



Kandidatspeciale (30 ECTS)

Morten Refshøj (wcr259)

Osteogenesis imperfecta hos danske ruhårede gravhunde

Vejledere: Lektor, Camilla Vibeke Sichlau Bruun og professor, Merete Fredholm
Afleveret den: 14. juni 2022

Forord

Specialeprojektet er skrevet i fagområdet genetik ved sektionen for dyrevelfærd og sygdomsbekæmpelse på Institut for Veterinær- og Husdyrvidenskab, Københavns Universitet, i perioden 01.02.2022 til 14.06.2022.

Formålet med specialet var at finde et estimat af allelfrekvensen for en missense mutation i *SERPHIN1*-genet hos danske ruhårede gravhunde og afgøre om homozygoti for denne mutation, forårsager lidelsen osteogenesis imperfecta (OI). På baggrund af resultatet, skulle der diskuteres mulige tiltag i Dansk Gravhundeklub (DGK), for at undgå fremtidige parringer mellem heterozygote individer, via forebyggende DNA-test.

Formålet er derudover også at oplyse om OI; dens arvegang, kliniske billede og konsekvenser.

Målgruppen for specialeprojektet er hovedsageligt opdrættere af gravhunde, samt hunderace/genetik-entusiaster og veterinærfaglige personer.

Tak til Dansk Kennel Klub (DKK) for at bidrage med økonomisk støtte til specialeprojektet. Tak til DGKs repræsentanter for at opsøge viden om OI og sætte lidelsen i fokus i klubben. Tak til opdrætter Mille Sass for indrapportering af en OI-afficeret hvalp og beskrivelse af forløbet. Tak til laborant Tina Bahrt Neergaard Mahler for sit gode arbejde og uundværlige assistance i laboratoriet. Tak til min kære mor, Anita Refshøj, for moralsk og ernæringsmæssigt support, samt korrekturlæsning. Tak til stud.med.vet. Julie Lolk Wolff-Sneedorff og Therese Fitzwilliams for god sparring fra genetik-interesserende medstuderende.

Særlig tak til lektor Camilla Vibeke Sichlau Bruun og professor Merete Fredholm for et godt samarbejde og professionel vejledning gennem hele specialeforløbet.



Morten Refshøj

Abstract

Osteogenesis imperfecta (OI) is a systemic hereditary disorder, which in dachshund is caused by an autosomal recessive missense mutation in the *SERPINH1* gene. The mutation prohibits the correct formation of collagen type 1 – a necessary component in bones. The classic symptom of OI is thereby fractures, but blueish sclera and dentinogenesis imperfecta (glass teeth) are examples of other clinical traits. There is no treatment for OI in dogs, and affected puppies are therefore euthanized. The purpose of this master's thesis is to estimate the prevalence of the mutation in the Danish population of wirehaired dachshund, as well as to validate the DNA test and generally provide information about the disorder. The genotyping was performed on blood samples from 76 unrelated wirehaired dachshund. DNA was purified and amplified using PCR. Thereafter, the PCR product was cut with the restriction enzyme *Hpy99I*, followed by gel electrophoresis, where homozygous healthy dachshund showed an uncut PCR fragment of 451 bp and carriers showed three fragments of 451 bp, 336 bp and 115 bp. There was a total of 8 carriers (10,53%). Given the high carrier frequency and the severe symptoms of the disorder, it is recommended to introduce breeding restrictions based on testing before breeding.

Sammen drag

Osteogenesis imperfecta (OI) er en systemisk arvelig lidelse, som i gravhunde skyldes en autosomal recessiv missense mutation i genet *SERPINH1*. Mutationen forhindrer korrekt dannelse af kollagen type 1 – en nødvendig komponent i knogler. Det klassiske symptom på OI er derfor frakturer, men blålig sclera og dentinogenesis imperfecta (glastænder) er eksempler på andre kliniske tegn. Der findes ingen behandling af OI hos hunde, og derfor bliver afficerede hvalpe aflivet. Formålet med dette specialeprojekt var at estimere udbredelsen af mutationen i den danske population af ruhårede gravhund, samt at validere DNA-test og generelt oplyse om lidelsen. Genotypningen blev lavet på blodprøver fra 76 ikke-beslægtede ruhårede gravhunde. DNA blev oprenset og derefter amplificeret ved brug af PCR. Herefter blev PCR-produktet skåret med restriktionsenzymet *Hpy99I*, efterfulgt af gelelektroforese, hvor homozygote raske viste et uskåret PCR-fragment på 451 bp, og anlæg sbærere viste tre fragmenter af 451 bp, 336 bp og 115 bp. I alt fandtes 8 anlæg sbærere (10,53%). På baggrund af den høje anlæg sbærer frekvens og lidelsens alvorlige symptomer, anbefales det at indføre avlsrestriktioner om test før avl.

Indledning

I januar 2021 blev der holdt et møde for bestyrelsen og det kynologiske udvalg i DGK, sammen med DKK's forretningsudvalg. Mødet blev afholdt på baggrund af bekymring omkring lidelsen "glasknogler" (OI), da et af klubbens medlemmer har henvendt sig til klubben og indberettet en syg hvalp med denne diagnose. Bekymringen understøttes af Tysklands testkrav før avl og studier, der viser høj prævalens af anlægsbærere i Tyskland, samt at der for 20 år siden, har været indberettet hvalpe med OI i Danmark, hvor faderen til kullet har været meget anvendt i avl. Klubben mistænker et stort mørketal i indberetning af syge hvalpe, grundet en kombination af lukkethed hos nogle opdrættere, og/eller manglende kendskab til lidelsen og ønsker hjælp fra DKK's sundhedsudvalg til at estimere udbredelsen af OI i den danske population, samt at validere DNA-test (1).

Ovenstående pointer fra mødet, har dannet grundlaget for dette specialeprojekt, hvor det ønskes at estimere prævalens af mutationen i danske ruhårede gravhunde, for at vurdere, om et evt. nyt avlskrav om DNA-test kan forsvares. Til dette ønskes også en validering af DNA-testen, og bekræftelse af, at OI i danske gravhunde skyldes den tidligere identificerede missense mutation i *SERPINH1*-genet (2). Ydermere er der et formål om at oplyse, samt skabe åbenhed og opmærksomhed på OI hos læsere af dette projekt, samt for både opdrættere og dyrlæger, sådan at diagnosticering og indberetning forbedres, og mørketallet dermed mindskes.

OI, også kaldet glasknogler, er en systemisk arvelig lidelse, der ændrer kroppens bindevæv. I mennesker udgør mutationer i de to kollagen-kodende gener (*COL1A1* og *COL1A2*), cirka 90% af årsagerne til lidelsen (3). I dette projekt vil der dog blive fokuseret på en af de mere sjældne årsager til lidelsen; en mutation i *SERPINH1*, der koder for dannelse af et chaperon protein (HSP47)(4). Den nye nomenklatur for proteinet, er den ikke-kursive version af gen-navnet; SERPINH1. I dette projekt vil betegnelsen HSP47 dog blive brugt i stedet, da denne bruges i samtlige referencer.

HSP47 spiller en essentiel rolle i foldningen af kollagens trippel helix struktur, der er nødvendig for kollagens funktion. Defekter i denne struktur, fører til OI, der er kendetegnet ved ekstremt skrøbelige knogler og tænder. Andre symptomer inkluderer blålig sclera, tab af hørelse, dværgvækst (5) og smerte (5), samt dødfødte hvalpe og reduceret kuldstørrelse (7,8). Indtil nu er OI blevet beskrevet i følgende racer: Golden retriever, beagle, collie, puddel, norsk elghund, bedlington terrier, gravhund (6,9–12). Og for nyligt engelsk mastiff, chow chow, finsk lapphund, lagotto romagnolo og dværgpinscher (7,13–16).

Ordliste

- Bp: Basepar bestående af to nukleotider.
- CFA21: Canine familiaris chromosome, number 21.
- Codon: Består af 3 basepar, der koder for en specifik aminosyre.
- COI: Coefficient of inbreeding (indavlskoefficient).
- *COL1A1* og *COL1A2*: Kodende gener for kollagens komponenter.
- Dentinogenesis imperfecta: Forkert dannelse af tænder, resulterende i gennemsigtige tænder.
- DNA: Deoxyribonucleic Acid (deoxyribonukleinsyre)
- DGK: Dansk Gravhunde Klub.
- DKK: Dansk Kennel Klub.
- *Hpy99I*: Et skæringsenzym.
- HSP47: Heat Shock Protein 47 (senere kaldt SERPINH1, som *SERPINH1* koder for).
- Missense mutation: En basepar substitution, der fører til en ændring af den dannede aminosyre.
- OI: Osteogenesis Imperfecta, også kaldet Glasknogler eller Brittle Bone Disease.
- *SERPINH1*: Serpin peptidase inhibitor, clade H (Heat shock protein 47), member 1 (collagen binding protein 1).
- C/C (OIA): Homozygot for mutation i *SERPINH1*. Osteogenesis imperfecta affected; syg.
- C/T (OIC): Heterozygot for mutation i *SERPINH1*. Osteogenesis imperfecta carrier; anlægsbærer.
- T/T (OIF): Homozygot rask/vildttype i *SERPINH1*. Osteogenesis imperfecta free; fri.
- PCR: Polymerase Chain Reaction (polymerasekædereaktion).
- RAS: Racespecifik Avls Strategi (ofte at finde i racens specialklub).
- rER: Ru Endoplasmatiske Reticulum (afdeling af cellen, hvor kollagen starter sin dannelse).
- SNP: Single Nucleotide Polymorphism (enkeltnukleotidpolymorfi).

Indholdsfortegnelse

Forside	
Forord.....	2
Abstract	3
Sammendrag.....	3
Indledning	4
Ordliste.....	5
Indholdsfortegnelse	6
Introduktion.....	8
Baggrund.....	8
OI i Danmark	10
<i>SERPINH1</i> og HSP47	11
Identificering af mutationen.....	11
Missense mutationen i <i>SERPINH1</i>	12
HSP47's funktion.....	12
Patomekanismen bag mutationen.....	13
Figur 1	14
Klinisk sygdomsbillede.....	15
Tabel 1.....	15
Histopatologi og røntgenforandringer.....	16
Figur 2	17
Figur 3	18
Andre fund	18
Differentialdiagnoser	19
Behandling og prognose.....	19

Laboratorie-metoder.....	20
Materiale	20
TaqMan	20
PCR med restriktionsenzymskæring.....	21
Antal nødvendige prøver.....	22
Resultater	22
Figur 4	23
Tabel 2.....	23
Diskussion.....	24
Fejlkilder	24
Resultaternes anvendelse og bias	24
Incitamenter til OI DNA-test før avl.....	25
Tabel 3.....	26
DNA-diversitet og konsekvensen af indførsel af test før avl.....	26
Konklusion.....	28
Perspektivering.....	29
Vidensdeling på tværs af landegrænser	29
Litteraturliste.....	30
Bilag.....	34
Bilag 1	34
Tysk avlsanbefaling fra oktober 2016.....	34
Bilag 2	35
Tysk avlsrestriktion fra 01.072019	35
Bilag 3	36
Den tyske gravhundeklubs avlsanbefalinger og avlskrav	36
Bilag 4.....	36

Oversigt over OI DNA prøver m genotype, slægtsskab og fødselsår	36
Bilag 5	39
DNA ekstraktion af EDTA blod via saltfældning.....	39
Bilag 6	42
TaqMan protokol.....	42
Bilag 7	44
OI Genotype protokol	44
Bilag 8	46
Gelelektroforese resultater	46
Bilag 9	58
Antal nødvendige prøver.....	58

Introduktion

Baggrund

Der har tidligere i udlandet, i 2003, været fokus på OI i gravhunde. Her mistænkte man, at der hos de syge hunde, var en mutation i generne *COL1A1* eller *COL1A2*, da mutationer i disse gener er beskrevet, som de hyppigste årsager til OI hos mennesker (17). Disse kandidatgener blev dog udelukket via sekventering på fem OI-hvalpe og således blev der opfordret til at undersøge et af de andre 15 gener, der menes at påvirke kollagendannelse, nødvendig for udviklingen af funktionelle knogler. I 2009 blev der således udgivet en artikel, hvor årsagen til OI i gravhunde blev fundet; en missense mutation i *SERPINH1* på kromosom 21 (c.977T>C, p.L326P) (2).

Den nye viden om, at OI forårsages af mutation i *SERPINH1*, førte til en større undersøgelse af tyske og schweiziske gravhunde i 2012 (8), og europæiske gravhunde i 2013 (18), hvor henholdsvis 591 og 1352 gravhunde blev genotyperet for mutation i *SERPINH1*, med en anlægsbærer frekvens på 18% og 17,3% i den ruhårede variant. På dette grundlag, er der blevet indført anbefaling om test før avl i 2016 (se Bilag 1) og senere i 2019 (se Bilag 2) blev der indført avlsrestriktion med testkrav i

den tyske gravhundeklub (Deutscher Teckelklub). Kravet indebærer at mindst ét af forældredyrene, skal være testet fri for OI (se Bilag 3)(19,20).

Den tyske undersøgelse (18) viste derudover, at antal bærere blandt prøverne fra 1995 til 2012, har været konstant fra år til år. Der er derfor, formodentligt, blevet født OI-hvalpe løbende i flere årtier (18) og indtil for nyligt, har der ikke været en succesfuld indsats mod lidelsen (konkluderet ud fra den konstante frekvens af anlægsbærere). I den forbindelse er det interessant, at man i studiet fra 2012 (8), også undersøgte prævalens af dødfødte hvalpe hos gravhundekuld. Det viste sig, at antallet af dødfødte hvalpe, er 1,8 gange højere i kuld, hvor faderen var anlægsbærer for OI ($p = 0,00002$). I gennemsnit blev der født 5 hvalpe per kuld, hvor dødfødte hvalpe udgjorde 9,2% af kullet fra anlægsbærere-fædre. I kuld fra homozygot raske fædre, lå andelen af dødfødte på 5,4%. I alt blev 660 (325 fra anlægsbærer fædre og 335 fra homozygot raske fædre) kulds dødfødte hvalpe registrerede og kun fra fædre med mere end 15 kuld. (8).

De to prævalensstudier (8,18) har også fundet anlægsbærere hos både de kort- og langhårede varianter på henholdsvis 6,8% (7) og 1,1% (18). Mutationen findes altså hos alle tre pelsvarianter, omend i noget lavere grad hos de kort- og langhårede, sammenlignet med den ruhårede variant. Dette skyldes formodentligt, at mutationen stammer fra den ruhårede variant og krydsparringer varianterne i mellem sker, om end meget sjældent (18).

Et par år efter prævalensstudierne refereret ovenfor, blev et studie omkring *SERPINH1* mutationens molekylære konsekvenser publiceret (21). For en bedre forståelse af mutationen, vil dette blive uddybet i et af de kommende afsnit.

Der er efterfølgende publiceret artikler om tilfælde af OI i andre racer, hvor årsagen endnu ikke er fundet; i 2018 en dværgpinscher hvalp, hvor genetisk test ikke blev foretaget (16), i 2019 en engelsk mastiff hvalp, hvor mutation i *COL1A2*, blev udelukket, men yderligere tests ikke lavet grundet økonomi (7) og senere to finsk lapphund hvalpe i 2021, hvor årsagen heller ikke blev fundet. I sidstnævnte artikel, bliver der lagt op til yderligere undersøgelse grundet indrapporteringer om OI i andre finske laphunde i Europa (14). Disse eksempler vidner om et emne, der er i udvikling og hvor der er behov for videre forskning og udvikling af DNA-tests – og ikke kun i gravhunde.

OI i Danmark

I 2000 modtog den Kongelige Veterinære Landbohøjskole (KVL) to aflivede gravhunde-hvalpe, som de diagnosticerede med OI og tog blodprøver fra. Herefter blev der også taget blodprøve fra en af de raske kuldsøstre, samt moderen. I kullet var også tre andre hvalpe, hvoraf én døde pludseligt kort tid efter fødslen. De to aflivede hvalpe, den raske søster og moderen ("OI-familien", se Bilag 4), er de fire blodprøver, vi har genotyperet og brugt som kontrol i dette specialeprojekt.

For at følge op på ovenstående, blev der i 2001 igangsat et projekt af DGK, hvor medlemmerne af klubben blev opfordret til at indsende døde eller aflivede hvalpe, der kunne mistænkes at have OI. Klubbens kynologiske udvalg skrev en artikel i DGK's medlemsblad "Gravhunden" (22), som beretter om, at der gennem flere år har været tilfælde af utrivelige hvalpe. Da mange af disse hvalpe blev mistænkt for at have OI, opfordredes der til, at de blev undersøgt. Der blev udvist bekymring om, at mange af hvalpene ikke nåede at komme til dyrlæge og dermed ikke fik stillet diagnosen OI. Derudover beskrev artiklen karakteristika for lidelsen og opfordrede opdrætterne til at holde øje med følgende symptomer: Svaghed, skyden ryg, svært ved at gå, ømmer sig under gang, leger ikke med andre hvalpe i kullet, får knoglebrud uden at have været udsat for alvorlig overlast, mangelfuld udvikling af tænder, misfarvede/glasagtige tænder, manglende tænder og knækkede tænder (22). Derudover blev der skrevet en OI-artikel af dyrlæge Jens Arnbjerg til Smådyrspraktiserende Dyrlægernes Fagblad (SDF) i 2001, for at øge opmærksomheden hos praktiserende dyrlæger overfor lidelsen og dermed øge chancen for at få sendt flere syge hvalpe ind til projektet.

Der blev dog til DGK's projekt ikke indsendt flere hvalpe, end de tre, der er kørt DNA-tests på i dette specialeprojekt. Der blev publiceret en artikel i Gravhunden året efter (2002), hvor en opdrætter beskriver "en drøm, der blev et mareridt", med beskrivelser af OI-symptomer i det førnævnte kuld; "OI-familien". Næste artikel om OI i Gravhunden (23), blev udgivet i 2015. Her bliver konkluderet, at lidelsen må være af den dominante nedarvningstype, og at mutationen er opstået under celledeling i tævens gameter, da faren til de to OI-hvalpe, er en meget brugt hanhund (med 359 afkom (24)), og der var ikke indrapporteret andre tilfælde. Da konklusionen om dominant arvegang postuleres, bliver der yderligere konkluderet, at lidelsen i Danmark ikke har nogen avlsmæssig betydning, da de raske hunde i så fald, ikke kan være bærere af OI. Senere i artiklen nævnes også den recessive form af OI, hvor årsagen blev fundet i 2009 (2), og skulle der dukke flere syge hvalpe op pga. brug af tyske hunde i den danske avl, er forfatteren af artiklen

fortrøstningsfuld, da den nyfundne gentest, let kan eliminere problemet. Der udtrykkes bekymring om relevansen af gentesten, når der tilsyneladende ikke er indrapporteret syge hvalpe (23).

I 2019 får gravhunde-opdrætter Mille Sass (25) et kuld hvalpe på 4, hvoraf den ene tævehvalp Bonni, udvikler OI-symptomer og bliver aflivet, 11 uger gammel. På det tidspunkt fortæller Mille, at hun ikke har kendskab til lidelsen og hun beretter om et langt hårdt forløb:

Det starter med, at Bonni har nedsat tilvækst, synligt efter to ugers tid. Derefter kunne hun ikke følge med de andre i kullet, da de begyndte at rejse sig og bevæge sig rundt. En dyrlæge vurderer, at hvalpen er en ”svømmer”. Et par uger senere, er Bonni stadig ikke på benene og er til dyrlæge igen, uden resultat. Lidt senere knækker Bonni en hjørnetand og Mille opdager, at tænderne er næsten gennemsigtige, hvorefter hun kommer til dyrlæge endnu en gang, som mistænker kalkmangel. Bonni begynder at give udtryk for, at hun har ondt, og er til dyrlæge igen, for at få smertestillende. Dette gav ro på i nogen tid, men ved 11-ugers alderen går Bonnis hofte af led, hvilket bekræftes med et røntgenbillede (se Figur 3). I den forbindelse bliver hun aflivet, grundet den dårlige tilvækst, hofteproblemet, smerte og de dårlige tænder. Efter aflivning opdages det, at alle Bonnis tænder er løse og dyrlægen formoder her, at Bonni har OI.

Mille tænker ikke yderligere over diagnosen, før i 2020, hvor hun tilfældigt får et tip fra en norsk opdrætter om, at OI er en kendt arvelig lidelse i racen, og at hendes hvalps symptomer lyder som OI. Bonnis mor bliver herefter DNA-testet for mutation i *SERPINH1* og det viser sig, at hun er bærer af OI. Mille får senere fortalt, at faren til Bonni før har lavet hvalpe med OI i sine i alt 23 kuld. Dette afføder et Facebook-opslag, hvor Mille har i sinde at sætte OI på dagsordenen igen hos gravhunde-folket. Her sætter hun spørgsmålstegn ved manglende gentest af OI i Danmark, samt manglende åbenhed på området (25). I januar 2021 holder DGK møde om netop dette Facebook-opslag, som nævnt i indledningen af dette specialeprojekt.

***SERPINH1* og HSP47**

Identificering af mutationen

I 2009 blev den genetiske baggrund for OI i gravhunde identificeret som følger (2): Der blev genotypet 5 syge gravhunde, samt 5 kendte anlægsbærere, med 50.000 SNPs jævnt fordelt i genomet, og resultaterne blev analyseret med henblik på at finde en genomisk region med udtalt

homozygoti og fælles alleler. De 5 syge hunde var alle homozygote i en region på 102 SNP-markører på kromosom 21 (CFA21), svarende til 5,82 Mb.

Denne region svarer til en region på det humane kromosom 11, som indeholder genet *SERPINH1*, der koder for et kollagen-bindende protein (HSP47)(2). Man vidste at, en mutation i dette gen, ødelægger kollagensyntesen og forårsager tidlig død hos mus (26). Hermed var et nyt funktionelt kandidat-gen fundet. For at bekræfte, at mutation i *SERPINH1*-genet hænger sammen med OI-fænotypen, blev 2 syge gravhunde og 2 kontrol-hunde sekventeret. Der blev fundet 12 polymorfier, hvoraf kun én SNP-allel var unik for de 2 syge gravhunde blandt de 4 sekventerede hunde. SNP'en fandtes i *SERPINH1* exon 5, og er en T>C substitution (c977T>C), der forårsager en missense mutationen, hvor leucin udskiftes med prolin i de syge hunde (p.L326P).

For yderligere bekræftelse, blev 11 syge hunde og 13 kendte anlægsbærere genotypet, med henholdsvis C/C og C/T. Yderligere 66 raske gravhunde blev genotypet, hvoraf 12 af dem blev genotypet som anlægsbærere, C/T og resten som homozygot raske, T/T. Blandt disse 66 gravhunde, blev allelfrekvensen for mutationen udregnet til 18% og mutationen sås både i den korthårede og ruhårede variant (2).

Missense mutationen i *SERPINH1*

HSP47's funktion

Type 1 kollagen er den hyppigste komponent i den ekstracellulære matrix (EM) i knogler. Forstadiet til type 1 kollagen, prokollagen, er dannet af to pro- α -1 kæder og én pro- α -2 kæde i en trippel helix struktur. Kæderne er kodet af generne *COL1A1* og *COL1A2* henholdsvis (27).

I det endoplasmatiske reticulum (ER), foldes de tre pro- α -kæder fra deres C-terminal til deres N-propeptid til trippel helix struktur (28). For at foldningen sker korrekt, hjælper forskellige enzymer og chaperon-proteiner til (29). Et af de nødvendige chaperon proteiner er HSP47, som *SERPINH1*-genet koder for (30). HSP47 stabiliserer trippel helix strukturen (31,32), og menes også at forhindre lateral tilhæftning af strukturen til ER-væggene (33), samt at beskytte den under transporten til Golgi-apparatet (4,34). I Golgi-apparatet falder pH, og dette får HSP47 til at forlade trippel helix strukturen og diffundere tilbage til ER, hvor det genbruges (35,36).

Herefter sker der en sekretion af det færdigt-foldede kollagen til den ekstracellulære matrix i knoglerne, hvor stabilitet bl.a. dannes via stærke krydsbindinger kollagen og kollagen i mellem (21).

Patomekanismen bag mutationen

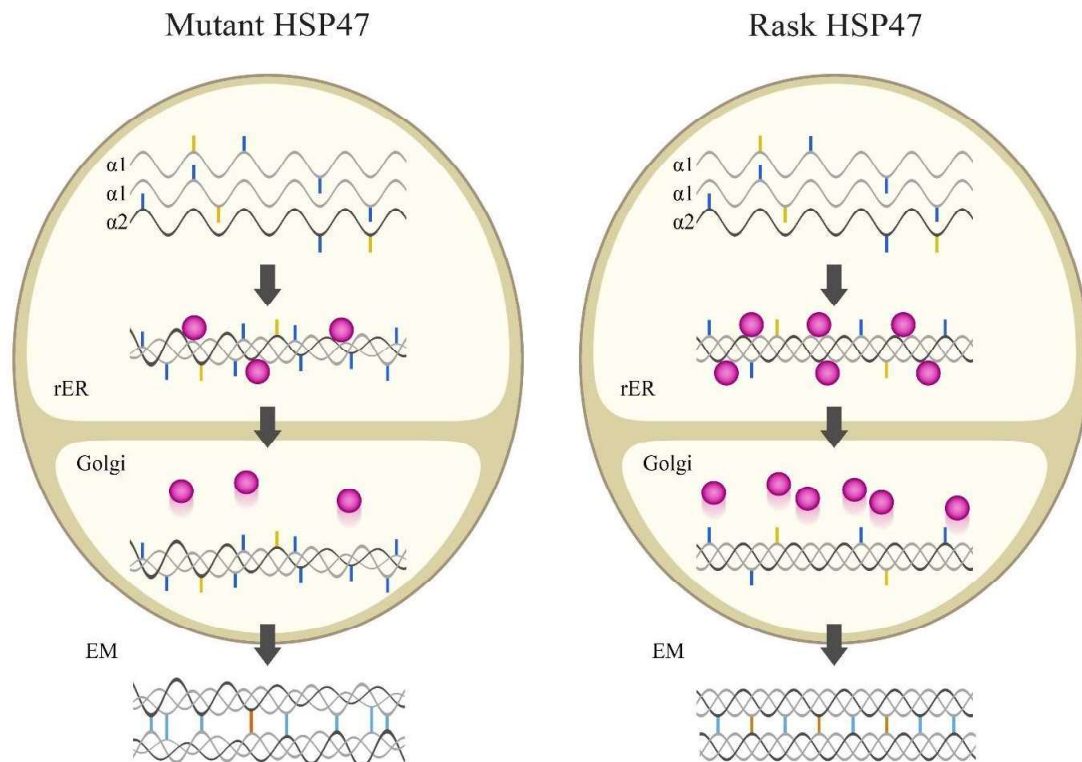
I 2015 blev der lavet et studie omkring patomekanismen bag gravhundens mutation i *SERPINH1* og de molekulære konsekvenser af det muterede HSP47. Dette afsnit vil hovedsageligt være et simplificeret resumé af nævnte studie (21).

I studiet blev der lavet flere tests. Blandt andet fandt man ud af, at mængden af HSP47 i mutant fibroblaster var halveret sammenlignet med kontrol fibroblasterne (21). Dette har dog i mus vist sig ikke at have nogle konsekvenser (37).

Derudover fandt man, at type 1 prokollagen, i mutanterne havde nedsat elektrophoretisk mobilitet sammenlignet med kontrollerne. Den nedsatte mobilitet forlænger migrationen af prokollagen, som fører til en "micro unfolding" – en mikroskopisk løsning/udfoldelse af den stramme trippel helix struktur. Den løsnede struktur, giver mulighed for overmodifikationen af kollagenet. Overmodifikationen i prokollagen skaber nye bindings sites, hvor der bl.a. sker over-glycosylering (ekstra glucosyl) i aminosyren Lysin-87 (Lys-87), samt over-hydroxylering i Lys-930, som næsten udelukkende blev til Hydroxylysin (Hyl) i mutanter (21).

Der blev også målt flere prokollagen intracellulært, og nedsat kollagen sekretion hos OI-hundene. Dette kan skyldes en forsinket foldning og intracellulær retention af prokollagen 1. Retentionen fører til et 'ER-stress-respons', grundet dilation af ER-cisternerne (21). Stress-responsen i ER mistænkes også at spille en rolle i patomekanismen, om end det ikke er bevist endnu. Mulige konsekvenser tænkes at være øget apoptosis, forringet differentiering, samt svækkede osteoblaster (31,38–40).

De overmodificerede (og færre i antal) kollagen danner efter sekretion ud i den extracellulære matrix i knoglerne, ikke normale funktionelle krydsbindinger til hinanden. Overmodificeringen fører til en markant forskudt ratio mellem hydroxylysyl pyridinoline (HP) og lysyl pyridinoline (LP) krydsbindinger, hvor der er over dobbelt så mange HP hos OI-hundene end hos kontrolhundene. Denne forskel i krydsbindingerne, samt ER stress respons, menes bl.a. at være årsag til de karakteristiske skrøbelige knogler hos hunde med OI (21).



Figur 1

Symboler i figuren: Lilla kugle; HSP47, mørkeblå stav; glucosyl-galactosyl, gul stav; hydroxylysyl; lyseblå stav; hydroxylysyl pyridinoline krydsbinding (HP), orange stav; lysyl pyridinoline krydsbinding (LP).

Patomekanisme: Løs foldning af pro-kollagens trippel helix struktur i den ru endoplasmatiske retikulum (rER), grundet nedsat funktionsevne/bindingsevne af HSP47. Den løse foldning skaber grundlag for overmodificering (bl.a. flere mørkeblå stave). Efter sekretion af kollagenet fra Golgi til den extracellulære matrix (EM), dannes herved et øget antal HP-krydsbindinger (lyseblå stave), og et nedsat antal LP-krydsbindinger (orange stave).

Klinisk sygdomsbillede

OI er en omfattende sygdom med mange symptomer, beskrevet i litteraturen i forskellig detaljegråd. Nedenfor ses Tabel 1 med overblik over de beskrevne symptomer hos forskellige hunderacer. Et ”+” angiver, at artiklen har observeret det pågældende symptom, mens et ”-” angiver, at artiklen har observeret at pågældende symptom, ikke har været til stede. Tomme felter indikerer, at artiklen ikke har angivet om pågældende symptom har været til stede.

Tabel 1

OI Sygdomsbillede fra case-rapporter

Symptomer\Ref.	(8) 2012	(17) 2003	(14) 2021	(15) 2019	(7) 2019	(16) 2018	(13) 2018	(11) 2000
Multiple frakturer	+	+	+	+	+	+	+	+
Gennem sigtige tænder	+	+	+	+	+	+		+
Smerte		+	+		+	+		+
Blålig sclera	+			+		+		
Nedsat adræthed		+	+			+	+	+
Hypermobilitet		+						
Nedsat vækst			+					-
Deformitet lemmer			+					
Ribbensfrakturer		+			+			
Almindelig appetit		+	+					
Blodprøver u.a.**		+	+		+	+		+
Årsag til OI	<i>SERPINH1</i>	Ej fundet	Ej fundet	<i>COL1A2</i>	Ej fundet	Ej fundet	<i>COL1A2</i>	Ej fundet
Race	Gravhund	Gravhund	Finsk lapphund	Lagotto	Engelsk mastiff	Dværg-pinscher	Chow chow	American Cream

*Alkaline phosphatase (ALP) på normalt niveau for en voksen hund, men for lav for en hvalp.

Knoglevækst hos hvalpe bør give forhøjet ALP.

**Uden anmærkninger relateret til knoglelidelser

De to første kolonner omhandler gravhunde; den ene med *SERPINH1* mutation som årsag, og den anden ukendt – dog sandsynligvis også *SERPINH1*, da mutationen har været i racen i flere årtier (18).

Første række, multiple frakturer, er værd at lægge mærke til. Samtlige hunde i case-rapporterne har haft mindst to frakturer. Flere af hundenes frakturer er først blevet opdaget ved røntgen eller obduktion.

Anden række, gennemsigtige tænder, er også værd at bide mærke i. Et genkendeligt karakteristikum beskrevet hos næsten alle artikler. Normalt dukker hvalpes mælketænder frem, når

de er mellem 22 og 34 dage gamle(41). Dette bør være in mente, hvis dentinogenesis imperfectum skal tages med i diagnosticeringsprocessen.

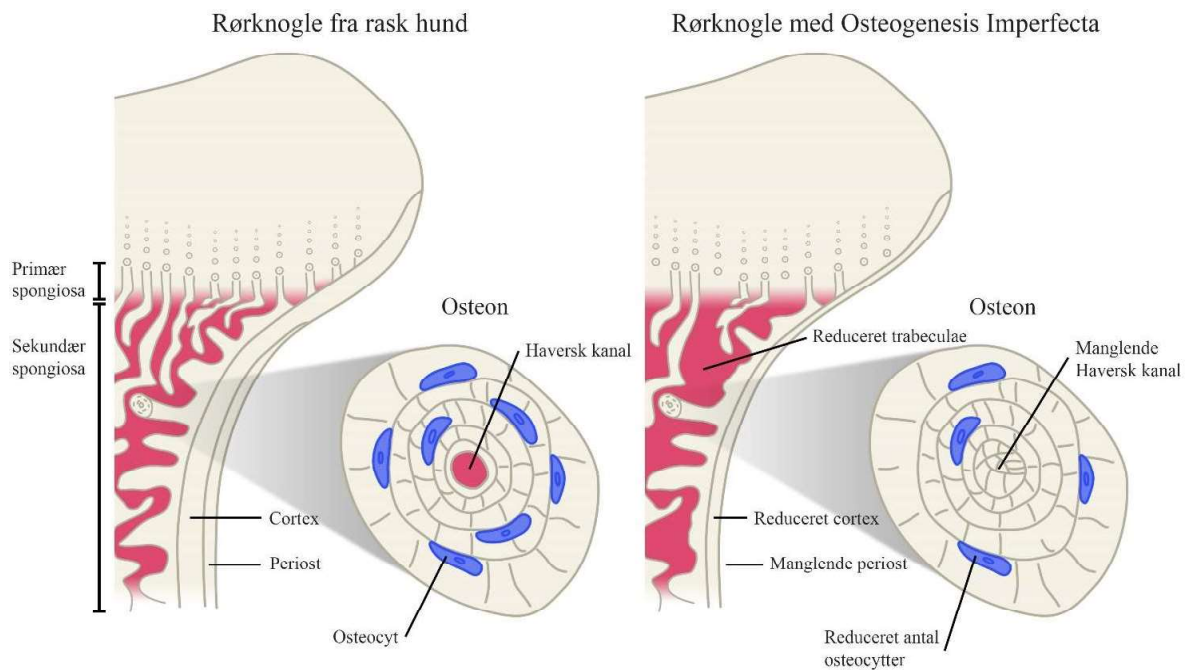
De resterende symptomer er smerte, blålig sclera, nedsat adræthed, hypermobile led, nedsat vækst/størrelse i forhold til kuldsøskende og deforme lemmer. Andre konsekvenser, som ikke kan ses hos den individuelle hund og som ikke indgår i case-rapporter/Tabel 1, er dødfødte hvalpe og reduceret kuldstørrelse (7,8). En forklaring til det føromtalt mørketal i danske OI-tilfælde. Derudover er tab af hørelse, er et klassisk OI symptom hos mennesker (5), men dette er i artiklerne ikke blevet testet eller angivet.

Hydrocephalus er en komorbiditet til OI (42), og er blevet observeret i dværgpinscher-casen (16).

Blodprøve-rækken er inkluderet i skemaet med henblik på at forklare differentialdiagnostik. Se afsnittet ”differentialdiagnoser” længere nede.

Histopatologi og røntgenforandringer

Histologi: I epifysens og fysens brusk sidder chondrocytterne i regulære kolonner hos OI-hunde, og dermed ses en primær spongiosa, som ved raske hunde (6). Der ses dog markant knaphed af trabeculae i den sekundære spongiosa i metafysen (6,7,11,13,14). Der kan også ses reduceret antal osteocytter, manglende Haverske kanaler, reduceret cortex og reduceret eller helt manglende periost (14). Alle knogler er påvirket histologisk, men forandringerne er mest udtalt i de lange rørknogler, ribben, mandiblen og i tænder (6).

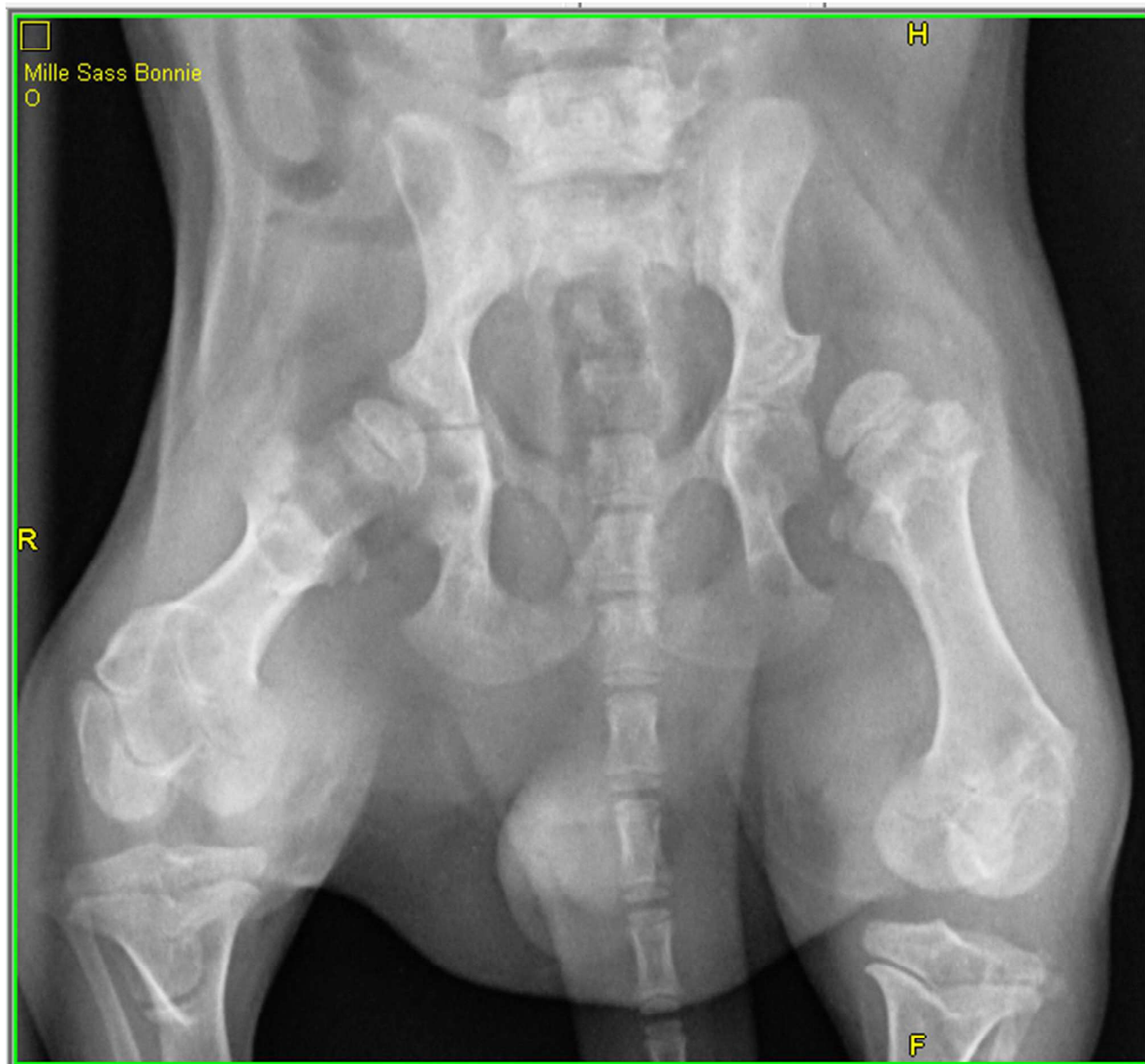


Figur 2

Illustration og sammenligning af histologiske (og makroskopiske) forskelle i en rørknogle, samt histologiske forskelle i et osteon fra en rask hund og en OI-afficeret hund. Hos den OI-afficerede hund kan ses manglende Haversk kanal og periost, samt reduceret mængde trabeculae, osteocytter og tykkelse af cortex.

Røntgen: På røntgenbilleder af OI-syge hvalpe, ses nedsat røntgenopacitet af alle knogler (diffus osteopeni) og tynd cortex i rørknoglerne. Derudover ses også multiple frakturer med eller uden callus-dannelse (2,6,7,13,14,16). I to af case-rapporterne blev fundet multiple ribbensfrakturer (6,7), og denne type af frakturer mistænkes at ske under fødslen (7).

Nedenfor ses et røntgenbillede af den indberettede hvalp, der gav anledning til førnævnte møde i DGK i januar 2021. På billedet ses en dislokeret hofte, som var anledning til røntgenbilledet. Desværre er der ikke billeder af forben og ribben, som mange af de andre hunde, i Tabel 1, havde frakturer i. Ejer beretter om symptomer såsom knækkede gennemsigtige tænder, samt smerteadfærd (25). Desværre kunne der ikke findes et lignende billede med samme egenskaber og patient-type i god nok kvalitet og standard til en brugbar sammenligning.



Figur 3

Bonni 11 uger, ruhåret gravhund med OI (25).

Andre fund

Ved obduktion af syge hvalpe, er der fundet makroskopisk synligt generel osteopeni, samt nedsat spongios knoglevæv i diafysen og metafysen (6) og multifokal mikrofrakturer i trabeculae med omkringliggende blødninger (7). Ledbrusk, sener, hud, parenchymatøse organer (nyrer, binyrer, lever, milt og pancreas), nervesystem og endokrine organer er fundet normale ved obduktion (6).

Differentialdiagnoser

Knoglelidelser hos helt unge hvalpe kan have andre årsager end OI. Når man skal stille diagnosen, kan det være en god idé at udelukke følgende (7):

1. Metabolisk betinget knoglelidelse (fx hyperparathyroidisme)
2. Ernæringsbetinget knoglelidelse
3. Frakturer forårsaget af traume.

OI-hvalpe kan have frakturer uden anamnese om traume, eller med anamnese om let traume, der ikke svarer til skadens omfang (15). Derudover ses ofte multiple frakturer, af forskellig alder (14,15,17), og på den måde differentierer OI sig fra klassisk traume. Dog kan fysisk vold/overgreb være årsag til multiple frakturer af forskellig alder (7).

For at stille diagnosen, er der brugt forskellige strategier i casene fra Tabel 1. Flere stiller diagnosen på baggrund af kliniske symptomer, som fører til røntgenbilleder med de fornævnte karakteristika, samtidig med inkludering af anamnese om passende fodring af en hvalp (16,43). Andre supplerer med hæmatologi og biokemi, som har vist sig at være uden anmærkninger hos OI-diagnosen, og i så fald kan bruges til at udelukke visse andre diagnoser (7,11,17).

En af casene beretter om hudbiopsi, som eneste definitive metode til at stille diagnosen. Her laver de en kultur af hud-fibroblaster, der danner type 1 kollagen, der så bliver analyseret med elektroforese, der kan differentiere mellem det abnorme og normale kollagen (11).

Behandling og prognose

Der findes ingen succesfuld behandling af OI hos hunde (9). Hos mennesker tyder det dog på, at langvarig behandling med farmaka af medicingruppen bisphosponater kan nedsætte risikoen for frakturer ved at inhibere osteoclast aktivitet, og dermed øge knogledannelsen (44,45). Ofte er behandling hos mennesker kombineret med fysioterapi, rehabilitering og ortopædkirurgi (9).

Ved samtlige hunde fra ovenstående case-rapporter var behandlingen eutanasi.

Laboratorie-metoder

Materiale

Formålet med DNA-prøverne, er at bestemme genetisk status på *SERPINH1* i en stikprøve af 92 gravhunde.

Disse prøver er indsamlet i samarbejde med DGK til tidligere genetik-projekter, og efterfølgende er der indhentet tilladelse hos ejerne, om at bruge blodprøverne til dette projekt også. Prøverne har derfor forskellige aldre (fra 1997 til 2020) og omfatter fortrinsvist ikke nært-beslægtede individer. 17 af hundene er dog helsøskende, og ved udregning af allelfrekvensen for mutationen, vil der blive taget højde for dette ved tilfældigt at udvælge én helsøskende per kuld. Derudover er der to af hundene, hvor begge forældre er indsendt til genotypning. Her vil afkom ikke indgå i beregningerne. I alt er der 76 hunde tilbage.

Ud af de 92 prøver, er 1 prøve fra en gravhundetæve, der har fået et kuld hvalpe, som vi også har 3 prøver fra. Af disse 3 var 2 af dem, diagnosticeret med OI og 1 rask med ukendt genotype. En af de syge hvalpes prøver, vil blive brugt som kontrol i genotypningen, til at bekræfte, at genotype resultaterne stemmer overens med hvalpens OI-fænotype, samt at moderen herefter vil bekræfte en heterozygot genotype. Se Bilag 4 for oversigt af hundene med slægtskab og genotype resultat.

De fleste af blodprøverne var allerede oprenset til DNA materiale fra de tidligere projekter, og de resterende blodprøver er blevet oprenset efter saltfældningsmetode beskrevet i Bilag 5.

Planen var at køre TaqMan assay på alle prøverne, men der kom ingen resultater ud af denne metode. Derfor skiftede vi til PCR-metode i stedet, med restriktionsenzymskæring. Begge metoder vil blive beskrevet i det følgende:

TaqMan

Et TaqMan assay blev bestilt hos Applied Biosystems ud fra den genomiske sekvens omfattende mutationen. Assayet indeholder de nødvendige primere og prober til at genotype *SERPINH1*. Til TaqMan genotypning blev der brugt 1,0 µl TaqMan assay, 10,0 µl TaqMan Universal Mix, 7,0 µl vand, samt 2 µl DNA (25 ng/ µl). I alt 20 µl i hver prøve, sat op i hvide plader. I Mx3000p maskinen, via MxPro program, blev prøverne kørt for at indsamle fluorescens data med følgende program:

1. 1 Cyklus m 50°C i 2 min.
2. 1 Cyklus m 95 °C i 10 min.
3. 45 Cykler m 92 °C i 20 sek., 60 °C i 1 min.

Efter endt program, laves scatter plots med fluorescensens dataene. Dette gav dog ikke nogen data og dermed ingen resultater. Metoden blev forsøgt to gange og derefter gik vi over til PCR med restriktionsenzym (se følgende afsnit). Protokol for TaqMan ses i Bilag 6.

PCR med restriktionsenzymskæring

Efter at førstvalgte metode slog fejl, blev det besluttet at forsøge med PCR og restriktionsenzymet Hpy991, som beskrevet af Eckardt et al. (18).

Et fragment på 451 bp, som indeholder mutation-stedet, blev amplificeret med PCR primere. ”Forward primer”, 5'-GATGGGTGGTGTGGGTAGAG-3' og ”reverse primer”, 5'-TAGCACCCATGTGTCTCAGG -3' (2). Til hver PCR-prøve blev der tilsat 1,4 µl af hver primer, 4,0 µl Qiagen buffer, 2 µl dNTP, 0,2 µl Qiagen taq hotstart polymerase, 27,0 µl nukleasefrit vand, samt 4 µl DNA (25 ng/ µl). Prøverne blev kørt i T100 maskine med følgende program: Denaturering på 95 °C i 15 min. Herefter 35 cykler af 95 °C i 30 sek., 64 °C i 30 sek. Og 72 °C i 1 min., afsluttet med 72 °C i 10 min.

Efter PCR-opformering, blev prøverne kørt via elektroforese på en 2% agarosegel med en 100 bp markør og 2 µl loading buffer ved 110 V i 25 minutter. Ved vores første forsøg, kørte vi 37 cykler i stedet for 35, men det viste det sig, at kontrolprøven med vand og ingen DNA, var kontamineret i nogle af disse forsøg. Derefter korrigerede vi cyklus-antal ned til 35 fra 37, og skiftede alle reagenserne ud med nye og dette eliminerede kontamineringen i kontrolprøven. Kun PCR-produkter uden amplifikation i vandprøven blev brugt til genotypning.

PCR-fragmenterne blev herefter oprenset med nukleasefrit vand via pladeoprensning på vakuum i cirka 10 min., før restriktionsenzym-skæring. Dette trin er ikke inkluderet i det udenlandske OI-projekts metode (18), men uden oprensning, fungerede vores skæring ikke - bekræftet ved manglende skæring af en kontrol-hund, den syge hvalp OI_3.

Det oprensede fragment skulle herefter skæres med restriktionsenzymet Hpy991, som skærer og opdeler PCR produktet i 2 fragmenter på 336 bp og 115 bp, når mutationen (C) er til stede. Således ses kun disse to fragmenter hos syge hunde (C/C), 3 fragmenter på 451 bp, 336 bp og 115 bp hos anlægsbærere (T/C) og 1 uskåret fragment på 451 bp hos homozygote raske (T/T) (18). For at

skære, blev prøverne sat op med 10 µl PCR-produkt, tilsat 7,5 µl nukleasefrit vand, 2 µl Buffer (cut smart) x10, samt 0,5 µl Hpy99I. Prøverne blev inkuberet i 1 time ved 37°C.

De skårede fragmenter blev herefter separeret via elektroforese på en 2% agarosegel ved 100 V i cirka 35-40 min., igen med 100 bp markør, samt loading buffer (4 µl). Se protokol i Bilag 7.

Gelerne med resultaterne blev fotograferet i en boks med UV-lys og prøvernes navne og placering noteret. Se Bilag 8.

Da den første bærer blev genotypet i den første skæringsgel via ovenstående metode, blev denne prøve, DDG120, samt den syge hvalp, OI_3, og en tilfældig af de raske ikke bærere, DGK196, inkluderet som kontroller i samtlige geler fremover.

Antal nødvendige prøver

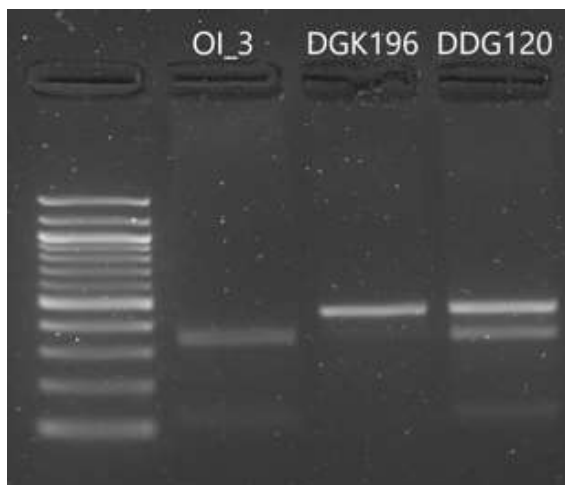
Her udregnes et estimat for antal nødvendige prøver, for at finde én anlægsbærer med 95% sikkerhed. Der er brugt følgende formel (46): $n = (1 - (1 - P)^{(1/D)}) * (N - (D - 1) / 2)$, hvor P sættes til 0,95 for 95% sikkerhed. N er antal alleler i populationen, D er antallet af C-alleler i populationen og n er stikprøvestørrelsen målt i alleler. 'n' divideres med 2, for at få antal nødvendige prøver.

For at estimere antal alleler i populationen, N, er der summeret årlige hvalpere registreringer hos DKK de sidste 13 år (ud fra gravhundes gennemsnitlige levealder) (47,48). Antallet af C-alleler i populationen, er estimeret ud fra allelfrekvensen på 0,1 fra det tyske studie (8) ganget med N. Se udregning i Bilag 9.

Resultater

For med 95% sikkerhed at finde én anlægsbærer, skal der testes 14 ruhårede gravhunde. Se udregning i Bilag 9.

Nedenfor ses et eksempel fra de mange gelelektroforese resultater. De resterende gel-billeder ses i Bilag 8.



Figur 4

De tre forskellige genotyper på 2% agarosegel efter restriktionsenzymskæring.

OI_3: C/C, DGK196: T/T, DDG120: T/C

Alle resultaterne fremgår tydeligt på gellerne i Bilag 8, men er her sat overskueligt op i Tabel 2 nedenfor:

Tabel 2

Genotype resultater

Genotype	Antal hunde	Frekvens (%)
T/T	68	89,47
T/C	8	10,53

Alleller	Antal	Allelfrekvens (%)
T	144	62,50
C	8	5,26

Genotype resultater fra gelelektroforese i Bilag 8, samt resultat fra udregning af anlægssbærer frekvens og allelfrekvens.

Resultaterne fra projektets DNA-tests viser, at stikprøven på 76 danske ruhårede gravhunde, har en anlægssbærerfrekvens på 10,53%.

Ved udregningen af anlægssbærer-frekvensen, er der taget højde for helsøskende og forældre/afkom relation blandt DNA-prøverne, som forklaret i materiale-afsnittet.

Derudover blev C/C-genotypen bekræftet for de to aflivede OI-hvalpe, samt T/C-genotype for deres mor (samt deres raske kuldsøster).

Diskussion

Fejlkilder

TaqMan metoden gav ingen resultater og vi fandt aldrig ud af hvorfor. Protokollen i Bilag 6 er blevet fulgt nøje med oprenset DNA fra blodprøver af høj kvalitet. Derudover var der gentagende problemer med PCR amplifikation i vandprøven, der har forhindret os i at gå videre med restriktionsenzymskæring op til flere gange. Ingen fejlkilde blev fundet, og der skete amplifikation trods forskellige tiltag såsom at skifte til et renere laboratorium, at lave vandprøven for sig selv og lukke den straks, inden noget DNA blev åbnet. Derudover blev der jævnligt lavet nye fortyndinger af reagenser, samt der blev brugt spidser med filter. Der er dog ikke blevet genotyperet hunde fra batches, hvor der er sket amplifikation i vandprøven og laboratorie-forhindringerne har på denne måde ikke påvirket kvaliteten af de endelige resultater.

Resultaternes anvendelse og bias

Anlægsbærerfrekvensen på 10,53% ovenfor, er ikke et retvisende billede på mutationsallelens udbredelse i Danmark, da stikprøven er biased. DNA-prøverne stammer fra tidligere projekter, og kun hunde, hvis ejere har givet tilladelse, er DNA-testet i dette speciale. Derfor kan resultaterne i dette projekt bedst bruges til at verificere, at der i Danmark findes anlægsbærere. Selvom resultatet er biased, kan det dog stadig bruges til at vurdere, om udbredelsen er høj nok til, at der skal sættes ind med avlsanbefalinger eller restriktioner. Derudover kan resultatet bruges til at bekræfte, at DNA-testen virker, og at der i de danske hunde findes OI, forårsaget af mutation i *SERPINH1*. Dette er yderligere bekræftet via genets velbeskrevne funktion i forhold til normale knogler i både hunde og mennesker (21,32,49), samt at proteinsekvensen i *SERPINH1* er velbevaret i alle hvirveldyr og hos mindst 9 forskellige testede arter, er p.326 et Leucin (2). Der er altså stærk evidens for, at OI i gravhunde skyldes mutation i *SERPINH1*.

Da der ikke har været nævneværdig selektion mod anlægsbærere, grundet et stort mørketal af syge hvalpe og manglende brug af DNA-test før avl, kan det antages, at den reelle danske anlægsbærerfrekvens ligger i nærheden af prævalenserne fra fornævnte tyske og europæiske studier på hhv. 18% (8) og 17,3% (18), og at dette projekts 10,53% må være et underestimat.

Incitamenter til OI DNA-test før avl

Den høje anlægsebærerfrekvens kan bruges i beslutningsprocessen omkring indførsel af avlsrestriktion eller avlsanbefaling hos DKK eller DGK. For en så alvorlig sygdom, er en anlægsebærerfrekvens på 10,53 høj – underestimat eller ej.

Udover den høje frekvens af anlægsebærere, er der netop en lang række andre faktorer, der taler for, at der bør testes før avl. En af disse faktorer, er lidelsens evne til at maskere sig som ”fading puppy” syndrom, eller blot ”mistrivelig hvalp”, og dermed skabe en højere dødelighed blandt unge hvalpe, og hertil hører også en forøget incidens af dødfødte hvalpe (7,8). Faktorer, som enhver opdrætter må vægte højt. En anden vigtig faktor, når man taler om mistrivelige hvalpe, er etikken omkring lidelsen. Lidelsen er forbundet med stor smerte, og i samtlige case rapporter i Tabel 1, er der indrapporteret multiple frakturer hos hvalpene. Smerten og den høje anlægsebærerfrekvens taget i betragtning, kan man diskutere, om det er god etik at parre to ruhårede gravhunde, uden at kende deres genotype for lidelsen.

Kendskab til OI er også vigtig. Hvis man ikke kender til OI, kan en omsorgsfuld opdrætter i god tro udsætte en afficeret hvalp for at langt smertefuldt og dyrt udredningsforløb, der uomtvisteligt ender med aflivning. Her spiller moral og etik også en rolle, både i forhold til at teste før avl, men også i forhold til at informere andre opdrættere om lidelsen, samt at være åben omkring mistanke til eventuelle bærere. Kendskab til OI kan derudover øges via specialklubbens avlsanbefalinger og/eller via Hundeweb. Nogle racers specialklubber gør også brug af en Racespecifik Avls Strategi (RAS), hvori der er samlet al information om relevante helbredsproblemer i racen, let tilgængelig i en pdf-fil på raceklubbens hjemmeside, som fx Norske Dachshundklubbers Forbund (NDF) (50).

Endnu en fordel ved test før avl, er muligheden for at bruge en mistænkt anlægsebærer i avl. Der kan være flere fordele ved og årsager til at bruge en anlægsebærer i avl, blandt andet for at bibeholde DNA-diversiteten i racen. Uden test, kunne man forestille sig, at en samvittighedsfuld/bekymret opdrætter ville tage sin hund ud af avl, efter den har fået OI-afkom og eventuelt fraråde avl fra det resterende raske afkom. På den måde kan en avlslinje ende brat og DNA-diversitet i racen mindskes på sigt. Derimod ville man kunne beholde hunden i avl ved brug af DNA-test hos både hunden og kommende avlspartner. Med en klassisk autosomal recessiv arvegang og en god valideret DNA-test, er der ingen risiko for OI-hvalpe, når man parrer en anlægsebærer med en avlspartner, der er testet fri. Se Tabel 3 nedenfor, for en opsummering af incitamenter til at indføre avlsrestriktion med DNA-test før avl.

Tabel 3

Incitament er til OI DNA-test før avl
Lidelsen er smertefuld
Dødeligt udfald hos afficerede hvalpe
Høj anlæg s bærerfrekvens i racen
OI giver øget antal dødfødte hvalpe
Prævalens falder ikke uden brug af test
Mulighed for at bruge mistænkt bærer i avl
DNA-testen er valideret

Se tekst for uddybelse af incitamenterne.

DNA-diversitet og konsekvensen af indførsel af test før avl

En vigtig overvejelse og konsekvens ved DNA-test er, at det kan mindske DNA-diversiteten i racen, hvis man ved avl fravælger anlæg**s**bærere. En sådan fravælgelse sker ofte i praksis, trods muligheden for at parre en anlæg**s**bærer (T/C) med en homozygot rask (T/T). Hvis alle gravhunde-opdrættere i deres fremtidige avl, fravælger de 10,53-18% anlæg**s**bærere i racen, kan det få katastrofale følger for genpuljen. I følgende afsnit diskuteres løsninger til at komme en mindsket DNA-diversitet i forkøbet.

Ønsker man som opdrætter at eliminere mutationsallelen for OI i sit opdræt, uden at mindske DNA-diversiteten i racen som helhed, kan man med fordel teste hele sit kuld inden udvælgelse af den/de hvalpe, man ønsker at beholde eller viderebringe til kommende avl. Vil man beholde en tæve fra sit kuld efter en bærer/fri-parring, kan man fx lade alle sine tævehvalpe blive testet inden de flytter hjemmefra. Der skal selvfølgelig stadig tages højde for andre helbredsmæssige faktorer, samt eksteriør, temperament osv.

Med en lukket stambog, som er standarden ved DKK, er der en begrænset genpulje i en race og jo flere regler, restriktioner og anbefalinger, man avler efter, jo hurtigere reduceres DNA-diversiteten. Indavlskoefficienten (COI) er allerede meget høj hos gravhunde og mange andre hunderacer (51) og uden muligheden for at tilføje nyt DNA til racen, skal opdrættere være meget omhyggelige for bevare diversiteten i den eksisterende genpulje.

Gravhunde har på www.hundeweb.dk (52), avlskrav om en ryg-status (K0-K5) og ingen kryptorkisme. Derudover er der anbefaling om K2 eller bedre status på ryg, og at mindst én forælder er genetisk fri for CRD-PRA. Med hensyn til parringer varianter i mellem, er der forbud mod parring mellem pelsvarianterne, men ingen restriktioner mellem størrelsesvarianterne. Ud fra

et genetisk og sundhedsmæssigt synspunkt, kunne man overveje at åbne op for parring pelsvarianterne i mellem og i det følgende perspektiveres til nabolandene Norge og Sverige.

For at undgå en ny fænotype i racen (kombination af homozygot langhårs plus en eller to ruhårs-alleler, med pels-fænotype lig en Skye Terrier), kan man starte med at åbne op kun for parring mellem korthårs- og ruhårsvarianten. Dette har de gjort i Norge, men under forudsætning, at den korthårede forælder, er testet fri for langhårs-allel (50). I Norge må man dog, i modsætning til Danmark, kun parre hver størrelsesvariant med nærmeste størrelse – dvs. miniature og standard gravhund må ikke sættes sammen, men dværgstørrelsen må frit parres med de to andre størrelser. I Sverige bærer deres RAS generelt præg af et højt ønske om DNA-diversitet, og de har dermed fri parring mellem alle pels- og størrelsesvarianter (53). Dette dog ikke uden problemer, hvis man avler efter racestandarden – problemer der dog kan løses ved hjælp af genotypning af pelstypen før avl.

I hver pelsvariant findes pelsfarver, der ved kombination, kan skabe farver, som ifølge racestandarden ikke er godkendte. Det er diskvalificerende fejl, hvis en rød-pelset eller brindle gravhund har brunt pigment på næse og trædepuder (54). Brunt pigment findes dog naturligt i racen og er godkendt i den tofarvede pelsfarve (brun med tan-markeringer), i vildsvinefarven, samt i merle. Derudover godkendes vildsvinefarven (racestandardens betegnelse for agouti/vildtfarve) udelukkende hos de ruhårede gravhunde. Andre uønskede farvekombinationer inkluderer tofarvede med brindle i aftegningerne, vildsvinefarve med brindle eller merle, samt brindle med merle. Ud fra et genetisk synspunkt, skaber racestandarden på denne måde en unaturlig og (DNA-mæssig) unødvendig barriere for fri krydsning mellem både forskellige pelsfarver, samt de forskellige pelsvarianter. For at undgå ikke-godkendte farver som følge af en kompleks kombination af dominante og recessive farvealleler på forskellige loci, kan opdrættere føle sig nødsaget til kun at avle i rene linjer, dikteret af racestandardens påbud. Disse linjer vil typisk kun bestå af 1-3 farver, der er kompatible, og som man har erfaring med, ikke kan skabe de uønskede farver. Resultatet er, at racestandardens farveregler forårsager opdelinger internt i racen, som mindsker DNA-diversiteten drastisk og dermed fremskynder en forhøjet indavlskoefficient.

Hos andre racer, kan indavlskoefficienten, hvis den bliver faretruende høj, mindskes ved hjælp af outcrossing projekter (kontrolleret krydsning med andre racer). Outcrossing har både fordele og ulemper, men hos gravhunde er man så heldig, at alle varianterne ligner hinanden og til sammen har en større genpulje, og derfor kan der med fordel ”outcrosses” internt i racen, varianterne i mellem, uden de klassiske outcrossing-ulemper. Hvis DGK og DKK er interesseret i de helbredsmæssige fordele ved højere DNA-diversitet, og vil forebygge et dyk i den forkerte retning som følge af

endnu en avlsrestriktion (OI), vil det være en god idé at kigge på ovenstående muligheder omkring parring mellem pelsvarianterne. Et løft af forbuddet mod de ikke-godkendte farver, ville dog kræve en indsats hos racens hjemland; Tyskland.

Alle de ikke-godkendte farver, er fri for farve-relaterede lidelser, i modsætning til merle (dobbelte merle problematikken). Dette er dog af hensyn til pladsmangel ikke inkluderet i denne diskussion.

Konklusion

Mutationsallelen i genet *SERPINH1*, der forårsager OI i ruhårede gravhunde, har eksisteret i flere årtier i racen. Mutationen er en missense mutation på kromosom 21, i codon 977, hvor nukleotiden T bliver til C, der fører til substitution af leucin til prolin i aminosyre nr. 326 i proteinet.

Denne ændring i aminosyren forringer kvaliteten og mængden af *SERPINH1*'s protein HSP47. Dette protein er essentielt for dannelsen af normale kollagen type 1 i den ru endoplasmatiske retikulum og dets vej gennem Golgi-apparatet, ud til den ekstracellulære matrix. Det muterede HSP47 fejlfolder kollagenets trippel helix struktur og danner mulighed for binding af de forkerte krydsbindingsmolekyler. Dette svækker bindingerne internt mellem kollagen, og da knogler hovedsageligt er bygget op af kollagen, bliver konsekvensen ekstremt svage knogler.

Udover skrøbelige knogler, ses også en række andre symptomer hos hvalpe født med mutationen. Nedsat størrelse/tilvækst, smerteudbrud, blålig sclera, dentinogenesis imperfecta (glastænder), samt evt. hypermobile led og skæve lemmer. Et ukendt antal hvalpe er dog dødfødte eller dør kort efter fødsel, og når sjældent at få diagnosen. Dette skaber et mørketal, der er en af de afgørende årsager til, at lidelsen har fået lov at husere i racen uden tiltag indtil nu.

De hvalpe, der overlever, får ofte diagnosen på baggrund af en eller flere frakturer, som de kommer til dyrlæge med. Der findes ingen optimal behandling af de syge hvalpe, og kutymen er derfor aflivning. For at undgå at få syge/døde hvalpe, har DGK ønsket et estimat af OIs udbredelse i Danmark, samt en validering af DNA-testen, med henblik på evt. at indføre avlsrestriktioner.

DNA-testen er valideret via DNA fra to syge hvalpe og deres mor, som henholdsvis viste sig at have genotyperne C/C, C/C og T/C. Derudover er 76 andre ikke-nært beslægtede ruhårede gravhunde blevet genotypet, hvoraf 8 anlægsbærere blev fundet. Dette giver en anlægsbærerfrekvens på 10,53%, som dog vurderes at være et underestimat, grundet metoden for indsamling af prøver. OI findes altså i vid udstrækning i racen, og da det er en smertefuld lidelse med dødelig udgang, uden mulighed for behandling, anbefales det at indføre avlsrestriktioner, hvor der DNA-testes inden avl. OI har en autosomal recessiv arvegang, og dermed kan anlægsbærere

bruges i avl, i kombination med en homozygot fri. Grundet den høje andel af anlægsbærere i racen, er det vigtigt ikke bevidst at fravælge anlægsbærere i avl, da der på denne måde dannes en flaskehals-effekt, hvor racens genpulje mindskes. Ved fornuftig brug af DNA-testen, kan det dog helt undgås at lave syge OI-hvalpe.

Perspektivering

Vidensdeling på tværs af landegrænser

Selvom både Norge og Sverige har omfattende RAS-dokumenter, er der ingenting at finde om OI (50,53). Der sker dog jævnligt udveksling af avlsmateriale mellem de europæiske lande, især i Skandinavien, og det må derfor formodes, at OI også findes i Norge og Sverige.

Derfor vil det være aktuelt at lave undersøgelser for OI hos gravhunde i disse lande, med efterfølgende indførsel af avlsrestriktioner ud fra resultater af undersøgelserne. Da det i begge lande er tilladt at parre ruhårede med andre pelsvarianter, kan OI have spredt sig til disse og dette skal der tages højde for i kommende undersøgelser. Der er ligeledes risiko for, at mutationen findes i lav grad i de danske korthårede og langhårede varianter.

Herfra lyder en opfordring til at DGK kontakter de norske og svenske gravhundeklubber, og deler viden om OI. Tysklands undersøgelse fandt sted i 2012 (og DNA-testen udviklet i 2009), og med en højprævalent, smertefuld og dødelig lidelse, kunne et effektivt og godt samarbejde, samt organiseret vidensdeling mellem de europæiske gravhundeklubber, være ønskeligt.

Litteraturliste

1. Dansk Gravhunde Klub. Referat af møde omkring validering af DNA-tests for Osteogenesis Imperfecta.
2. Drögemüller C, Becker D, Brunner A, Haase B, Kircher P, Seeliger F, m.fl. A Missense Mutation in the SERPINH1 Gene in Dachshunds with Osteogenesis Imperfecta. Barsh GS, redaktør. PLoS Genet. 24. juli 2009;5(7):e1000579.
3. Basel D, Steiner RD. Osteogenesis imperfecta: Recent findings shed new light on this once well-understood condition. Genet Med. juni 2009;11(6):375–85.
4. Nagata K. Expression and function of heat shock protein 47: A collagen-specific molecular chaperone in the endoplasmic reticulum. Matrix Biol. februar 1998;16(7):379–86.
5. Rauch F, Glorieux FH. Osteogenesis imperfecta. The Lancet. 24. april 2004;363(9418):1377–85.
6. Seeliger F, Leeb T, Peters M, Brüggemann M, Fehr M, Hewicker-Trautwein M. Osteogenesis Imperfecta in Two Litters of Dachshunds. Vet Pathol. september 2003;40(5):530–9.
7. Gold R, Pool RR, Edwards EE. Osteogenesis and dentinogenesis imperfecta in a four-month-old English mastiff. Vet Rec Case Rep [Internet]. september 2019 [henvist 22. marts 2022];7(3). Tilgængelig hos: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1136/vetreccr-2019-000835>
8. Schutz E, Drogemuller C, Leeb T, Scharfenstein M, Brenig B. Osteogenesis imperfecta im Dackel. Kleintierpraxis; 2012.
9. Campbell BG, Wootton J a. M, Krook L, DeMarco JA, Minor RR. Clinical signs and diagnosis of osteogenesis imperfecta in three dogs. J Am Vet Med Assoc. 15. juli 1997;211(2):183-.
10. Campbell BG, Wootton J a. M, MacLeod JN, Minor RR. Sequence of normal canine COL1A1 cDNA and identification of a heterozygous alpha 1(I) collagen Gly208Ala mutation in a severe case of canine osteogenesis imperfecta. Arch Biochem Biophys. 1. december 2000;384(1):37–46.
11. Lazar T, deHaan JJ, Peck JN, Campbell B, Ginn P, Phillips L, m.fl. Osteogenesis imperfecta in Three Dogs from a Single Litter. Vet Comp Orthop Traumatol. 2000;13(01):23–7.
12. Campbell BG, Wootton J a. M, Macleod JN, Minor RR. Canine COL1A2 mutation resulting in C-terminal truncation of pro-alpha 2(I) and severe osteogenesis imperfecta. J Bone Miner Res. juni 2001;16(6):1147–53.
13. Quist EM, Doan R, Pool RR, Porter BF, Bannasch DL, Dindot SV. Identification of a Candidate Mutation in the COL1A2 Gene of a Chow Chow With Osteogenesis Imperfecta. Murphy W, redaktør. J Hered. 16. marts 2018;109(3):308–14.

14. Tse MY, Porter IR, Demeter E, Behling-Kelly E, Wakshlag JJ, Miller AD. Osteogenesis Imperfecta in Two Finnish Lapphund Puppies. *Vet Med Res Rep.* juni 2021;Volume 12:177–85.
15. Letko A, Zdora I, Hitzler V, Jagannathan V, Beineke A, Möhrke C, m.fl. A de novo in-frame duplication in the COL1A2 gene in a Lagotto Romagnolo dog with osteogenesis imperfecta. *Anim Genet.* december 2019;50(6):786–7.
16. Costa PPC, Custódio J, Ebina FS, Da Silva LL, Da Cunha PE, De Vasconcelos RH, m.fl. Osteogenesis imperfect in an young pinscher dog. *Acta Sci Vet.* 26. juni 2018;46:5.
17. Seeliger F, Leeb T, Peters M, Brüggmann M, Fehr M, Hewicker-Trautwein M. Osteogenesis Imperfecta in Two Litters of Dachshunds. *Vet Pathol.* september 2003;40(5):530–9.
18. Eckardt J, Kluth S, Dierks C, Philipp U, Distl O. Population screening for the mutation associated with osteogenesis imperfecta in dachshunds. *Vet Rec.* april 2013;172(14):364–364.
19. DTK 1888 e.V. - Startseite [Internet]. [henvist 22. marts 2022]. Tilgængelig hos: <https://www.dtk1888.de/>
20. teckelklub-nordheide - Züchter/Zucht [Internet]. [henvist 2. maj 2022]. Tilgængelig hos: <https://teckelklub-nordheide.de/Zuechter/Zucht/>
21. Lindert U, Weis MA, Rai J, Seeliger F, Hausser I, Leeb T, m.fl. Molecular Consequences of the SERPINH1/HSP47 Mutation in the Dachshund Natural Model of Osteogenesis Imperfecta. *J Biol Chem.* juli 2015;290(29):17679–89.
22. Hansen M. Gravhunden. 2001;14–5.
23. Nørgaard O. Gravhunden. 2015;36–7.
24. DKK [Internet]. [henvist 9. maj 2022]. Tilgængelig hos: https://www.hundeweb.dk/dkk/public/openIndex?ARTICLE_ID=1
25. Sass M. Personlig kommunikation.
26. Ishida Y, Kubota H, Yamamoto A, Kitamura A, Bachinger HP, Nagata K. Type I collagen in Hsp47-null cells is aggregated in endoplasmic reticulum and deficient in N-propeptide processing and fibrillogenesis. *Mol Biol Cell.* maj 2006;17(5):2346–55.
27. Rohrbach M, Giunta C. Recessive osteogenesis imperfecta: Clinical, radiological, and molecular findings. *Am J Med Genet Part C-Semin Med Genet.* 15. august 2012;160C(3):175–89.
28. Engel J, Prockop D. The Zipper-Like Folding of Collagen Triple Helices and the Effects of Mutations That Disrupt the Zipper. *Annu Rev Biophys Biophys Chem.* 1991;20:137–52.
29. Lamande SR, Bateman JF. Procollagen folding and assembly: The role of endoplasmic reticulum enzymes and molecular chaperones. *Semin Cell Dev Biol.* oktober 1999;10(5):455–64.

30. Nagata K. Hsp47: A collagen-specific molecular chaperone. *Trends Biochem Sci.* januar 1996;21(1):23–6.
31. Makareeva E, Leikin S. Procollagen Triple Helix Assembly: An Unconventional Chaperone-Assisted Folding Paradigm. *Plos One.* 10. oktober 2007;2(10):e1029.
32. Widmer C, Gebauer JM, Brunstein E, Rosenbaum S, Zaucke F, Drögemüller C, m.fl. Molecular basis for the action of the collagen-specific chaperone Hsp47/SERPINH1 and its structure-specific client recognition. *Proc Natl Acad Sci.* 14. august 2012;109(33):13243–7.
33. Thomson CA, Ananthanarayanan VS. Structure-function studies on hsp47: pH-dependent inhibition of collagen fibril formation in vitro. *Biochem J.* 1. august 2000;349 Pt 3:877–83.
34. Smith T, Ferreira LR, Hebert C, Norris K, Sauk JJ. Hsp47 and cyclophilin B traverse the endoplasmic reticulum with procollagen into pre-Golgi intermediate vesicles. A role for Hsp47 and cyclophilin B in the export of procollagen from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 4. august 1995;270(31):18323–8.
35. Nakai A, Satoh M, Hirayoshi K, Nagata K. Involvement of the Stress Protein Hsp47 in Procollagen Processing in the Endoplasmic-Reticulum. *J Cell Biol.* maj 1992;117(4):903–14.
36. Satoh T, Yamada M, Iwasaki T, Mori M. Negative regulation of the gene for the preprothyrotropin-releasing hormone from the mouse by thyroid hormone requires additional factors in conjunction with thyroid hormone receptors. *J Biol Chem.* 1. november 1996;271(44):27919–26.
37. Nagai N, Hosokawa M, Itohara S, Adachi E, Matsushita T, Hokawa N, m.fl. Embryonic lethality of molecular chaperone Hsp47 knockout mice is associated with defects in collagen biosynthesis. *J Cell Biol.* 18. september 2000;150(6):1499–505.
38. Chessler S, Byers P. Bip Binds Type-I Procollagen Pro-Alpha-Chains with Mutations in the Carboxyl-Terminal Propeptide Synthesized by Cells from Patients with Osteogenesis Imperfecta. *J Biol Chem.* 25. august 1993;268(24):18226–33.
39. Forlino A, Tani C, Rossi A, Lupi A, Campari E, Gualeni B, m.fl. Differential expression of both extracellular and intracellular proteins is involved in the lethal or nonlethal phenotypic variation of BrtlIV, a murine model for osteogenesis imperfecta. *Proteomics.* juni 2007;7(11):1877–91.
40. Makareeva E, Aviles NA, Leikin S. Chaperoning osteogenesis: new protein-folding disease paradigms. *Trends Cell Biol.* marts 2011;21(3):168–76.
41. Roccaro M, Peli A. Age determination in dog puppies by teeth examination: legal, health and welfare implications, review of the literature and practical considerations. *Vet Ital.* 14. juli 2020;56(3):149–62.
42. Cole DE, Carpenter TO. Bone fragility, craniosynostosis, ocular proptosis, hydrocephalus, and distinctive facial features: a newly recognized type of osteogenesis imperfecta. *J Pediatr.* januar 1987;110(1):76–80.

43. Quist EM, Doan R, Pool RR, Porter BF, Bannasch DL, Dindot SV. Identification of a Candidate Mutation in the COL1A2 Gene of a Chow Chow With Osteogenesis Imperfecta. Murphy W, redaktør. J Hered. 16. marts 2018;109(3):308–14.
44. Bembi B, Parma A, Bottega M, Ceschel S, Zanatta M, Martini C, m.fl. Intravenous pamidronate treatment in osteogenesis imperfecta. J Pediatr. oktober 1997;131(4):622–5.
45. Yazan H, Güneş N, Akpınar E, Özyalvaç ON, Uludağ Akkaya D, Tuysuz B. Effects of Long-Term Pamidronate Treatment on Bone Density and Fracture Rate in 65 Osteogenesis Imperfecta Patients. Turk Arch Pediatr. september 2021;56(5):474–8.
46. Houe H, Annette KE, Toft N, Jens FGA. Veterinary epidemiology. From hypothesis to conclusion. 2nd udg. Bd. 2003. Department of Animal Science and Animal Health, The Royal Veterinary and Agricultural University, Frederiksberg, Denmark.: University of Copenhagen; 265 s.
47. Sugiura MI and NCLK and K. Estimating the life expectancy of companion dogs in Japan using pet cemetery data | EndNote Click [Internet]. [henvist 25. maj 2022]. Tilgængelig hos: <https://click.endnote.com/viewer?doi=10.1292%2Fjvms.17-0384&token=WzE5Mzk3MDAsIjEwLjEyOTIvanZtcy4xNy0wMzg0Il0.M6xqBzmigiZ4X2ShXIsY4wRWWkg>
48. Dansk Kennel Klub [Internet]. Årlige Registreringstal. [henvist 22. marts 2022]. Tilgængelig hos: www.dkk.dk
49. Carriero A, Enderli T, Burtch S, Templet J. Animal models of osteogenesis imperfecta: applications in clinical research. Orthop Res Rev. september 2016;Volume 8:41–55.
50. Sunnhetsutvalg og Avlsråd [Internet]. Norske Dachshundklubbers Forbund. [henvist 25. maj 2022]. Tilgængelig hos: <https://norskedachshundklubbersforbund.org/ndf-styret-utvalg-lokalklubber/sunnhetsutvalget/>
51. Dreger DL, Rimbault M, Davis BW, Bhatnagar A, Parker HG, Ostrander EA. Whole-genome sequence, SNP chips and pedigree structure: building demographic profiles in domestic dog breeds to optimize genetic-trait mapping. Dis Model Mech. 1. december 2016;9(12):1445–60.
52. Racerestriktioner / sundhedsoplysninger [Internet]. [henvist 25. maj 2022]. Tilgængelig hos: <https://www.hundeweb.dk/dkk/public/openPage/tjenester/avlsrestriksjoner/raseData.html?RAID=1487>
53. Avel | Svenska Taxklubben [Internet]. [henvist 25. maj 2022]. Tilgængelig hos: <https://taxklubben.org/avlb/>
54. Federation Cynologique Internationale [Internet]. [henvist 13. maj 2020]. Tilgængelig hos: <http://www.fci.be/en/>

Bilag

Bilag 1

Tysk avlsanbefaling fra oktober 2016

Checkliste für den Zucht-Einsatz eines Teckels mit DTK-oder FCI-Ahnentafel im Deutschen Teckelklub:

- ▶ Zuchtzulassender Formwert, erworben auf einer Zuchtschau im Alter von mindestens 9 Monaten (bzw. eingemessen als Kaninchenteckel/ Zwergteckel mit 15 Monaten), mindestens „sehr gut“; Formwert „gut“ mit jagdlichen Leistungszeichen
- ▶ Mindestalter: 15 Monate
- ▶ Höchstalter bei Hündinnen: Vollendung des 8. Lebensjahres
- ▶ DNA-Analyse
- ▶ Abstammungsnachweis
- ▶ Sp oder jagdliche Prüfung oder Wa.T. oder BHP
- ▶ Bei Tigerteckeln muss der Partner durch einen Gen-Test nachweisen, dass er das Merle-Gen NICHT trägt (ZEB 2.3.4)
- ▶ Gültiger Impfschutz gegen SHLP-T
- ▶ Inzest bei Partnerwahl ausschließen
- ▶ Hündinnen: Zuchtpausen von zehn Monaten bezogen auf den vorherigen Wurfstag beachten
- ▶ Freiwilliger Gen-Test auf Osteogenesis imperfecta (Glasknochenkrankheit) für die Haarart Rauhaar empfohlen!

Genaue Regelungen sind den Zucht-und Eintragungsbestimmungen zu entnehmen

NTK Stand 10/2016

Bilag 2

Tysk avlsrestriktion fra 01.072019

Zuchtzulassung: OI-Untersuchung für Rauhaarteckel

Beschlussfassung des geschäftsführenden Vorstands:

Die in der ZEB unter Punkt 2.3. aufgeführten Zuchtzulassungsbedingungen werden ab dem 01.07.2019 für Rauhaarteckel -aller Größen- dahingehend erweitert, dass vor einer Anpaarung ein Zuchtpartner auf OI (Osteogenesis Imperfecta) getestet sein muss. Ist dieser OI-Träger, so darf die Anpaarung nur mit einem OI-freien Zuchtpartner erfolgen. Dies betrifft auch die Hunde, die bereits zur Zucht eingesetzt worden sind.

Basis dieser Entscheidung ist die Stichprobe von 500 untersuchten Teckeln, wovon die OI-Träger-Quote im Bereich der RH-Nt= 19,25%, RH-Zw= 17,71% und RH-Kt=4% zu einer auf die Haarart bezogene Gesamtquote von 18,51% führt. Vermutlich sind diese Zahlen nicht für die Gesamtpopulation der RH-Teckel repräsentativ. Um in dieser Frage jedoch Sicherheit zu erhalten, wurde die vorbeschriebenen Untersuchungspflicht beschlossen. Die Züchter werden zukünftig jährlich zur Situation informiert, gleichzeitig wird der geschäftsführende Vorstand seine Beschlusslage regelmäßig überprüfen.

Das Zahlenmaterial weist keine Trägerschaften bei Kurzhaar- und Langhaarteckeln aus, weshalb sich die Maßnahme auf die Rassen der Rauhaarteckel bezieht.

Der DTK nimmt damit seiner aus dem Tierschutzgesetz herzuleitenden Fürsorgepflicht wahr.

Bilag 3

Den tyske gravhundeklubs avlsanbefalinger og avlskrav

Legende (Stand 24.01.2022)

Pflichtuntersuchung vor Zuchteinsatz, OI und CDN/MY05 muss ein Zuchtpartner trägerfrei
Ausdrücklich empfohlen durch Zuchtverband

x
(x)

Pflichtuntersuchung u.a. f. Importhunde sowie Anpaarungen ein/zweif. Hunde mit "gefleckten"
(Tigerteckel) und gestromte Teckel

x*

gilt ebenfalls für Umsetzungen aus ZB Kleintekel

**

DNA-Untersuchungen in der Teckelzucht

	DNA-Identitätsprofil Abstammungsnachweis	OI (Osteogenesis Imperfecta)	crd/PRA (cone-rod dystrophy) frühe Form der prog. Retinaatrop.	Merle	cord 1*
Rauhaar Normalteckel	x	x	(x)	x*	(x)**
Rauhaar Zwergteckel	x	x	(x)	x*	(x)**
Rauhaar Kaninchenteckel	x	x	(x)	x*	(x)**
Kurzhaar Normalteckel	x			x*	
Kurzhaar Zwergteckel	x			x*	
Kurzhaar Kaninchenteckel	x			x*	
Langhaar Normalteckel	x			x*	**
Langhaar Zwergteckel	x			x*	(x)**
Langhaar Kaninchenteckel	x			x*	(x)**

* eingeschr. aussagef. des Tests ist zu beachten

Bilag 4

Oversigt over OI DNA prøver m genotype, slægtsskab og fødselsår

Oversigt: OI DNA prøver

Lab nr.	Genotype	Fødselsår/Kommentar
Blå: To forældre + afkom. Forældres genotype er farvet og ikke brugt.		
Rød: Helsøskende. Tilfældig søskendes genotype er farvet og ikke brugt.		
DDG237	T/T	2010
DDG170	T/T	2008. Afkom af DDG87 og DGK113
DGK114	T/T	2010. Afkom af DDG237 og DGK113
DGK113	T/T	2005
DGK20	T/T	2001
DDG67	T/T	2000
DGK18	T/C	2008

DDG71	T/T	2000
DDG68	T/T	2000
DDG303	T/T	2016
DDG26	T/C	2003
DGK78	T/T	2003
DDG118	T/T	2007
DGK69	T/T	2012
DGK240	T/T	2017
DDG25	T/C	2004
DDG8	T/T	2003
DDG91	T/T	2006
DGK3	T/T	2003. DGK3, DGK2 og DDG87 er helsøskende.
DGK2	T/T	2003. DGK3, DGK2 og DDG87 er helsøskende.
DDG87	T/T	2003. DGK3, DGK2 og DDG87 er helsøskende.
DGK13	T/T	2003
DDG364	T/T	2017. DDG364 og DDG363 er helsøskende.
DDG363	T/T	2017. DDG364 og DDG363 er helsøskende.
DGK288	T/T	2020
DGK149	T/T	2015
DGK133	T/T	2013
DGK115	T/T	2011
DGK132	T/T	2007
DGK83	T/T	2013
DGK274	T/T	2018. DGK274 og DGK276 er helsøskende.
DGK276	T/T	2018. DGK274 og DGK276 er helsøskende.
DGK290	T/T	2020
DDG490	T/T	2019
DDG515	T/T	2020
DDG463	T/T	2019
DDG304	T/T	2018. DDG304, DDG306 og DDG311 er helsøskende.
DDG306	T/T	2018. DDG304, DDG306 og DDG311 er helsøskende.
DDG311	T/T	2018. DDG304, DDG306 og DDG311 er helsøskende.
DDG464	T/T	2019
DDG397	T/T	2018
DGK81	T/T	2014
DGK84	T/T	2012
DGK80	T/T	2014
DDG465	T/T	2019
DDG479	T/T	2019
DGK10	T/T	2007

DGK9	T/T	2002. DGK9 og DGK8 er helsøskende.
DGK8	T/C	2002. DGK9 og DGK8 er helsøskende.
DGK85	T/T	2013
DGK159	T/T	2013
DGK168	T/T	2015
DDG289	T/T	2015
DDG393	T/T	2019. DDG393 og DDG387 er helsøskende.
DDG387	T/T	2019. DDG393 og DDG387 er helsøskende.
DGK101	T/T	2013
DDG187	T/T	2004
DDG134	T/T	2002
DGK225	T/C	2013
DGK300	T/T	2020
DGK246	T/T	2014
DDG475	T/T	2019
DGK245	T/T	2013
DDG495	T/T	2019. DDG495 og DDG494 er helsøskende.
DDG494	T/T	2019. DDG495 og DDG494 er helsøskende.
DGK188	T/T	2012
DDG45	T/T	2005
DGK184	T/T	2009
DDG288	T/T	2016
DDG324	T/T	2017
DGK41	T/T	2007
DGK106	T/T	2014. DGK106 og DGK105 er helsøskende.
DGK105	T/T	2014. DGK106 og DGK105 er helsøskende.
DGK154	T/T	2014
DGK167	T/T	2008
DGK152	T/C	2011
DDG280	T/T	2015
DDG12	T/C	2005. DDG12 og DDG13 er helsøskende.
DDG13	T/T	2005. DDG12 og DDG13 er helsøskende.
DGK287	T/T	2018
DDG456	T/T	2019
DDG441	T/T	2019
DGK173	T/T	2013
DGK181	T/T	2014
DGK286	T/T	2017
DGK196	T/T	2012
DDG1	T/T	1999
DDG120	T/C	2005
DGK25	T/C	2004

"OI-familien" fra 2000

OI_1	T/C	1997. Mor til aflivede hvalpe
OI_2	C/C	2000. Aflivet hvalp
OI_3	C/C	2000. Aflivet hvalp
OI_4	T/C	2000. Rask kuldsøster til de to aflivede hvalpe

Ikke genotyperet

DGK273	Slog fejl	2018
???	Væk	2016. Søskende til DDG288
DDG242	Væk	2012

Bilag 5

DNA ekstraktion af EDTA blod via saltfældning

2 dags DNA ekstraktion fra EDTA-blood

Dag 1.

1. **Der arbejdes i stinkskab og benyt handsker.** Overfør al blod til et mærket 50 mL rør og husk at skrive mængden af blod på hvert rør. Ved små mængder blod, skylles rørene med tritonlysebufferen! Tilsæt tritonlysebuffer til blodet efter skemaet herunder:
10 ml blod = 40 ml Tritonlysebuffer
5 ml blod = 20 ml Tritonlysebuffer
2,5 ml blod = 10 ml Tritonlysebuffer
1,25 ml blod = 5 ml Tritonlysebuffer
2. Ryst prøverne kraftigt og stil i køleskab i 30 min. Ryst prøverne 2-3 gange undervejs.
Tænd centrifugen i lab B206 på 4°C og tryk fasttemp.
3. Centrifuger prøverne 15 min ved 2500 rpm, 4°C. (Husk at centrifugen skal være i balance!).
4. **Der arbejdes i stinkskab og benyt handsker.** Fjern supernatanten, ved at hælde den fra i et langt træk, så pellet ikke skvulpes løst (brug et bæreglas til opsamling). Hvis muligt duppes det sidste supernatant af på et stykke rent papir eller røret på hovedet hvis muligt (Pas på hvis pellet sidder løst).
5. Tilsæt den mængde 0,9% NaCl som passer til dit startvolumen blod:
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 ml 0,9% NaCl

6. Vortex til pellet er så godt som opløst.
7. Centrifuger prøverne 10 min ved 2500 rpm, 4°C.
8. Forbered pronaseblandingen til dit antal prøver du har + 1 ekstra, mens der centrifugeres.
9. Fjern supernatanten forsigtigt, ved at hælde det i vasken og stil røret på hovedet på et rent stykke papir, hvis pellet sidder godt fast.

10. Tilsæt den mængde kernelysebuffer som passer til dit startvolumen blod:

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 den mængde Pronase blanding som passer til dit startvolumen blod.

10 ml blod = 1,1 ml
5 ml blod = 0,55 ml
2,5 ml blod = 0,275 ml
1,25 ml blod = 0,1375 ml

12. Skru låget stramt på, ryst så pellet er løsnet og stil prøverne til at "shake" ved stuetemperatur natten over, i Lab. B212

Dag 2.

1. Tænd centrifugen og sæt den i gang med nedkøling til 4°C i Lab. B206.
2. Tjek at pellet er helt opløst og væsken dermed er homogen. Hvis ikke væsken er homogen, tilsæt en ny omgang kernelysebuffer og pronaseblanding (samme mængde som dag 1) og lad dem ryste et par timer mere. (Kan også roterer i varmeskab i Lab. B209 ved 50°C 1-2 timer)

13. Tilsæt den mængde mættet NaCl (6M) som passer til dit startvolumen blod.

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

3. Vortex mix prøverne for fuld kræft i 15 sekunder (Indtil de er helt skummende).
4. Centrifuger prøverne i 15 min ved 2500 rpm, 4°C. (Husk at centrifugen skal være i balance!).

Imens forberedes nye 50 ml rør med ID, der laves "fiskestænger" (Glas pasteur smeltes så der dannes en lille kugle for enden), 1,5 ml rør med skrue låg (og ID) med 50-150 µl 1xTE-buffer.
5. Overfør supernatanten til det rene 50 ml rør. Hvis væsken er meget tyk/slimet, klippes enden af P1000 spidsen af.
6. **Der arbejdes i stinkskab og benyt handsker. Lav 1 prøve af gangen!!** Tilsæt 1 volumen Isopropanol til prøven og mix til væsken er homogen og der dannes en udfældning (DNA'et). Brug en "fiskestang" til at fange DNA'et (sørg for at det ikke kommer for langt op, da det så er svært at få af igen). Lad Isopropanolen fordampe inden overførelsen til 1,5 ml røret. Hold øje med at DNA'et slipper pasteuren!! (Der skal "rulles kraftigt. Hvis ikke du kan se at det er kommet af, knæk spidsen af pastueren ned i 1,5 ml røret. **Affald opsamles i affaldsdunk C2.**
7. Hvis DNA-pellet er stort, tilsæt da mere 1xTE buffer.
8. Prøverne stilles til at roterer eller på rysteblok ved 16°C natten i B203
9. Mål OD på nanodrop. Hvis DNA'et ikke er opløst, tilsæt mere 1xTE-buffer og stil dem tilbage og roterer. **HUSK at skrive ID og koncentration på røret inden opbevaring i fryser!**

Pronase mix

1 prøve = 10 ml blood!

1 prøve :

896 µl Nucleasefree H₂O

50 µl pronase (20 mg/ml)

150 µl 20 % SDS (Tilsættes i stinkskab!)

4 µl 0,5 M Na₂EDTA, pH 8,0

Bilag 6

TaqMan protokol

TaqMan Gravhund

Husk at tænde apparatet (lampen) i B206 i god tid (Det tager ca. 20 min før lampen er klar)

Mastermix, laves på is (**Husk stinkskab når du arbejder med TaqMan mastermixen!**):

Der laves Mastermix til hver prøve, 1 blindprøve og 1 ekstra prøve.

Mastermix (20-25ng)	x1	x
TaqMan (Giftig!) (x20)	1,0 µl	
TaqMan Universal mix(x2)	10,0 µl	
H ₂ O	7,0 µl	

18 µl mastermix + 2 µl DNA (20-25ng/µl).

Sæt reaktionerne op i de hvide plader.

	1	2	3	4	5	6	7
A							
B							
C							
D							
E							
F							
G							
H							

Mx3000p opsætning:

Program: MxPro

- Ved opstart vælg "*Allele Discrimination/ SNP's Real-Time*"
- På templatén marker de anvendte brønde, vælg derefter "*Unknown*" under "*well type*"

- Under "Collect fluorescence data" (menuen i højre side) marker "VIC" (- først) "FAM" 
- Navngiv brønde: Tryk på , marker én brønd af gangen tryk derefter på "well information" (øverst til venstre), skriv prøvens navn i feltet og tryk "close", gentag for alle prøverne på pladen. Tryk derefter på "Return to setup screen"
- Thermal Profile (øverst venstre side) skal se således ud (vælg eventuelt "custom" i menuen til venstre, hvis der ikke kan rettes i programmet):

Segment 1, 1 cycle: 50°C i 2 min

Segment 2, 1 cycle: 95°C i 10 min

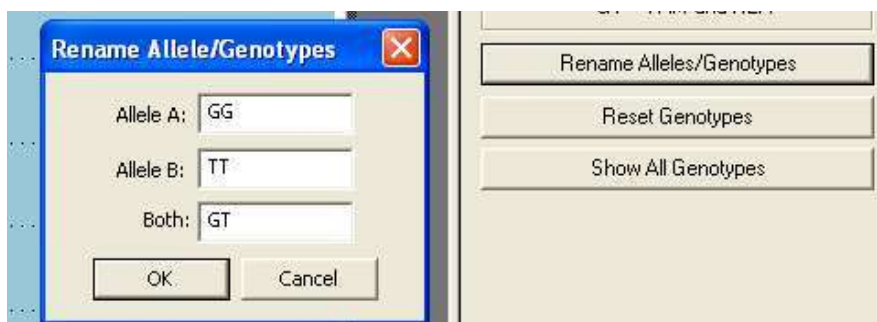
Segment 3, 45 cycles: 92°C i 20 sek.; 60°C i 1 min.

For at tilføje et trin til profilen skal man højre klikke på musen og vælge "add segment".

For at redigere en indstilling, skal man klikke på enheden, der skal ændres.

For at slette et trin, skal musen placeres således, at der kommer en dobbelpil, klikke så strengen bliver rød,  og derefter trykke "Delete".

- Kørslen startes først når lampen () lyser grøn. Klik på "Start run" (nederst i højre hjørne) for at starte kørslen.
- Gem kørslen – vælg evt. "Lamp off at the end".
- Efter endt kørsel gå ind på "Results" (øverst venstre)
- Vælg "Dual color scatter plots" → Under "Display the values" vælg "Fluorescence"
- Hvis ikke alle 4 bokse kan ses, vælg "Show all genotypes"
- Vælg Rename alleles. Ex. (Allele A = GG, Allele B = TT Allele AB = GT) (NB! Tjek at resultatet stemmer overens med kontrollerne, da man kan sætte kasserne forskelligt!!!!)



- Vælg tekstrapport i menuen i højre side.

- Vælg *well*, *well name* og *Genotype*.
- Tjek kontroller stemmer overens (wellname/genotypes)
- Gem tekstrapport: "File" → "Export text report" → "Excel"

Bilag 7

OI Genotype protokol

Osteogenesis imperfecta hos gravhunde (OI):

PCR:

Kontrolprøver:

DGK196: Rask

OI_3: syg

DDG120: Bærer

Mastermix: 1,5 mM MgCl ₂	x1	x	tjek:
Buffer Qiagen	4,0 µL	µL	
dNTP (4 mM)	2,0 µL	µL	
Primer VLDLR_ F(10 pmol/µL)	1,4 µL	µL	
Primer VLDLR_R (10 pmol/µL)	1,4 µL	µL	
Taq polymerase Qiagen	0,2 µL	µL	
Vand	27,0 µL	µL	
36 µL mastermix + 4 µL DNA (25 ng/ µL)			

**PCR-
program**

PCR Apparat: T100

- 95 °C i 15 min
- 37 cykler: (95 °C i 30 sek. – 64 °C i 30 sek. – 72 °C i 1 min)
- 72 °C i 10 min
- 8 °C forever

Elektroforese:

- Fremstil en 2 % agarosegel
- Markør: 100 bp ladder
- 6 µL PCR-produkt tilsættes 2 µL loading buffer og sættes på gelen, gel køres ved 110V i ca. 25min

PCR-oprensning på de lilla plader:

- Juster prøvernes volumen til 100 µL (tilsæt 70 µL nucleasefrit vand).
- Overfør de 100µL til den lilla pcr-oprensingsplade. (Husk at sætte PCR-pladetape over de endnu ubrugte huller. Denne tape bliver på til man skal bruge nye brønde)
- Sug 5-10 min på vacuum – til væsken er væk.
- Tilsæt 30 µL vand, sæt tape over alle huller og ryst i 5 min ved 1200 RPM.
- Væsken overføres til ren PCR-plade.

Restriktionsenzym skæring:

- Skæring med restriktionsenzymet HPY991 på oprenset PCR-produkt

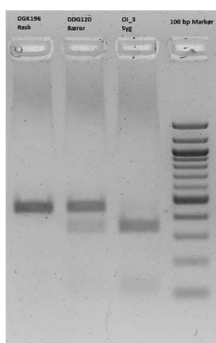
Restriktionsmix:	1 x	x
Nuklease frit vand	7,5 µL	
Buffer (Cut smart) 10x	2 µL	
HPY991	0,5 µL	

10 µL restriktionsmix +10 µL oprenset PCR-produkt

- Restriktionen sættes op i 1,5 mL safe-lock microcentrifugerør
- Inkuberes i 1 timer ved 37 °C
- Blindprøven medtages ikke

Elektroforese:

- Fremstil en 2 % agarosegel
- Tilsæt 4 µL loading buffer til prøven.
- Markør: 100 bp ladder
- Gelen køres ved 100 V til der er god adskillelse mellem båndene også markøren

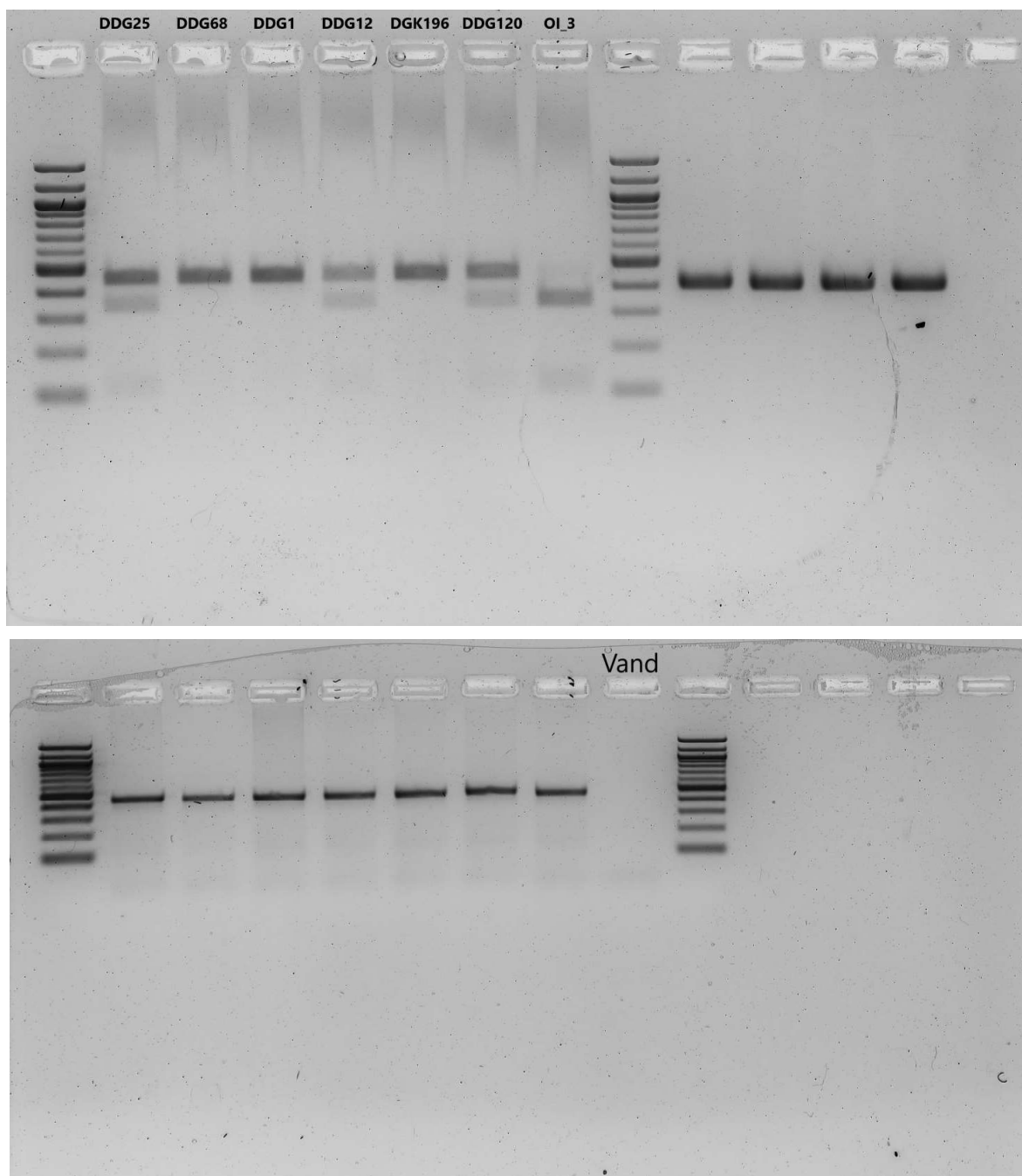


Bilag 8

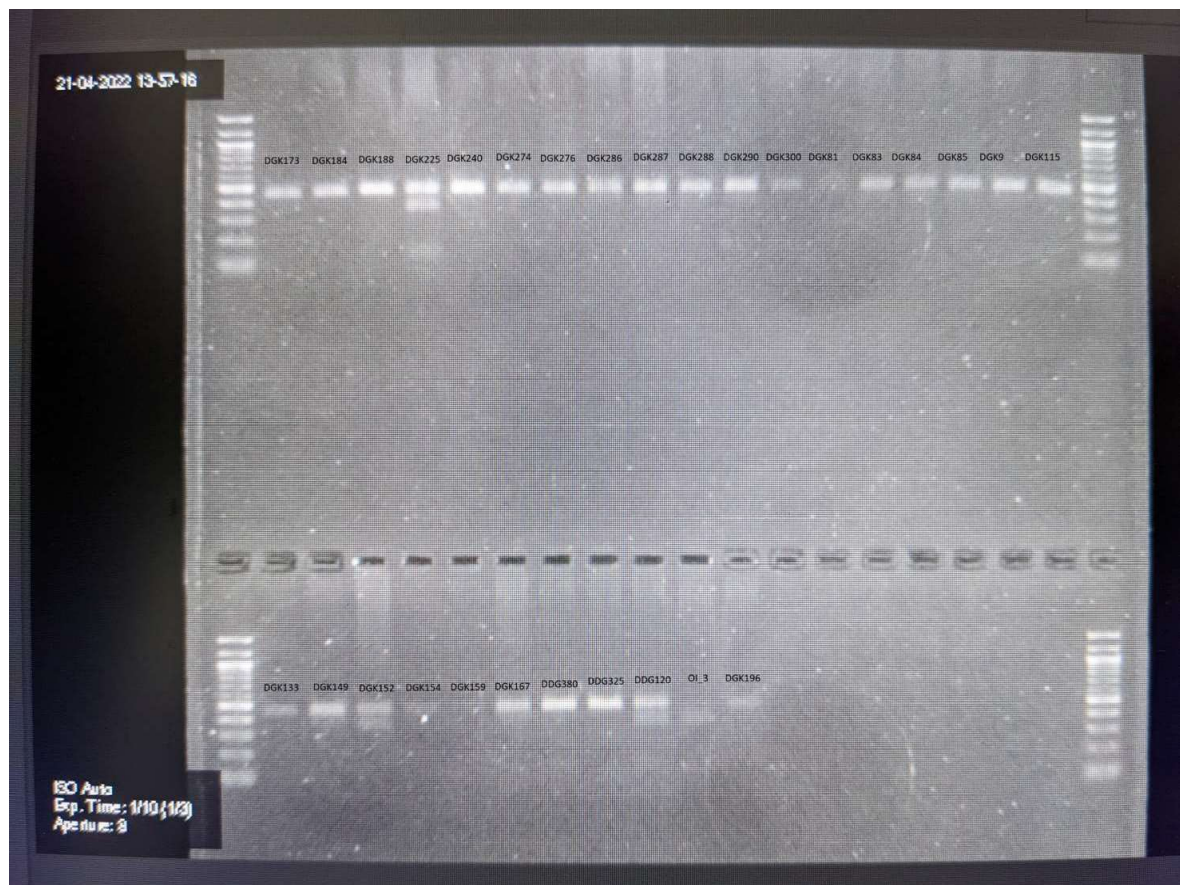
Gelelektroforese resultater

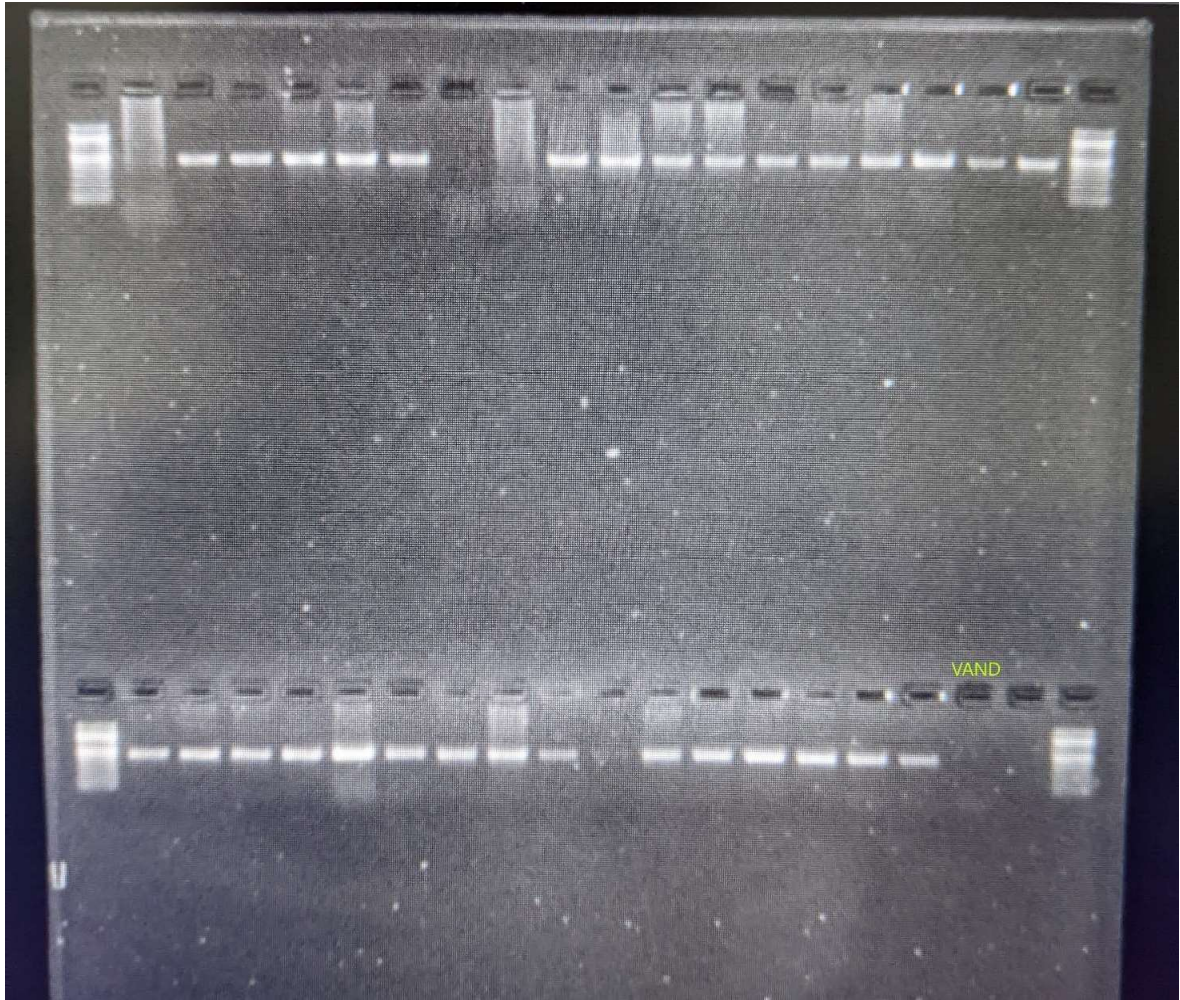
Der har været tekniske problemer med gel-kameraet, så der ses varierende kvalitet og billedetyper, men resultaterne har været tydelige at aflæse (ellers er de blevet kørt om). Alle skærings-geler er akkompagneret med et billede af en gel fra kontrol af PCR.

Gel 1, genotype samt kontrol

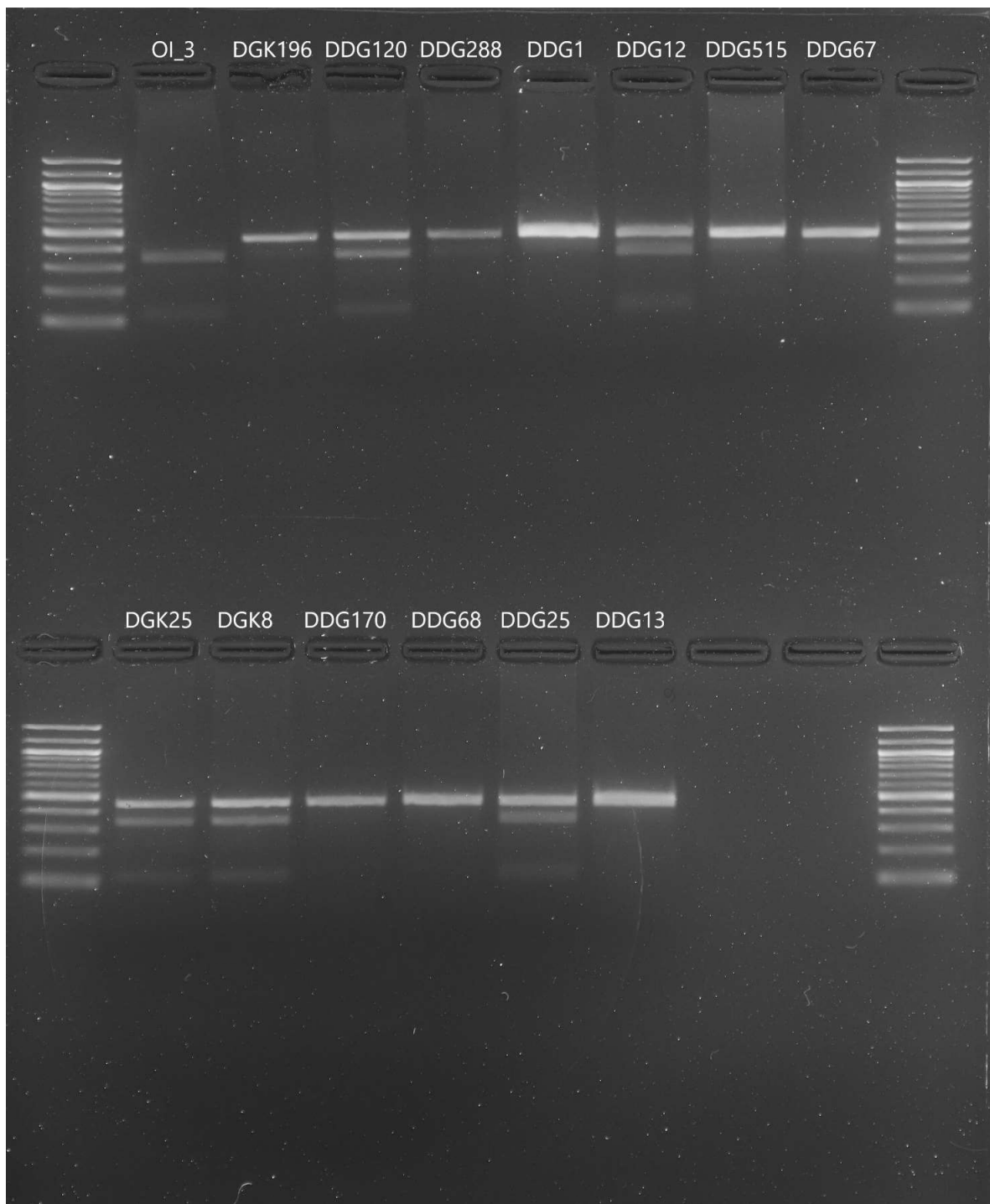


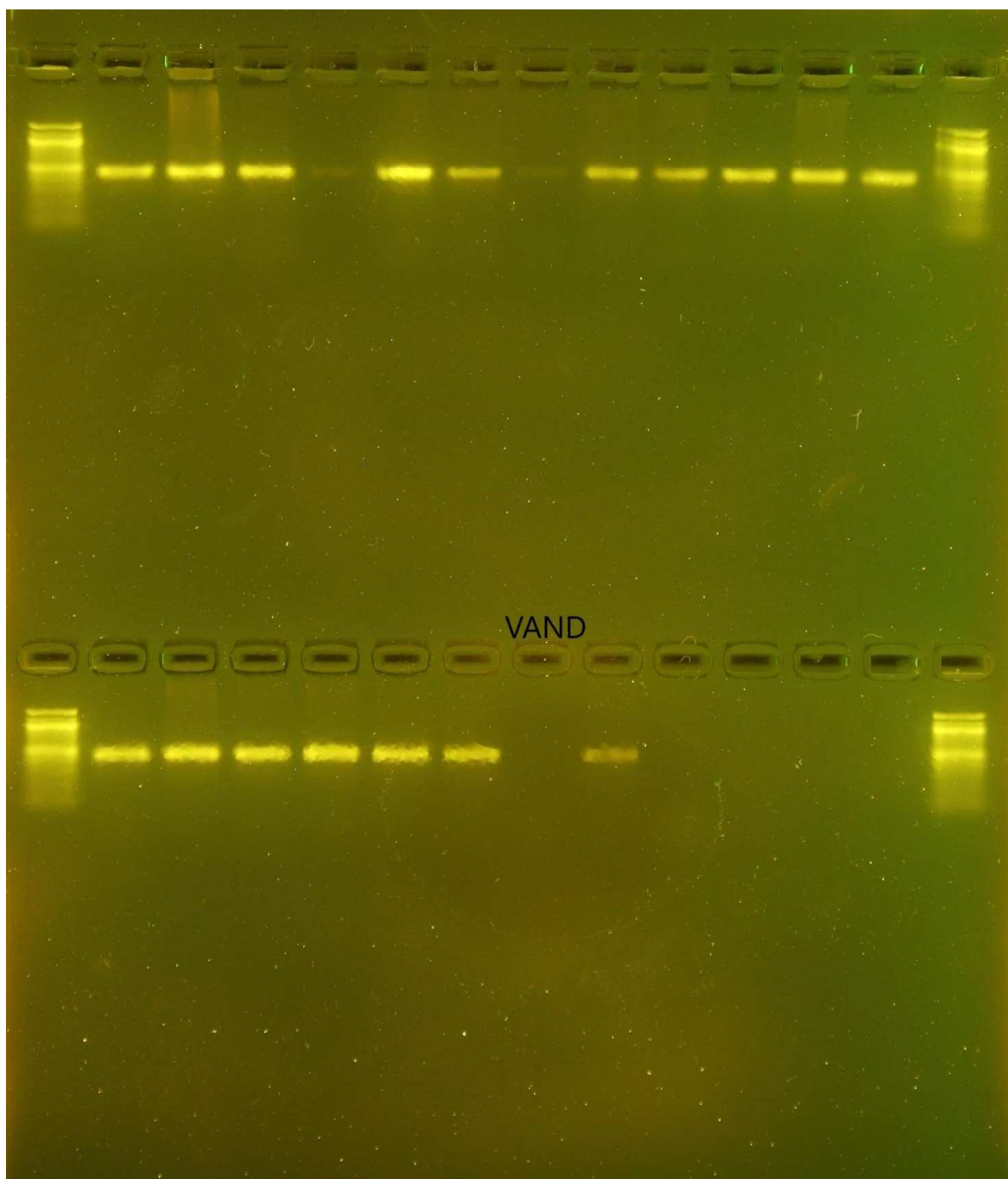
Gel 2, genotype samt kontrol



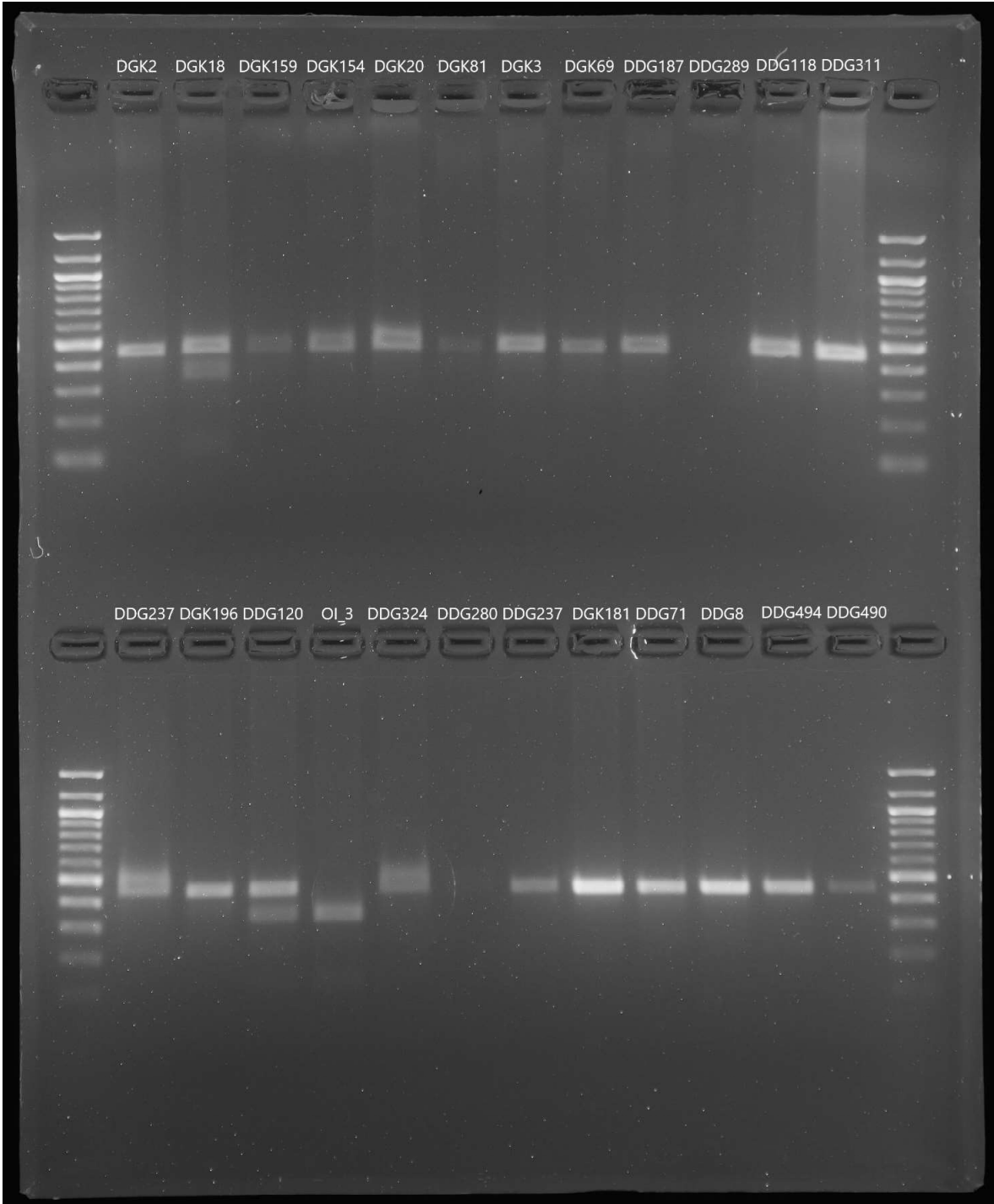


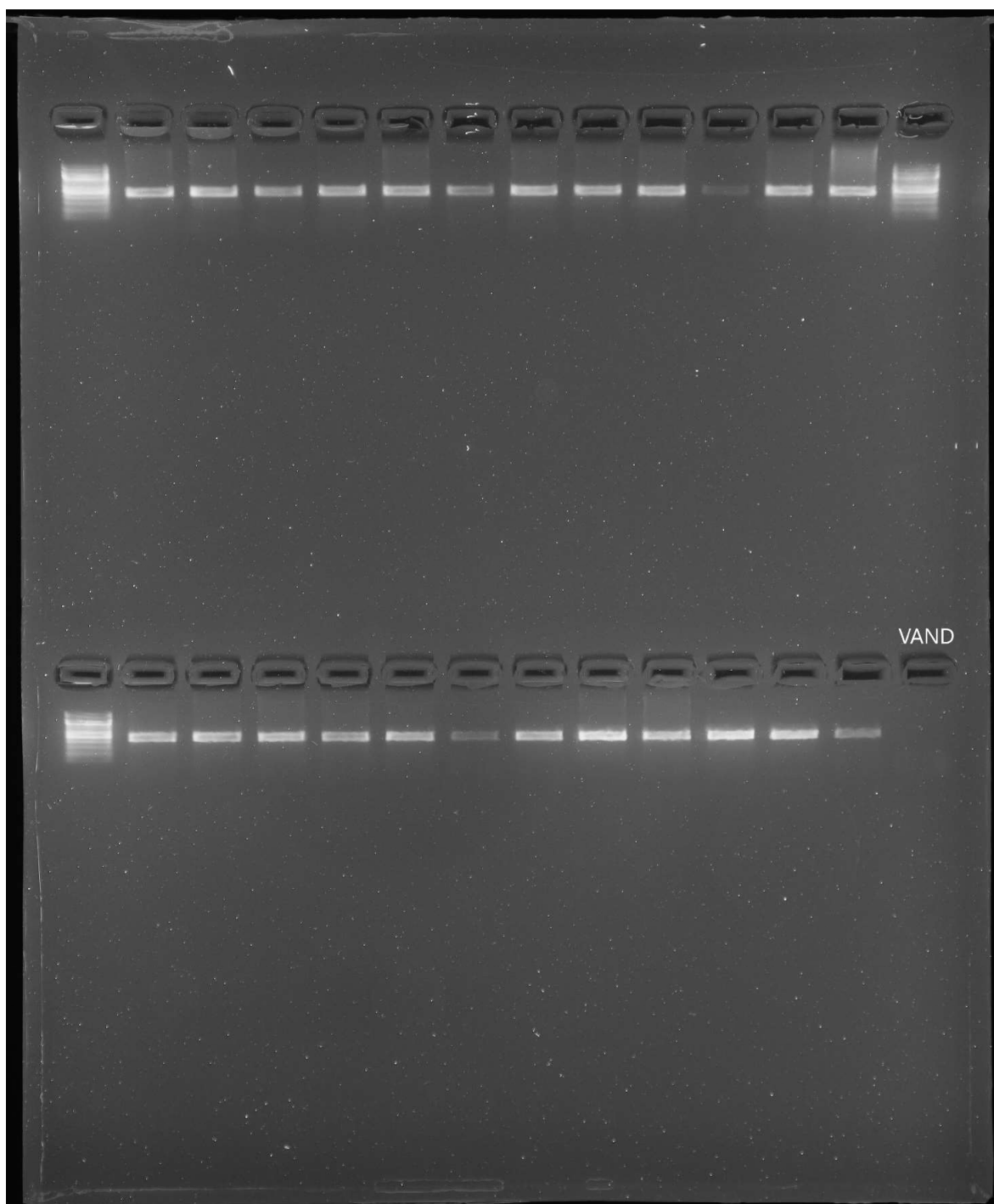
Gel 3, genotype samt kontrol



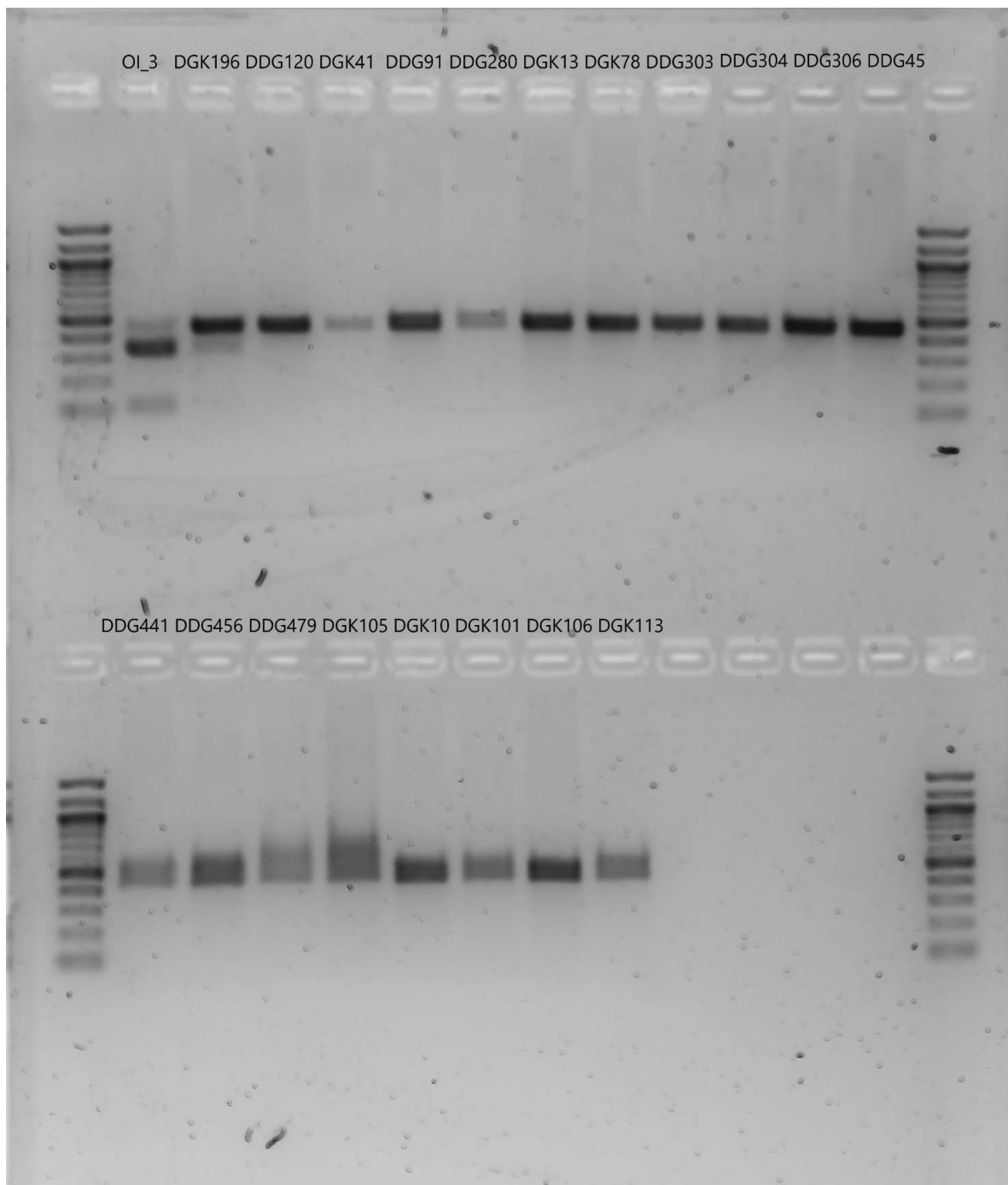


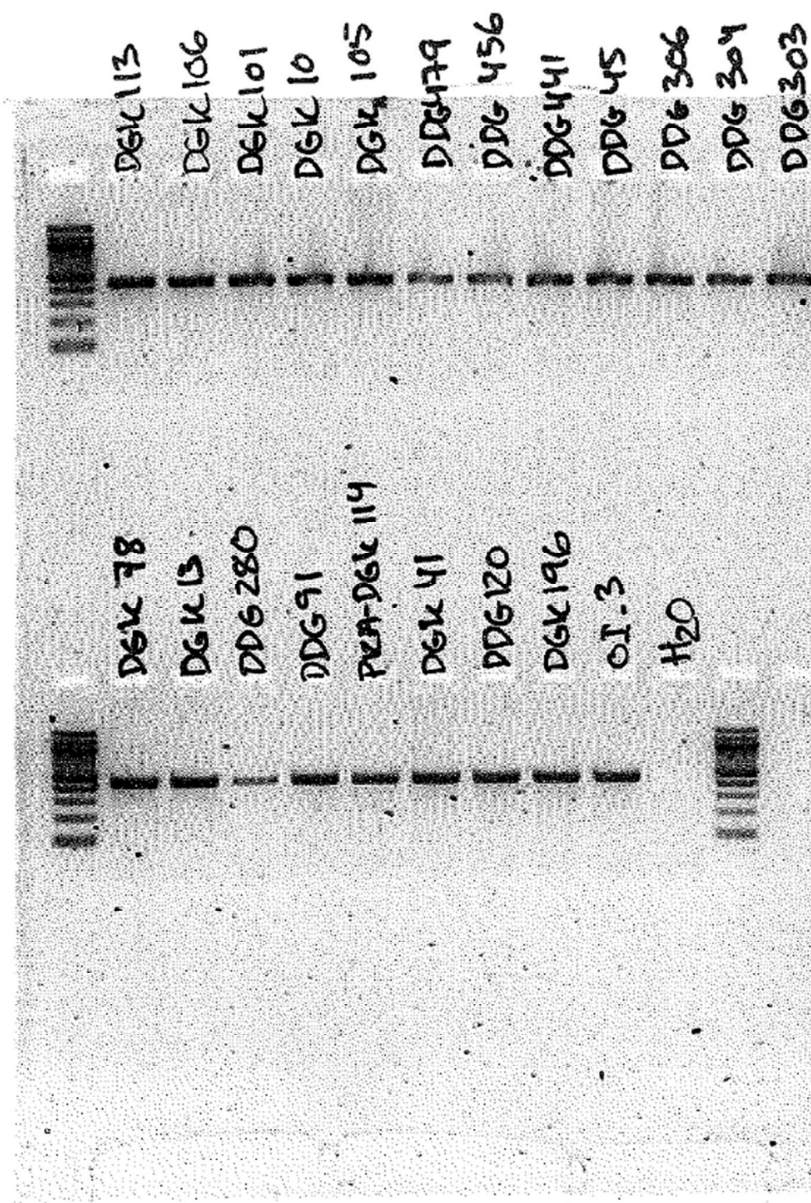
Gel 4, genotype samt kontrol



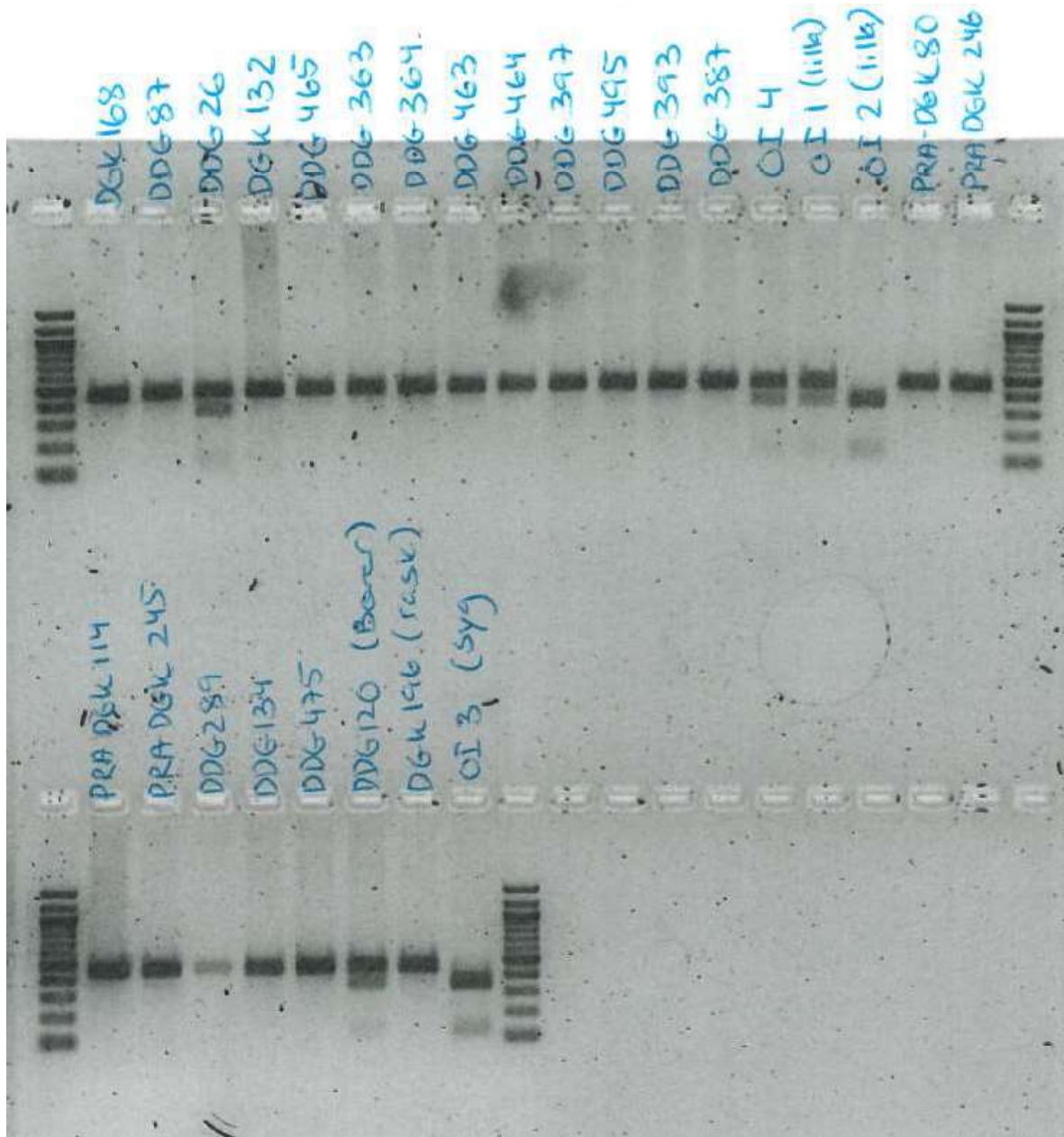


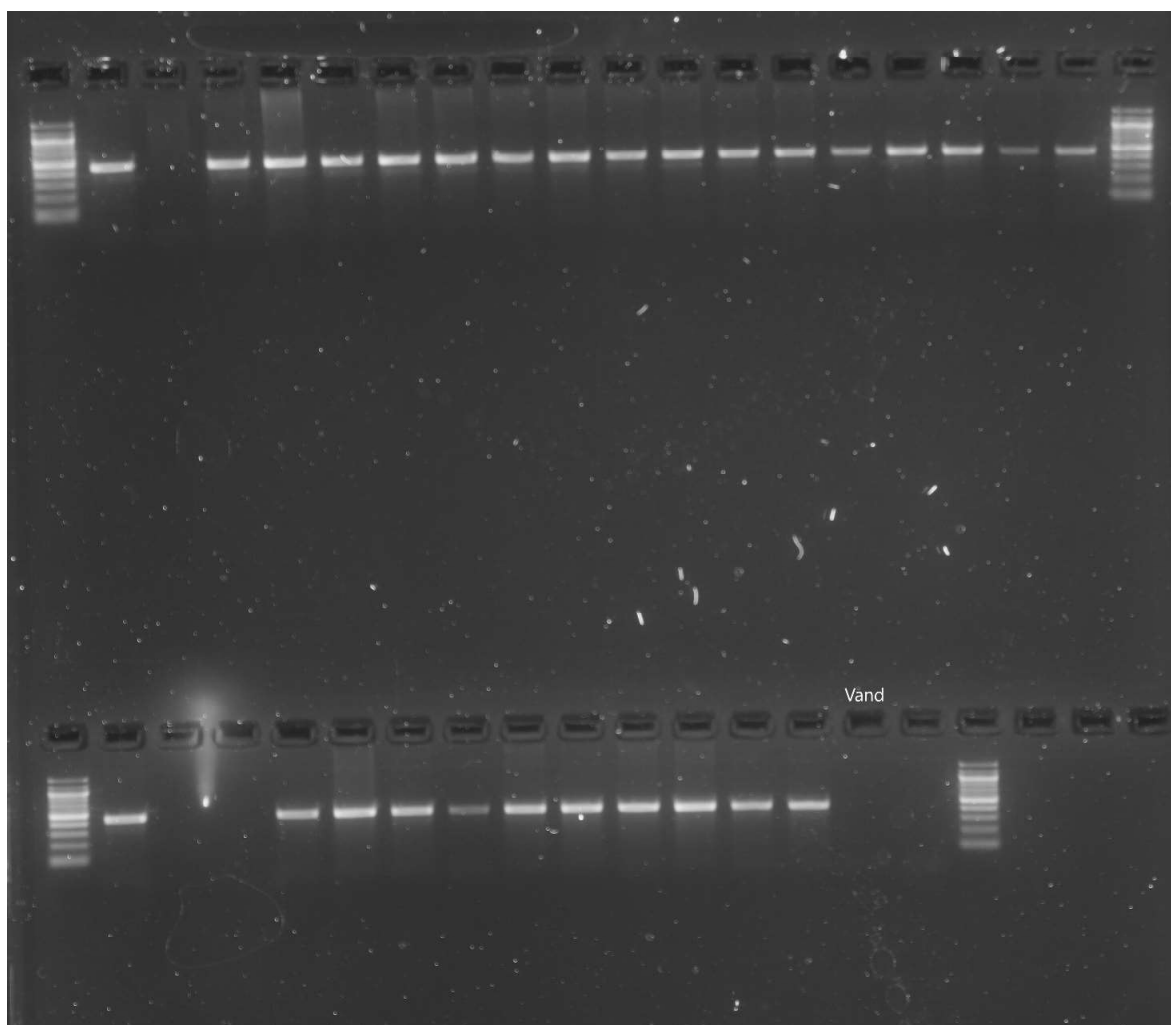
Gel 5, genotype samt kontrol





Gel 6, genotype samt kontrol





Bilag 9

Antal nødvendige prøver

Estimat for antal prøver for at finde én anlegsbærer med 95% sikkerhed

Antal ruhårede gravhunde i den danske population

Regnet ud fra en levealder på gennemsnitlig 13 år

og med data fra årlige registreringer hos DKK de sidste 13 år.

Årstal	Registreringer
2021	274
2020	319
2019	327
2018	284
2017	336
2016	379
2015	422
2014	438
2013	402
2012	430
2011	566
2010	509
2009	668

Population 5354 hunde

Populationens antal alleler 10708 alleler

D = antallet af C alleler i populationen

D = allelfrekvensen * N

D = 1071 C alleler

Her bruges allelfrekvensen fra Schutz på 0,1 (den er 0,05 i mine resultater)

n er stikprøvestørrelse. P sættes til 0,95 for en ønsket 95% sikkerhed

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

n = 28 alleler

Svarende til 14 hunde