



UPPSALA
UNIVERSITET

Genetiska sjukdomar hos *Canis lupus familiaris* till följd av avel på populära fenotyper

Olof Vadell

Independent Project in Biology
Självständigt arbete i biologi, 15 hp, vårterminen 2012
Institutionen för biologisk grundutbildning, Uppsala universitet

Sammandrag

Dagens populära hundraser har alla sitt ursprung hos vargen, *Canis lupus*. Under alla år av avel på fenotyper som människan önskat så har det ansamlats många alleler som ger uttryck åt en rad icke önskade fenotyper. Men eftersom det i vårt moderna samhälle till stor del är den ekonomiska vinsten som driver hunduppfödarna så sprids de skadliga allelerna som är kopplade till önskade fenotyper som en löpeld i rasernas populationer.

Den kinesiska rasen shar-pei lider av återkommande episoder av feber och inflammationer i lederna. Då denna åkomma är kopplad till Shar-Peis karaktäristiska hudveck som många hundköpare önskar så bibehålls denna skadliga fenotyp i populationen. Hos den portugisiska vattenhunden finns åkomman Addisons sjukdom i mycket högre frekvens än hos dom flesta andra hundraser. Detta på grund av sjukdomens karaktär med sen början och oansvarig avel. Rhodesian ridgeback karaktäriseras utav ett område på ryggen där pälsen växer åt motsatt håll från resten av kroppen. Denna fenotyp avlas väldigt hårt. Bakom den här fenotypen döljer sig en sjukdom, dermoid sinus, som under fosterutvecklingen orsakar att neuralrör växer ut ur ryggen och skapar en öppning till ryggraden.

Genetiska sjukdomar, och andra alleler som påverkar fitness negativt, kan spridas inom en population trots det faktum att negativ selektion mot dem borde råda. Ibland tar människan över rollen som selektiv mekanism och avlar omedvetet på skadliga alleler. En annan selektiv mekanism är ett så kallat selektivt svep. I det fallet liftar negativa alleler på positiva allelers positiva selektion och sprids på så sätt i populationen.

För att få bukt med de sjukdomar som redan är vanliga hos vissa raser och för att minska risken för intåg av nya sjukdomar föreslår jag ökad kommunikation mellan forskare inom ämnet och de rasklubbar som finns för varje enskild ras. Om tekniken för identifiering av sjukdomsbärare effektiviseras kan genome-wide scans för sjukdomsmarkörer standardiseras inom aveln.

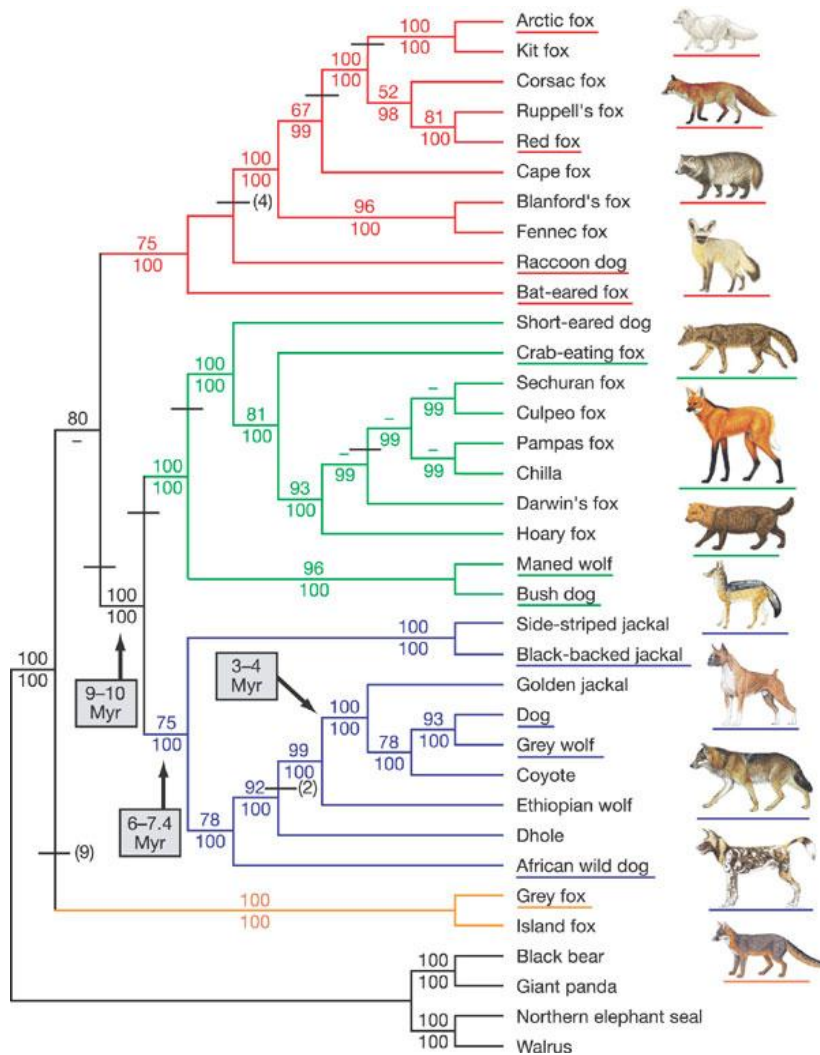
Inledning

Den domesticerade hunden, *Canis lupus familiaris*, har använts av människan i tiotusentals år. Det är en art som genom historien bistått människan med en rad avlastande arbetsuppgifter. Hundens ursprung har diskuterats under många år och många förslag har presenterats. Då alla arter i familjen Canidaea (figur 1), dit hunden hör, kan hybridisera så har inte svaret på hundens ursprung varit helt självklart (Bardleben *et al.* 2005; Delisle & Strobeck 2005). Vid sidan av vargen (*Canis lupus*) har både de olika schakalerna (*Canis aureus*, *Canis mesomelas* och *Canis simensis*) och prärievargen (*Canis latrans*) varit kandidater för hundens ursprung. Vila (1997) sekvenserade mitokondrie DNA (mtDNA) från 140 hundar (från 67 olika raser), 162 vargar, 5 koyoter och 12 schakaler. I den utvalda regionen av mtDNA skiljde sig hunden som mest från vargen med 12 nukleotids substitutioner medan den skiljde sig från koyoten och schakalen med minst 20 nukleotids substitutioner och 2 nukleotidsättningar (Vila 1997). Detta stödjer hypotesen att hunden härstammar från vargen. Ytterligare undersökningar av haplotyper (en individs uppsättning alleler för en viss del av genomet) från hund och varg visar att hunden härstammar från östra Asien och är en produkt av parning och återintroducering av flera varg populationer (Vila 1997; Savolainen *et al.* 2002). De tidigaste arkeologiska fynden av hund är ungefär 15000 år gamla (Ostrander & Wayne 2005). Men när mtDNA från hund- och varg-gruppen undersökts så har man hittat en gruppering, "clade 1" (figur 2), av mtDNA från hund som visar mycket hög nukleotid diversitet (Vila 1997).

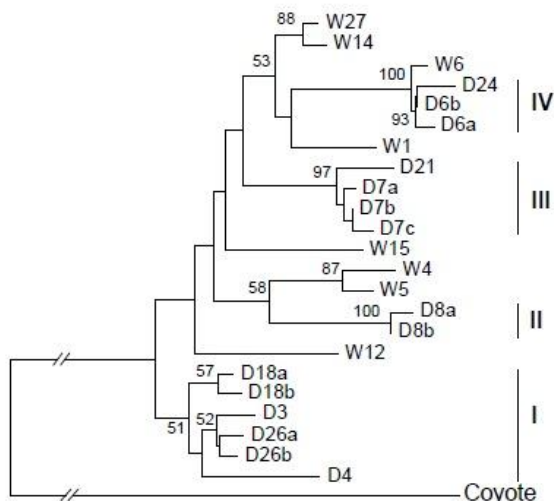
Eftersom mtDNA endast nedärvs i moderligt led och det faktum att mtDNA inte rekombinerar så borde nukleotid diversiteten i dessa regioner vara mycket låg. Den höga mångfalden i den hundspecifika grupperingen av mtDNA indikerar ett mycket äldre ursprung för den moderna hunden än 15000 år, data indikerar att ursprunget för den gruppen är mellan 40000 och 135000 år gammalt (Vila 1997; Savolainen *et al.* 2002). Fynd av vargben har gjorts i närheten av hominidben i Kina vilka dateras till en ålder av 400000 år, de här fynden stödjer ytterligare att människan kan ha inlett en domesticeringsprocess mycket tidigare än för 15000 år sedan. Det kan vara så att de hundfynd som är äldre än 15000 år inte har avlats så hårt och därför behållit mycket av vargutseendet och klassificerats som varg. De tidigaste fynden av hund som fenotypiskt klassificerats som hund stämmer bra in med den historiska perioden *Neolitiska revolutionen* för ungefär 10000 år sedan då människan ändrade från en nomadisk livsstil till en mer platsfast jordbrukande livsstil. Denna omställning ändrade även kraven på de domesticerade hundarna och aveln riktades mot andra fenotypiska önskemål (Vila 1997). Hur vi än fastställer hundens ålder så är den i alla fall ett resultat av en mycket lång artificiell selektion utförd av människan.

De flaskhalsarna som beror på demografiska faktorer som till exempel beskattning av hundägande i Kina och de flaskhalsar som människan de senaste hundra åren orsakat hunden genom avel har lett till en ökad inavel inom arten (Svenska Shar-pei Klubben 2009). En följd av detta är inavelsdepression, vilket avser en reducerad fitness hos en population på grund av att heterozygositeten hos populationen sjunker. När heterozygositeten sjunker minskar antalet individer som är heterozygota för slumpmässigt valda alleler. Det resulterar i att recessiva alleler får ökat uttryck i populationen. Är dessa recessiva alleler då skadliga alleler leder det till en reducerad fitness hos populationen. Den reducerade fitnessen hos hunden är ofta ett resultat av genetiska sjukdomar.

Det finns ett antal raser i världen som är mer drabbade av de recessiva allelerna och en del sjukdomar är helt unika för specifika raser. Den dåliga fitnessen som individer inom de drabbade raserna får genomgå går att undvika genom att förmedla information om hur dessa sjukdomar fungerar och sprids till rasklubbar och uppfödare. I den här litteratursammanfattningen presenterar jag tre sjukdomar hos tre olika raser, som genom små förändringar i avelsprogrammen för raserna går att få bort ur populationerna.



Figur 1. Familjen Canidae's fylogeni med brunbjörn, panda, elefantsäl och valross som utgrupp. Återgiven med tillstånd från Macmillan Publishers Ltd: [Nature] Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog, 2005.



Figur 2. Gruppering av 15 hundar och 8 vargar baserat på deras mtDNA, W=Varg och D=Hund. Siffrorna vid varje nod representerar sannolikheten att noden faktiskt ser ut så här, baserat på en bootstrap-undersökning (statistisk metod för att avgöra sannolikheten för en specifik nod). Individer med liknande mtDNA-divergens (skillnad från utgruppen koyote) sorteras in i grupper namngivna I, II, III och IV. Från Vila *et al.* (1997), återgiven med tillstånd från AAAS.

Generella metoder vid identifiering av genetiska sjukdomar

En förutsättning för att förstå hur genetiken är kopplad till specifika fenotyper är att känna till att genomen inom en population inte är identiska med varandra. Genomen skiljer sig åt på flera sätt och det är den här variationen i genomen (tillsammans med epigenetik, nedärvbara fenotypiska variationer som inte beror på förändringar i DNA-sekvensen) som ger upphov till den fenotypiska variationen man kan observera inom en art eller population.

Det är också den här variationen i genomen inom en art som man använder sig av för att hitta sekvenser som är inblandade i en viss sjukdom. Man låter då variationerna vara markörer för längre sekvenser av DNA och man behöver på så sätt inte sekvensera hela genomet när man letar efter en känd genetisk sjukdom.

Genetiska markörer

Mikrosatelliter och minisatelliter

Långa sträckor av genomet är upprepningar där två eller fler nukleotider upprepas. Antalet repetitioner för en specifik sekvens av repetitioner skiljer sig åt hos olika individer och kallas för VNTR (Variation in number of tandem repeats). Detta fenomen ger oftast inte upphov till fenotypiska effekter då de ofta är i regioner som inte kodar för proteiner, men det används regelbundet som markörer inom populationsgenetiken och för att koppla en individ till ett biologiskt spår inom den forensiska vetenskapen. VNTR delas i upp två kategorier baserade på antal nukleotider som repeteras, mikrosatelliter och minisatelliter, där mikrosatelliter består av fem eller färre baspar som repeteras ett antal gånger och minisatelliter består av längre sekvenser som repeteras ett antal gånger (Ignal & Ilan 2002).

SNP

Ett annat exempel som ofta leder till fenotypisk variation är enstaka nukleotid variationer eller punktmutationer, så kallade single nucleotide polymorphisms (SNP). SNP:s uppkommer genom mutationer och är spridda över hela genomet. Punktmutationer där endast en nukleotid blir utbytt uppstår ofta då det blir fel under DNA-replikationen. Om punktmutation uppstår i en proteinkodande region av DNA så kan tre saker hända. Dels kan nukleotiden bytas ut till en annan nukleotid som resulterar i ett annat kodon som kodar för samma aminosyra. Det leder alltså inte till ett annat protein och kallas synonym mutation. Dels kan nukleotidutbytet leda till att kodon kodar för en annan aminosyra. Detta kallas för en icke synonym mutation och resulterar oftast i ett ickefungerande protein. Utöver detta kan nukleotidutbytet leda till att kodonet blir ett stoppkodon. Stoppkodon är de kodon som signalerar till DNA polymeras att sluta läsa DNA och dissociera från DNA. Det finns tre stopp-kodon i DNA; TAA, TAG och TGA. Detta kallas nonsensmutation och leder oftast också till ett ickefungerande protein. De två senare exemplen kan definitivt leda till en fenotypisk förändring, till exempel en sjukdom. Man tar fram SNP:s genom att ställa upp ett antal genom mot varandra och undersöker var i genomet man kan hitta skillnader. Kravet för att en variation skall kallas SNP är att variationen finns i minst 1% av individerna inom populationen. En stor fördel med SNP:s är att positionerna där variation påträffas bevaras genom generationer inom en population och det går därför att skapa en SNP-karta över till exempel en art. Sådana kartor har producerats över den domesticerade hunden av *Broad Institute* och det finns i dagsläget kartor med över 2,5 miljoner SNP registrerade i hund genomet (Ignal & Ilan 2002; Lindblad-Toh *et al.* 2005; Campbell & Reece 2008; Broad Institute 2012a; National Human Genome Research Institute 2012).

RFLP

En annan vanlig genomvariation är RFLP (Restriction fragment length polymorphisms), längdvariation hos restriktionsfragment. Genom att klippa genom i bitar med enzym som klipper DNA endast vid specifika sekvenser, restriktionsenzym, så kan man hitta specifika mönster av dessa fragment som är kopplade till en specifik fenotyp. Alla individer har ansamlat en unik uppsättning mutationer och dessa mutationer hamnar ibland inom den sekvensen som restriktionsenzym ska klippa. Ändras då sekvensen så att restriktionsenzymet inte längre känner igen den så klippes inte DNA. Mutationer kan även skapa sekvenser som restriktionsenzymet känner igen och klipper då på ett ställe som skulle lämnats oklippt innan mutationen. Alla dessa mutationer resulterar i att varje individ får en unik uppsättning av olika långa DNA sekvenser då bitar av eller hela genomet klippes med en uppsättning restriktionsenzym (Klug *et al.* 2007a).

Det finns dock många fler mutationer med många olika mekanismer bakom. Det är viktigt att förstå att det är mutationer som föder variation i alla populationer och är drivkraften bakom evolution.

En fenotyps position i genomet - GWAS

För att undersöka vilken del av genomet som är kopplad till en specifik fenotyp, till exempel en sjukdom, så kan man utföra en så kallad genome-wide association study (GWAS). I sådana studier använder man sig av en populations SNP. Om man vill undersöka vilken del av en populations genom som är kopplat till en specifik fenotyp, till exempel vilken del av genomet hos en shar-pei som är kopplat till deras karaktäristiska hudveck, så kan man undersöka skillnader i SNP. Man ställer då två grupper inom populationen mot varandra, hos shar-pei skulle man i sådana fall jämföra rynkiga hundar med släta hundar, och undersöker hur genomet skiljer sig åt. Men att undersöka hela genomet skulle vara både dyrt och tidskrävande. Det är där SNP:s kommer in i bilden. Man använder SNP:s som markörer för en region av DNA och kopplar dessa med statistiska metoder, ofta χ^2 -test, till gruppen med den fenotyp man undersöker. När man väl kopplat en SNP till en fenotyp så har man inte nödvändigtvis hittat den gen som reglerar fenotypen men man har möjligtvis hittat den region, eller haplotyp (specifik uppsättning alleler), av genomet som genen befinner sig i. Sedan måste man ytterligare sekvensera den aktuella regionen för att finna alla de aktuella skillnaderna mellan de två fenotypiska grupperna (National Human Genome Research Institute 2011).

Kopplingsojämvikt - LD

Om en population har gått igenom kraftiga flaskhalsar, vilket hundar har gjort genom aveln, så har den en hög kopplingsojämvikt (linkage disequilibrium, LD). LD är två eller flera allelers icke slumpmässiga association. En hög LD betyder att man genom att titta på en del av genomet kan dra slutsatser om en annan del av genomet, till exempel om man undersöker förekomsten av en allel så kan man dra slutsatser om förekomsten av en rad andra alleler. Man kan säga att allelerna är länkade, inte nödvändigtvis fysiskt länkade dock. En rad av sammanhörande alleler på det här sättet kallas en haplotyp. LD mäts i antal baspar man kan dra slutsatser om genom att titta på en markör. Hög LD innebär långa haplotyper. Det innebär också att man bara behöver undersöka en liten del av genomet för att dra slutsatser om hela genomet, vilket är praktiskt om man vill undersöka vilken del av genomet som är kopplat till en specifik fenotyp (Wilbe *et al.* 2010).

En undersökning av LD hos boxer jämfört med tio andra hundraser visade att LD var avsevärt högre inom raser än mellan raser. LD inom en ras är upp till hundra gånger högre än

människans LD medan LD mellan raser är ungefär samma som människans. Den stora likheten inom raser och ganska stora skillnaden mellan raser är ett resultat av två stora flaskhalsar, dels domesticering av hunden ifrån varg och dels den moderna historiens avel på önskvärda fenotyper som resulterat i distinkta raser (Lindblad-Toh *et al.* 2005; Sutter *et al.* 2004).

Tack vare hundens relativt höga LD inom en ras så krävs bara sekvensering av ungefär 10000 markörer för att täcka hela genomet (Lindblad-Toh *et al.* 2005).

S_i - test

Ett annat statistiskt test som används för att koppla samman haplotyp med fenotyp är S_i-test. Detta är ett test som identifierar sträckor av DNA, eller haplotyper, som visar mycket låg variation inom rasen. Om man då hittar en haplotyp med mycket låg S_i som är helt unik för rasen kan man koppla haplotypen till en fenotyp som också är unik för rasen. På detta sätt behöver inte två grupper jämföras för att undersöka genetiken bakom en specifik fenotyp (Vaysse *et al.* 2011; Olsson *et al.* 2011).

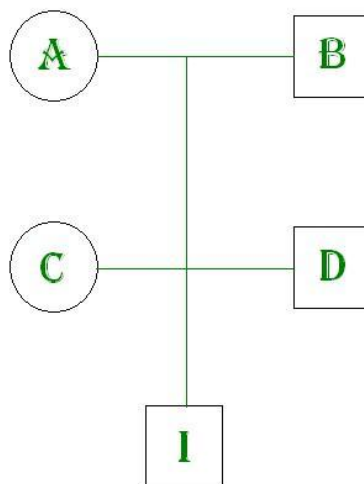
Vilken metod man än väljer för att koppla samman en haplotyp med en fenotyp så måste man ändå i slutändan alltid sekvensera en del av genomet. Hundens höga LD producerar som tidigare nämnts långa haplotyper och få markörer krävs. Men detta innebär också att sekvensen man finner som inblandad i fenotypen blir av avsevärd längd. För att veta vilka gener som ingår i sträckan så måste denna sekvenseras.

Inavelsgraden hos *C. l. familiaris* idag – Hur inavlad är hunden?

Inavelskoefficient - F

Om man är intresserad av inavelsgraden hos en specifik individ är det lämpligt att beräkna individens inavelskoefficient, F_i. Detta görs mycket enkelt om man har tillgång till individens släkträd. I släkträdet undersöker man sedan sannolikheten att två slumpvalda alleler kommer från samma förfader, identiska genom släktskap (Calboli *et al.* 2008).

Först undersöker man vilka vägar allelen kan ha vandrat genom släkträdet, räknar ut sannolikheten för att allelen skall vandra just den vägen, och adderar sannolikheten för samtliga vägar allelen kan ha vandrat (figur 3).



Figur 3. Släkträd över individ "I". I det här fallet är föräldrarna "C" och "D" syskon.

I figur 3 kan den slumpvalda allelen ha kommit från A eller B. Möjliga vägar för allelen att vandra från en förälder genom gemensam förfader till den andra föräldern är:

$C \leftarrow A \rightarrow D$ och $C \leftarrow B \rightarrow D$

Tumregeln för att räkna ut inavelskoefficienten är att man höjer upp $1/2$ (sannolikheten för att allel skickas vidare till nästa generation) med antal individer inom vägen som allelen vandrat; $CAD = (1/2)^3$ och $CBD = (1/2)^3$. De här sannolikheterna adderas sedan, $(1/2)^3 + (1/2)^3 = 1/4 = F_i$ (Klug *et al.* 2007b).

Följande generella formel används:

$$F_i = \sum_i (1/2)^n \times (1 + F_{ci})$$

Där n är antalet individer i vald väg och F_{ci} är den gemensamma förfaderns inavelsgrad (Klug *et al.* 2007b).

Vad är då effekten av inavel på en population? Den största effekten av inavel är att andelen individer som är homozygota för en slumpmässigt vald allel ökar medan andelen heterozygota för allelen minskar. Detta har effekten att recessiva skadliga alleler (i en vild population måste skadliga alleler vara recessiva för att undvika att selekteras bort) får uttryck och populationens fitness sänks. Sänkningen av en populations fitness till följd av inavel kallas inavelsdepression och sker naturligt hos populationer som genomgår kraftiga flaskhalsar. Det drabbar därför också alla populationer som är under hårt avelstryck från människan (DeRose 1999).

Att räkna ut en genomsnittlig inavelsgrad, F , hos alla hundar är ganska svårt och mycket missvisande. De olika hundraserna som finns i världen i dag har alla väldigt olika demografiska historier och inavelsgraden ligger på allt mellan 0 – 37% (jämför med exemplet för individ ”I” ovan där föräldrar som är syskon genererar en inavelsgrad på 25%). Istället är det lämpligt att undersöka skillnaden i inavelsgrad över tid, ΔF . ΔF kan dessutom ge information om den effektiva populationsstorleken, alltså det antal individer inom populationen som faktiskt bidrar till diversiteten hos nästa generation, N_e . Studier gjorda på 66 olika hundraser beräknade medianen för N_e till ungefär 93. Bijma (2000) beräknade gränsvärden för N_e för att minimera inavelsdepression och kom då fram till att N_e inte bör vara mindre än 50. Medianvärdet för de 66 hundraserna låg med andra ord inom den tolererade gränsen men 13 av de 66 hundraserna hade ett N_e -värde som var lägre än 50. Dessa 13 raser innehöll bland annat den mycket vanliga rasen boxer, och alltså inte bara väldigt ovanliga hundraser som är få till antalet individer (Leroy 2011).

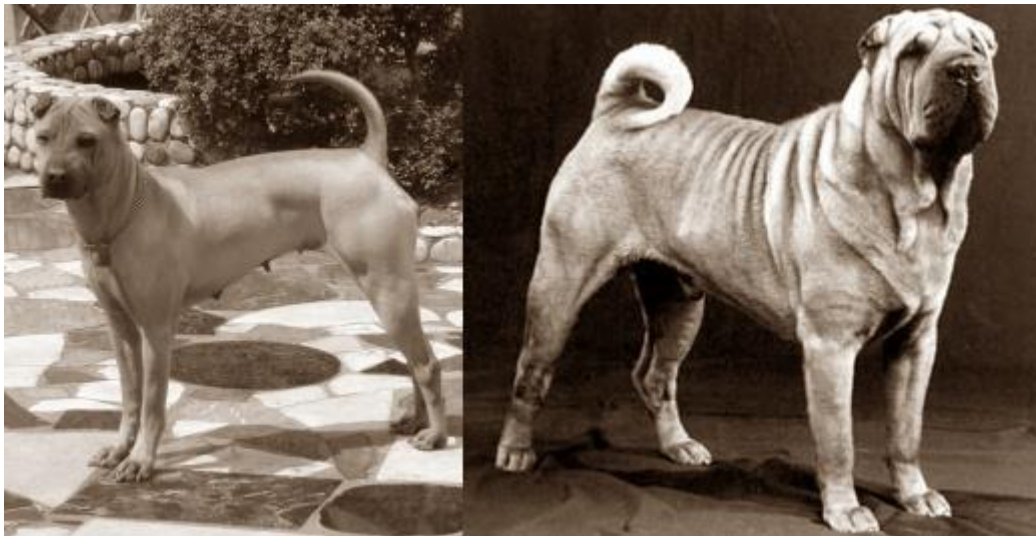
Genetiska sjukdomar till följd av avel

I det här avsnittet presenteras tre genetiska sjukdomar som nutidens populära hundraser lider av. Följande sjukdomar är antingen direkta eller indirekta följder utav avel på specifika fenotyper.

Shar-pei-feber

Ett bra exempel på att artificiell selektion på en önskad fenotyp kan medföra andra oönskade fenotyper är en åkomma hos den kinesiska hundrasen shar-pei som kallas shar-pei-feber (FSF: Familial Shar-pei Fever). Den här åkomman yttrar sig som återkommande perioder med, fram tills nyligt, oförklarlig feber och inflammationer i lederna (Olsson *et al.* 2011). Shar-pei är en ras med lång historia som har sitt ursprung i Kina. I studier där olika hundrasers genom analyserats grupperas kinesisk shar-pei bland de raser som räknas som ”uråldriga” (Ostrander & Wayne 2005). I Kina avlas rasen med annan standard än vad som görs i västvärlden. Detta

har resulterat i två distinkta fenotyper, traditionell shar-pei från kinesisk avel och ”meatmouth” från avel i väst (figur 4).

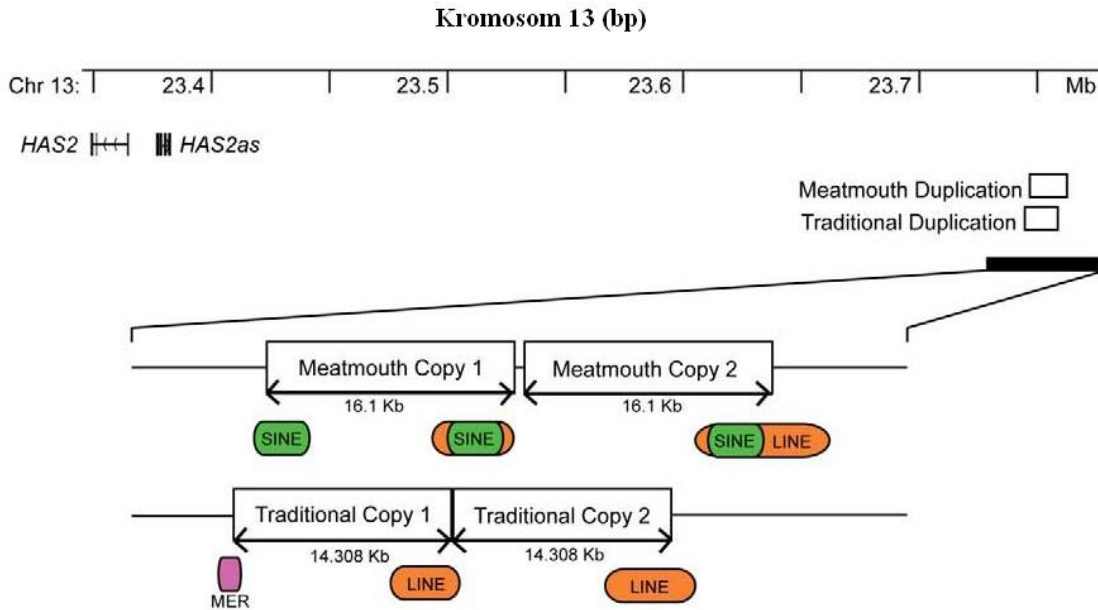


Figur 4. Till vänster syns en shar-pei avlad efter kinesisk standard, en s.k. traditionell shar-pei. Till höger syns en shar-pei avlad efter västerlig standard, en s.k. meatmouth shar-pei. Bild skapad av bilder från www.hkshar-pei.com och www.vonwrinkles.com.

Förutom infektioner i hudvecken lider meatmouth-varianten av FSF i mycket större utsträckning än traditionell shar-pei.

När man observerar två unika väldigt olika fenotyper, meatmouth och FSF, där den ena är väldigt negativ (FSF) och den andra har selekterats väldigt hårt (meatmouth) så misstänker man genast någon form av genetisk länk mellan dem, inte nödvändigtvis en fysisk länk dock. För att identifiera vilken del av genomet som orsakade FSF utförde Olsson *et al.* (2011) en GWA-studie och ett S_i -test för att identifiera de delar av genomet som är unika för rasen shar-pei. 50 shar-pei födda i Nordamerika (meatmouth) jämfördes med 240 hundar som representerade 29 andra raser och på kromosom 13 upptäcktes då ett område som inom rasen shar-pei visade mycket hög homozygositet. Området man fann ligger strax uppströms från *HAS2* genen, CanFam 2.0: Chr13: 23,487,992–27,227,623 (position i genomet från tjänsten CanFam 2.0)(Broad Institute 2012b). *HAS2* är en gen som kodar för ett enzym som fungerar som ett syntas för hyaluronan (HA), enzymet styr med andra ord produktionen av proteinet HA. HA är en glykosaminoglykan ($C_{14}H_{21}NO_{11}$) som är inblandad i bland annat reparering av hud och vävnad.

HA har en anmärkningsvärt hög molekylärvikt och lagras bland annat i bindvävnad (Fraser *et al.* 1997). När man stöter på stor homozygositet hos en extremt rynkig hund i ett område nära en gen som producerar en anmärkningsvärt stor molekyl som lagras i bland annat skinnets så kan man gissa att man hittat genen som styr rynkigheten hos shar-pei. Vad man fann i regionen innan *HAS2* var en duplicering av ett element som reglerar transkriptionen av *HAS2*. Dupliceringen som hittades döptes till ”The meatmouth duplication” och är ett 16,1kb långt segment av kromosom 13 (figur 5). Detta jämfört med samma sträcka hos traditionell shar-pei, som är ett 14,3kb långt segment, också en duplicering (Olsson *et al.* 2011). Resultatet av det, jämfört med traditionell shar-pei, förhöjda antalet dupliceringar är en uppreglering av HA-syntas vilket resulterar i förhöjda koncentrationer hyaluronan i hundens hud.



Figur 5. Meatmouth-dupliceringen och den traditionella dupliceringen. Här visas att meatmouth dupliceringen är längre än den traditionella dupliceringen, 16,1 kb respektive 14,308 kb. SINE och LINE är retrotransposonelement. Omritad från Olsson *et al.* (2011).

För att sedan koppla ihop detta till förekomsten av FSF inom rasen undersökte Olsson *et al.* (2011) ett antal dupliceringar hos 24 FSF-diagnostiserade shar-pei och 17 friska shar-pei. De fann en signifikant koppling mellan "The meatmouth duplication" och hundar diagnostiserade med FSF när dessa jämfördes med friska hundar ($p = 0.0001$, Mann-Whitney test). Man misstänker i det här fallet att fler dupliceringar av "The meatmouth duplication" leder till ökad koncentration av HA i kroppen, detta kunde dock inte statistiskt fastställas. Då det är väldigt svårt att bestämma koncentrationen av HA i kroppen den fluktuerar väldigt så skall detta inte uteslutas. Men den starka kopplingen mellan dupliceringsantalet för meatmouth och FSF indikerar att antalet dupliceringar inte bara är en markör för sjukdomen utan dess faktiska orsak. En idé är att det extra HA som produceras fragmenteras och triggar en immunrespons vilket resulterar i feber, detta måste dock studeras mer (Olsson *et al.* 2011).

Addisons sjukdom

Addisons sjukdom är en autoimmun sjukdom som bryter ned binjurebarken och försämrar dess förmåga att producera steroider, specifikt glukokortikoider (GK) och mineralokortikoider. Glukokortikoider kan delas upp i två grupper, immun-glukokortikoider och metabolism-glukokortikoider. GK:s roll i immunsystemet är att nedreglera inflammatoriska processer genom att uppreglera anti-inflammatoriska proteiner, detta sker med hjälp av kortisol (Klein & Peterson 2010).

GK:s roll i metabolismen styrs också i huvudsak av kortisol. Kortisol produceras av binjurebarken som en respons på adrenokortikotropiskt hormon (ACTH) som utsöndras av hypofysen vilket kopplar samman det endokrina systemet med nervsystemet. Denna koppling sker genom hypotalamus. Kortisols slutgiltiga effekt på metabolismen är att höja koncentrationen av glukos i blodet. Detta sker genom uppreglering av glukogenolysen vilket är nedbrytningen av glykogen i lever och fett till metaboliter för citronsyracykeln. Kortisol är ett livsviktigt hormon och utan tillskott av detta hormon dör en hund som inte kan producera det själv. Bland mineralokortikoiderna är det aldosteron som är aktuellt för den här sjukdomen. (Klein & Peterson 2010). Symptomen för försämrad förmåga att producera kortisol, alltså

Addisons sjukdom, är bland annat kräkningar, viktnedgång, trötthet och till slut döden om det lämnas obehandlat (Oberbauer *et al.* 2006, College of veterinary medicine 2012).

Sjukdomen är inte kopplad till någon rasspecifik fenotyp som i fallet med FSF ovan. Men eftersom individer med sjukdomen ofta blir sjuka sent i livet så avlas det omedvetet en hel del på den, detta reflekteras i dess relativt vanliga förekomst trots dess dödliga påföljd.

Oansvarigt användande av populära avelsindivider, som då kan vara bärare, ökar spridningsrisken ytterligare (Chase *et al.* 2006).

Den här sjukdomen har påträffats i de flesta raser men hos bearded collie, grand danois, highland white terrier, portugisisk vattenhund (PVH), rottweiler, nova scotia duck tolling retriever, springer spaniel och alla typer av pudlar är risken för Addisons sjukdom mycket högre än i andra raser (Oberbauer *et al.* 2006).

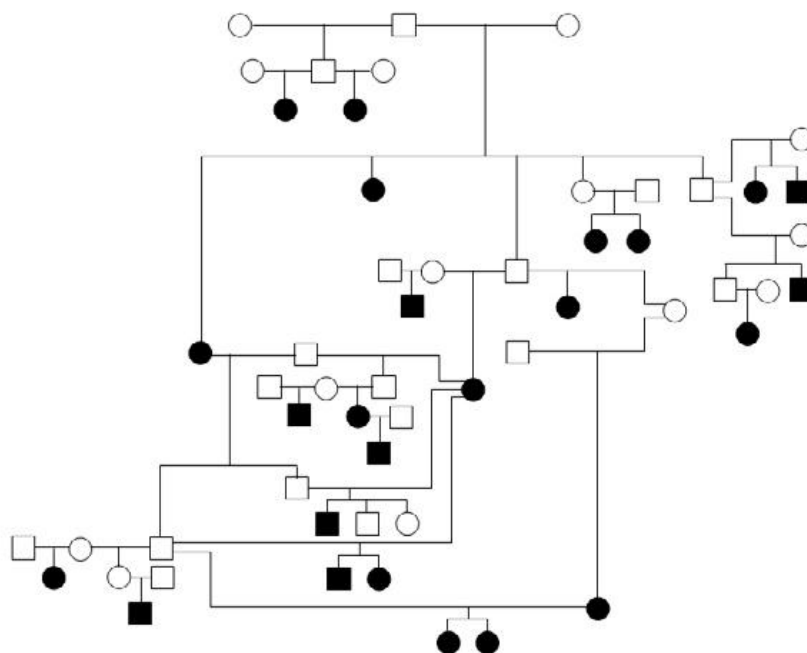
Den portugisiska vattenhunden är en ras med relativt hög inavelsgrad där 90% av det genetiska materialet härstammar från endast 10 individer. Det är dessutom få uppfödare som ägnar sig åt rasen, alla portugisiska vattenhundar som idag är registrerade kan spåras tillbaka till endast 2 uppfödare på 60-talet. Detta tillsammans med det faktum att dagens PVH klubbar är engagerade i kontakten med forskare för att få sin favoritras frisk gör den portugisiska vattenhunden till en utmärkt modellorganism för forskning på Addisons sjukdom (Chase *et al.* 2006).

Oberbauer *et al.* (2006) gjorde en studie på ärftligheten av Addisons sjukdom hos portugisisk vattenhund. Detta gjordes dels för att förbättra framtida avel på rasen men också för att kunna förstå sjukdomen när den uttrycks i människor bättre. I studien fann man att Addisons sjukdom har genetiskt ärftliga komponenter med en ärftlighetsgrad av 0,49 ($\pm 0,16$). Man fann även att sjukdomen visar ärftlighetsmönster som indikerar en autosomal recessiv allel. Vidare visade Oberbauer *et al.* (2006) att risken för att bli drabbad av Addisons ökar med inavelsgraden (Oberbauer *et al.* 2006) (tabell 1).

Tabell 1. Relationen mellan inavelskoefficient och Addisons sjukdom. Parentes indikerar totalt antal hundar i korresponderande inavelsgradsgrupp. Ritad efter data från Chase *et al.* (2006)

Inavels-koefficient, F	Hundar drabbade av Addisons (%)
0,00 – 0,05 (205)	5,4
0,05 – 0,10 (97)	8,3
0,10 – 0,15 (70)	21,4
>0,15 (23)	21,7

Detta mönster tillsammans med det faktum att inavel leder till ökad homozygotitet och mer uttryck av recessiva alleler stämmer bra överens med en recessiv allel som nedärvs enligt Mendels mönster. Figur 6 visar en liten del av det släkträd som hundarna i undersökningen tillhör. Alla drabbade hundar i undersökningen kunde spåras tillbaka till samma förfäder från 60-talet.



Figur 6. Släkträd över en del av de Addisons-drabbade hundarna som användes i Oberbauer *et al* (2006). Cirklar resprenterar tikar och kvadrater representerar hanar. Fyllda symboler representerar individer med Addisons sjukdom. Det faktum att två icke drabbade individer (ej ifylld symbol) kan få Addisons drabbad avkomma indikerar att en recessiv allel orsakar sjukdomen (Oberbauer *et al* 2006). Bild återgiven i enlighet med licensen: <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0>.

Eftersom Addisons sjukdom har en sen början så räcker det inte med att bara låta bli att avla på hundar med sjukdomssymptom. För att förhindra spridning krävs en undersökning efter markörer som indikerar att hunden är bärare av allelen och vid förekomst uteslutande av denna individ ur aveln.

Chase *et al.* (2006) genomförde en studie på 806 tidigare genotypade portugisiska vattenhundar, varav 57 med Addisons sjukdom, för att hitta de specifika generna bakom sjukdomen. 682 markörer spridda över hundarnas genom försökte man associera till Addisons sjukdom. För att avgöra om en specifik markör var associerad till sjukdomen utfördes "Fishers exact test" på varje markör. Tre markörer av intresse fanns vid detta försök, två på kromosom 12 och en på kromosom 37 (Chase *et al.* 2006) (tabell 2).

Tabell 2. Modifierad tabell från Chase et al (2006). "Frekvens total" är markörens frekvens beräknad på alla 806 hundar. "Frekvens sjuka" är markörens frekvens beräknad på de 57 sjuka hundarna. P-värdet är beräknat med "Fishers exakt test" och indikerar en signifikant association mellan markör och sjukdom.

Markör	Kromosom	Position i genomet, MB	Storlek på allel, bp	Frekvens total	Frekvens sjuka	P-värde
FH2202	12	5281978	462	0,28	0,51	0,000226
FH2975	12	7347129	300	0,29	0,51	0,000795
FH2532	37	25197477	338	0,24	0,09	0,045953

Vilken eller vilka gener det är som faktiskt är orsaken till Addisons sjukdom är svårare att avgöra. Men bland de gener som ligger i närheten av dom tre markörerna finns tre gener av speciellt intresse. Generna **HLA-DRB1** och **HLA-DQA1** på kromosom 12 är hundens motsvarighet till de mänskliga generna HLA-DRB1*04 respektive HLA-DQA1*0301 vilka är involverade i människans histokompatibilitetskomplex som kodar för immunförsvarets antigener. Mer studier på de här generna krävs. Genen **CTLA-4** på kromosom 37 är hos människan inblandad i nedreglering av immunförsvaret. Detta verkar också vara en gen värd mera studier (Chase *et al.* 2006).

Dermoid Sinus

Ridgeback är en fenotyp som avlas hårt på inom bland andra kambodjansk razorback, rhodesian ridgeback, phu quoc ridgeback och thai ridgeback-hundar. Fenotypen karaktäriseras av ett område på ryggen där håren växer åt ett annat håll än på resten av ryggen, en hårkam (figur 7).



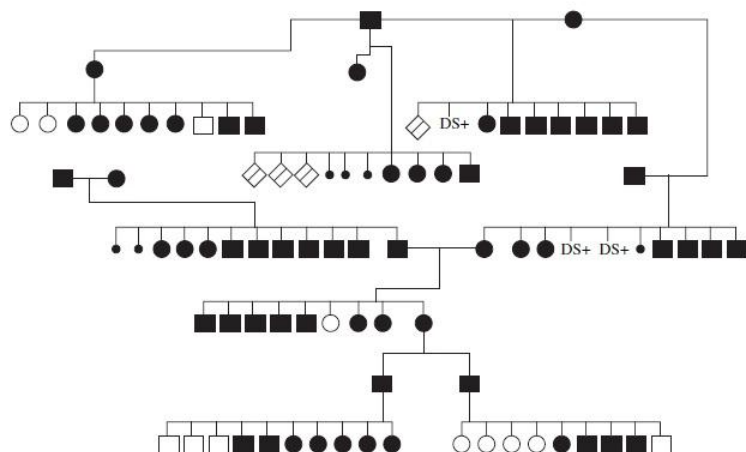
Figur 7. Ridgeback hos rhodesian ridgeback (foto av Stefan Heinz, hämtat på: <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Ridge.jpg>).

Dermoid sinus är en åkomma som orsakar en tubformad fördjupning i huden. Den inåtväxande tuben kan antingen vara placerad framför (i huvudändan) eller bakom hårkammen på ryggen. Tuben är ett neuralrör som växt fel under utvecklingen och öppnar ett rör från huden till ryggraden (Salmon Hillbertz & Andersson 2006).

Åkomman kan orsaka både hjärnhinneinflammation och lokala infektioner. Om dermoid sinus lämnas obehandlad kan den vara livshotande för hunden (Spielman 2012).

I den forskning som gjorts på dermoid sinus hos hundar har rhodesian ridgeback huvudsakligen använts som modellhund. På grund av att uppfödare av rhodesian ridgeback har rapporterat förekomst av dermoid sinus i deras kullar till svenska rhodesian ridgeback klubben från så tidigt som 1964 finns det väldigt mycket data att använda för forskning. 8-10% av de hundar som föds med fenotypen ridgeback föds också med dermoid sinus (Salmon Hillbertz *et al.* 2007)

Salmon Hillbertz och Andersson (2006) undersökte ett familjetråd för 4 generationer rhodesian ridgeback och fann att hårkammen nedärvs autosomalt och dominant (figur 8). Ett χ^2 -test associerade sedan dermoid sinus till hundar med ridgeback.



Figur 8. Familjeträd över 4 generationer rhodesian ridgeback. Ifylld symbol representerar fenotypen hårkamm. Ej ifyllda symboler representerar individer som ej visar fenotypen hårkamm. DS+ representerar individer som föddes med dermoid sinus och sedan avlivades. Nedärvningsmönstret indikerar att det är en automomal dominant allel som kodar för ridgeback hos rhodesian ridgeback. Återgiven med tillstånd från John Wiley and Sons (Salmon Hillbertz & Andersson 2006).

I en senare artikel försöker Hillbertz *et al.* (2007) ta reda på mer om genetiken bakom ridgeback och dermoid sinus hos rhodesian ridgeback. När 11 hundar med dermoid sinus undersöktes fann man att 10 av dessa hundar var homozygota för en 750kb lång haplotyp på kromosom 18 som inga hundar utan ridgeback hade. Vidare undersökning av haplotypen visade att 43 av 45 hundar med ridgeback var heterozygota för en SNP (SNP#51399353). Den här SNP:n visade sig vara del i en 133,4kb lång duplicering som antas vara orsaken till ridgeback (tabell 3). Tabell 3 visar tydligt att den största riskgruppen för dermoid sinus är de individer som har dupliceringen på båda kopiorna av kromosom 18.

Tabell 3. Modifierad tabell från Salmon Hillbertz *et al.* (2007). Här visas kopplingen mellan en duplicering på kromosom 18 och fenotyperna ridgeback och dermoid sinus (DS). -/- avser ingen duplicering, +/- avser duplicering endast på ena kromosomkopian, +/+ avser duplicering på båda kromosomerna.

Fenotyp	Förekomsten av duplicering på kromosom 18		
	-/-	-/+	+/+
Saknar ridgeback, DS-	10	0	0
Ridgeback, DS+	0	2	10
Ridgeback, DS-	0	16	4

Inom den duplicerade sekvensen fann man 3 gener av intresse; FGF3, FGF4 och FGF19. FGF-generna kodar för olika tillväxtfaktorer som är inblandade i embryoutveckling. Då det ligger en duplicering bakom dermoid sinus misstänker man att det ligger någon FGF-doseffekt bakom problemet. En hypotes är att det finns ett eller flera regulationselement inom den duplicerade sekvensen. Detta kan resultera i att de ovannämnda FGF-generna överuttrycks och stör embryoutvecklingen (Salmon Hillbertz *et al.* 2007).

Diskussion

För att bli av med några av de här genetiska sjukdomarna föreslår jag bättre kommunikation mellan rasklubbar, uppfödare och forskare inom ämnet. Den här uppgiften ligger enligt mig till stor del på forskarnas axlar då de behöver göra sig mer lättillgängliga för frågor och råd. Det kan också vara en bra idé att låta genetiker vara med och bestämma avelsregler i kennelklubbens stadgar gällande de raser som är speciellt drabbade, till exempel de raser som tagits upp i den här litteratursammanfattningen.

I fallet med dermoid sinus hos rhodesian ridgeback så kan man ganska lätt eliminera sjukdomsallelen i populationen och till viss del behålla den önskade fenotypen ridgeback. Idag tas individer utan ridgeback helt bort från aveln och individer med dermoid sinus brukar avlivas, det innebär att individer som är heterozygota för ridgeback selekteras kraftigt. Om man återintroducerar de individer som saknar ridgeback men är friska kan man undvika att valparna blir homozygota för ridgeback och uttrycker dermoid sinus. Men för att då inte förlora ridgebackfenotypen skulle man alltid behöva para individer som saknar ridgeback med individer som har ridgeback. Och för att undvika dermoid sinus bör aldrig två individer med ridgeback paras. Andelen individer med ridgeback skulle visserligen sjunka i populationen men dom skulle finnas kvar och anlagen för dermoid sinus skulle helt försvinna på bara ett par generationer.

Ett annat sätt att förhindra avel på hundar med oönskade fenotyper som inte kan upptäckas med bara en veterinärundersökning är att försöka effektivisera skanning efter sjukdomsmarkörer och få ner priset för dessa. Lyckas man med detta kan man erbjuda, eller i kennelklubben kräva, att uppfödare skall göra en skanning efter sjukdomsmarkörer på individer som skall sättas i avel.

Som privatpersoner kan vi också göra en skillnad. Om alla som är intresserade av att köpa en hund först tar del av den forskning som finns på hundrasen och tar reda på vilka sjukdomar hundrasen eventuellt lider av kan vi kräva av hunduppfödarna att antingen få en skanning efter sjukdomsmarkörer utförd eller åtminstone kräva sjukdomshistorik på hundens föräldrar och då inte köpa hunden om sjukdomsalleler finns. Detta tror jag skulle ganska snabbt avsluta avel på sjuka individer då det ofta är inkomsten som styr uppfödarna.

Problemen som diskuterats i den här litteratursammanställningen gäller inte bara den domesticerade hunden. Addisons sjukdom har motsvarigheter hos flera andra arter, bland dem också människan. Det är därför väldigt viktigt att forskningen på hundar bedrivs och att resultaten når ut till samhället i övrigt. Dom flesta resultat som nås gällande forskning på genetiska sjukdomar hos hunden kan också användas till viss grad för att förbättra behandling och förebygga de motsvarande sjukdomarna hos människan. Genom att bedriva forskningen på hundar istället för människor kan man komma runt en hel del etiska problem som forskning på människor innebär. Man kan dessutom använda det faktum att mycket utförliga släkträd ofta finns tillgängliga för populära individer som används i hundaveln.

Tack

Tack till Anna Gellerbring, David Kosek, Simon Eckerström Liedholm och Roos van der Spoel för konstruktiv kritik och hjälp med skrivprocessen. Tack också till Katariina Kiviniemi Birgersson och Monika Schmitz för hjälp med val och definition av uppsatsämne. Sist men

inte minst vill jag också tacka min vita herdehund Lumi som inspirerade mig att undersöka problemen med hundavel i detalj.

Referenser

- Bardeleben C, Moore RL, Wayne RK. 2005. A molecular phylogeny of the Canidae based on six nuclear loci. *Molecular phylogenetics and evolution* **37**: 815-31.
- Broad Institute, 2012a. Dog Genome Project. WWW-dokument: <http://www.broadinstitute.org/mammals/dog-genome-project>. Hämtad 2012-05-02.
- Broad Institute, 2012b. Dog SNPs. WWW-dokument: <http://www.broadinstitute.org/mammals/dog/snp2>. Hämtad 2012-05-07.
- Calboli F.C.F., Sampson J, Fretwell N, Balding DJ. 2008. Population structure and inbreeding from pedigree analysis of purebred dogs. *Genetics* **179**: 593-601.
- Campbell N, Reece J, Urry L, Cain M, Wasserman S, Minorsky P, Jackson R. 2008. Point mutations can affect protein structure and function. *Biology*, ss. 344-346. Pearson Benjamin Cummings, San Francisco.
- Chase K, Sargan D, Miller K, Ostrander Ea, Lark KG. 2006. Understanding the genetics of autoimmune disease: two loci that regulate late onset Addison's disease in Portuguese Water Dogs. *International journal of immunogenetics* **33**: 179-84.
- College of veterinary medicine. 2012. Pet Health Topics: Addinsons Disease. WWW-dokument: <http://www.vetmed.wsu.edu/cliented/addisons.aspx>. Hämtad 2012-05-14.
- DeRose M. 1999. A comparison of inbreeding depression in life-history and morphological traits in animals. *Evolution* **53**: 1288-1292.
- Delisle I, Strobeck C. 2005. A phylogeny of the Caniformia (order Carnivora) based on 12 complete protein-coding mitochondrial genes. *Molecular phylogenetics and evolution* **37**: 192-201.
- Fraser JR, Laurent TC & Laurent UB. 1997. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *Journal of internal medicine* **242**: 27-33.
- Ignal AV, Ilan DM. 2002. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Review Literature And Arts Of The Americas* **34**: 275-305.
- Klein SC, Peterson ME. 2010. Canine hypoadrenocorticism: Part I. Stress: *The International Journal on the Biology of Stress* **51**: 63-69.
- Klug WS, Cummings MR, Spencer CA, Palladino M. 2007a. Genetic Tests Based on Restriction Enzyme Analysis. *Essentials of Genetics*, ss. 431-432. Pearson Benjamin Cummings, San Fransisco.
- Klug WS, Cummings MR, Spencer CA, Palladino M. 2007b. Population Genetics. *Essentials of Genetics*, ss. 506-509. Pearson Benjamin Cummings, San Francisco.
- Leroy G. 2011. Genetic diversity, inbreeding and breeding practices in dogs: results from pedigree analyses. *Veterinary journal (London, England : 1997)* **189**: 177-82.
- Lindblad-Toh K, Wade CM, Mikkelsen TS, Karlsson EK, Jaffe DB, Kamal M, Clamp M, Chang JL, Kulbokas EJ, Zody MC, Mauceli E, Xie X, Breen M, Wayne RK, Ostrander EA, Ponting CP, Galibert F, Smith DR, DeJong PJ, KirknessE, Alvarez P, Biagi T, Brockman W, Butler J, Chin C, Cook A, Cuff J, Daly MJ, DeCaprio D, Gnerre S, Grabherr M, Kellis M, Kleber M, Bardeleben C, Goodstadt L, Heger A, Hitte C, Kim L, Koepfli K, Parker HG, Pollinger JP, Searle SMJ, Sutter NB, Thomas R, Webber C, Broad Institute Genome Sequencing Platform, Lander ES. 2005. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature* **438**: 803-19.
- National Human Genome Research Institute, 2012. Genetic Mapping Fact Sheet. WWW-dokument: <http://www.genome.gov/10000715>. Hämtad 2012-05-02.

- National Human Genome Research Institute, 2011. Genome-Wide Association Studies Fact Sheet. WWW-dokument: <http://www.genome.gov/20019523>. Hämtad 2012-05-02.
- Oberbauer a M, Bell JS, Belanger JM, Famula TR. 2006. Genetic evaluation of Addison's disease in the Portuguese Water Dog. *BMC veterinary research* **2**: 15.
- Olsson M, Meadows JRS, Truvé K, Rosengren Pielberg G, Puppo F, Mauceli E, Quilez J, Tonomura N, Zanna G, Docampo MJ, Bassols A, Avery AC, Karlsson EK, Thimas, A, Kastner DL, Bongcam-Rudloff E, Webster MT, Sanchez A, Hedhammar Å, Remmers EF, Andersson L, Tintle L, Lindblad-Toh, K. 2011. A novel unstable duplication upstream of HAS2 predisposes to a breed-defining skin phenotype and a periodic fever syndrome in Chinese Shar-Pei dogs. *PLoS genetics* **7**: 1001332.
- Ostrander Elaine a, Wayne RK, 2005. The canine genome. *Genome research* **15**: 1706-1716.
- Salmon Hillbertz NHC, Andersson G. 2006. Autosomal dominant mutation causing the dorsal ridge predisposes for dermoid sinus in Rhodesian ridgeback dogs. *Journal of Small Animal Practice* **47**: 184-188.
- Salmon Hillbertz NHC, Isaksson M, Karlsson EK, Hellmén E, Rosengren Pielberg G, Savolainen P, Wade CM, von Euler H, Gustafson U, Hedhammar Å, Nilsson M, Lindblad-Toh K, Andersson L, Andersson G. 2007. Duplication of FGF3, FGF4, FGF19 and ORAOV1 causes hair ridge and predisposition to dermoid sinus in Ridgeback dogs. *Nature Genetics* **39**: 1318-1320.
- Savolainen P, Zhang Y, Luo J, Lundeberg J, Leitner T. 2002. Genetic evidence for an East Asian origin of domestic dogs. *Science (New York, N.Y.)* **298**: 1610-1613.
- Spielman B. 2012. Dermoid Sinus. WWW-dokument 2012: <http://www.petplace.com/dogs/dermoid-sinus/page1.aspx>. Hämtad 2012-05-30.
- Sutter NB, Eberle Ma, Parker HG, Pullar BJ, Kirkness EF, Ktuglyak L, Ostrander Ea. 2004. Extensive and breed-specific linkage disequilibrium in *Canis familiaris*. *Genome research* **14**: 2388-2396.
- Svenska Shar-pei Klubben, 2009. Rasspecifik Avels Strategi för Shar Pei. WWW-dokument: <http://www.skk.se/Global/Dokument/RASdokument/RAS-shar-pei.pdf?epslanguage=sv> . Hämtad 2012-05-02.
- Vaysse A, *et al.*, 2011. Identification of genomic regions associated with phenotypic variation between dog breeds using selection mapping. *PLoS genetics* **7**: e1002316.
- Vila C. 1997. Multiple and Ancient Origins of the Domestic Dog. *Science* **276**: 687-1689.
- Wilbe M, Jokinen P, Truvé K, Seppala EH, Karlsson EK, Biagi T, Highes A, Bannasch D, Andersson G, Hansson-Hamlin H, Lohi H, Lindblad-Toh K. 2010. Genome-wide association mapping identifies multiple loci for a canine SLE-related disease complex. *Nature genetics* **42**: 250-254.