sæt prøverne på ”rystebord” natten over (ved stue temp.)

## 2. dag.

Husk at tænde kølecentrifuge 4°C. Og lave ”fiske-stænger” til fældningen.

1. Tilsæt mættet NaCl (6M)

10 ml blod = 1,0 ml

5 ml blod = 0,5 ml

2,5 ml blod = 0,25 ml blod

1,25 ml blod = 0,125 ml

2. Vortex prøverne ved fuld kraft i 15 sek.

3. Centrifuger i 15 min. ved 2500 rpm, 4°C. Gør imens nye 50 ml rør klar med lab. nummer.

4. Overfør supernatanten til de nye rør, uden at få bundfældet med. Klip evt. enden af P1000 spidsen.

5. Fæld DNA’et med 1 vol. Isopropanol og sno det op på en ”fiske-stang”. **Stinkskab og handsker!! Affald opsamles i mærket affaldsflaske.**

6. Opløs DNA’et i en passende mængde TE-buffer (omkring 200-300 µl) og brug 1,5 ml rør med skruelåg.

7. Stil rørene til omrøring i kølerummet i kælderen natten over eller længere.

8. Mål OD og mærk rørene med koncentration. OD ved 25 · fortynding (72 µl H<sub>2</sub>O + 3 µl DNA).



## **Bilag 3: PC-mix & Sm1I-mix**

### PC-mastermix:

- 2  $\mu$ l  $MgCl_2$  (buffer)
- 1  $\mu$ l dNTP
- 0,7  $\mu$ l af begge primere
- 0,2  $\mu$ l Amplicon Taq (hotstart enzym)
- 13,4  $\mu$ l MilliQ

Hertil tilsættes 2  $\mu$ l DNA (25ng/ $\mu$ L)

### Sm1I-mastermix:

- 2  $\mu$ l 10 · Bovine Serum Albumin (fortyndes først)
- 2  $\mu$ l 10 · NEBuffer 4
- 5  $\mu$ l MilliQ
- 1  $\mu$ l Sm1I (10 unit)

Hertil tilsættes 10  $\mu$ l PCR produkt og det hele stilles på varmeblok ved 55° C i ca .1 time.