



Høgskolen i Telemark

*Canis lupus familiaris* (hund):

- Oversikt over genetiske studier
- Genotyping og evaluering i forhold til adferd

Eirik Hvaara



Mastergradsoppgave i natur, helse og miljøvern, tilrettelagt for lærere

2009

60 studiepoeng



Avdeling for allmennvitenskaplige fag

Hallvard Eikas plass, 3800 Bø

Tittel:	<i>Canis lupus familiaris</i> (hund): <ul style="list-style-type: none"><li>• Oversikt over genetiske studier</li><li>• Genotyping og evaluering i forhold til adferd</li></ul>
Nøkkelord:	<i>Canis lupus familiaris</i> , hundens genom, domestisering, genotyping, polymorfismer, telomerase, dog <i>TERT</i> , pelsfarge, hjertelidelser, adferds-gen, oppmerksomhetssvikt, impulsiv adferd, endofenotype, ADHD
Forfatter	Eirik Hvaara
Studentnr.:	935008
Fagkode:	4317
Oppgavetype:	Mastergradsoppgave
Studiepoeng:	60
Studium:	Masterstudium i natur, helse og miljøvern tilrettelagt for lærere
Konfidensiell:	Nei

## **Forord**

Denne mastergradsoppgaven er gjennomført på bioteknologilaboratoriet ved Institutt for natur, helse og miljøvern ved Høgskolen i Telemark (HiT), avdeling Bø. Den praktiske delen med innsamling av hundeprov og kartlegging av DNA ble gjennomført i høstsemesteret 2008 og oppgaveskrivingen ble utført i høstsemesteret 2008 og vårsemesteret 2009.

Oppgaven er skrevet med tanke på mitt videre yrkesliv som naturfag- og biologilærer ved Thor Heyerdahl videregående skole i Larvik hvor jeg har jobbet siden 1996. Utgangspunktet for oppgaven er hunden og dens genom. Siden naturfag og biologi er store fagfelt så er mastergradsoppgaven forholdsvis bred emnemessig slik at den kan gi meg faglig innsikt i flere temaer for bruk i skolehverdagen.

Jeg har hatt en flott periode som student ved HiT og vil spesielt takke to ansatte. En stor takk til min veileder PhD Mona Sæbo for inspirerende veiledning og til avdelingsingeniør Karin Brekke Li for hjelp under gjennomføring av laboratoriearbeidet.

Larvik 4.mai 2009

Eirik Hvaara

## Innhold

Sammendrag.....	5
Ordforklaringer og forkortelser.....	7
Hensikten med oppgaven.....	10
1 Innledning.....	11
1.1 Hundens genom.....	12
1.1.1 Domestisering av hunden.....	13
1.1.2 Domestiseringens arv.....	14
1.2 Gener og sykdom.....	16
1.2.1 Kreft.....	17
1.2.1.1 Kreft og telomeraseaktivitet.....	17
1.2.1.2 Telomerlengder og telomeraseaktivitet i hund.....	20
1.2.1.3 Hundens telomerase-reverse-transkriptasegen ( <i>TERT</i> ).....	21
1.2.1.4 Effekt av telomerasehemmere i kreftceller.....	28
1.2.1.5 RNA-interferens (RNAi).....	29
1.2.1.6 Telomerasestatus hos hunder med benkreft.....	29
1.2.2 Hjertelidelser.....	31
1.2.2.1 Dilatert kardiomyopati (DCM).....	32
1.2.2.2 Misdanning av høyre hjerteklaff - canine tricuspid valve malformation (CTVM).....	37
1.2.2.3 Arytmogen høyre ventrikel dysplasi/kardiomyopati (ARVD/C).....	38
1.2.2.4 Atrieflimmer (AF).....	39
1.3 Gener og pelsfarge.....	41
1.3.1 Hovedfargelokus hos hund.....	42
1.3.1.1 <i>Melanocortin 1 receptor (MC1R)</i> – svart-brunt til gul-rød.....	43
1.3.1.2 <i>Agouti signal-peptide (ASIP)</i> – fra rød til svart.....	44
1.3.1.3 <i>Tyrosinase related protein 1 (TYRP1)</i> – svart eller brunfarge.....	46
1.3.1.4 <i>Beta-defensin 103 (CBD103)</i> – svart og brun med innslag av andre farger....	48
1.3.1.5 Gen som påvirker uttrykket av hovedpelsfarger.....	50
1.4 Gener og adferd.....	59
1.4.1 <i>Dopaminreseptor-D4 (DRD4)</i> .....	60
1.4.2 <i>Monoamin oksidase B (MAOB)</i> .....	62
1.4.3 <i>Catechol O-Metyltransferase (COMT)</i> .....	63
2 Material og metode.....	65
3 Resultater.....	74
4 Diskusjon.....	84
5 Konklusjon.....	89
6 Referanser.....	90
7 Appendiks.....	103
7.1 Appendiks A Innsamling og klargjøring av Whatman Indicating FTA® Micro kort... 103	
7.2 Appendiks B – Informasjon om oppgaven og spørreskjema om hundenes adferd som ble gitt til hundeeierne.....	105
7.3 Appendiks C Kjemikalier.....	107

## Sammendrag

Denne mastergradsoppgaven tar for seg genetiske studier gjort på hund innen kreft, hjertelidelser og pelsfarge. I tillegg er 139 hunder fra rasene Samojedhund, Leonberger, Rottweiler, Flatcoated Retriever, Welsh Corgi Pembroke og Golden Retriever genotypet i forhold til *DRD4*, *MAOB* og *COMT*, samt at polymorfismene innen disse genene er evaluert mot adferdstypene oppmerksomhetssvikt og impulsiv adferd. Dette er adferdtyper som er relatert til ADHD.

Forskning på kreft hos hund, spesielt telomeraseaktivitet har ført til mange positive funn. Ulike kreftceller er påvist telomerasepositive, noe som er meget sjeldent i normale celler. Genet som koder for hundens Telomerase-reverse-transcriptase (dogTERT) er funnet og studier i forhold til telomerasestatus i ulike celletyper er gjennomført. DogTERT og deler av dens promotorregion er sekvensert, og effekten av ulike telomerasehemmere er studert. Det har vært mye fokus på hjertelidelser hos hund, men så langt er ikke konkrete genetiske markører funnet. Innen pelsfargegenetikken kjenner man nå mange av de genene som forårsaker spesifikke farger og man har kartlagt mye av hvordan arvegangen fungerer for mange av fargene.

Det ble foretatt genotyping av 6 hunderaser på utvalgte polymorfismer som tidligere er assosiert med avvikende adferd som blant annet schizofreni, ADHD og sensasjonssøkende adferd hos mennesker (*DRD4*, *MAOB* og *COMT*). Totalt ble 137 hunder genotypet for *DRD4*, 139 for *MAOB*, 104 for *COMT G216A* og 138 for *COMT G482A*.

Resultatene fra undersøkelsene viste karakteriseringer av lengdepolymorfismer av *DRD4* innen ekson III som tidligere ikke er publisert hos hund. Nye lengder var 422 bp, 431 bp, 467 bp og 490 bp. Samojedhundene var de eneste med det 490 bp lange *DRD4*-allelet. 81.92 % av Samojedhundene hadde 490 bp-allelet. Flatcoated Retriever var den eneste rasen som var homozygot for *DRD4* 467 bp allelet.

Alle Samojedhundene og Rottweilerne var homozygote for *MAOB*-villtypen, samt at alle Leonbergerne og Rottweilerne var homozygote for *COMT G482A*-villtypen. For *COMT G216A* var det flest som var homozygote for villtypen når man så alle rasene samlet.

Endofenotypen i forhold til adferd på 93 av hundene ble bestemt ved hjelp av et validert spørreskjema for karakterisering av ADHD-relatert adferd på hund. Statistiske analyser av score fra spørreskjemaet sammenlignet med genotype ble gjennomført ved hjelp av Mann-Whitney U-test. Kategoriske variabler ble analysert ved hjelp av  $\chi^2$ -test.

Resultatene fra undersøkelsene viste at homozygot for *490* fikk signifikant høyere score i forhold til oppmerksomhetssvikt sammenlignet med andre genotyper av *DRD4* (*490/490* mot: *422/435* (P= 0.01), *422/467* (P=0.02), *431/490* (P=0.004) og alle de andre allelkombinasjonene (P=0.004)). I tillegg fikk individer som var bærere av polymorfismen i *MAOB* signifikant høyere score i forhold til impulsiv adferd (P= 0.02), og homozygote for polymorfismen på *COMT G216A* fikk signifikant lavere score enn homozygote for villtypen i forhold til oppmerksomhetssvikt (P=0.05).

I denne studien fant man en signifikant sammenheng mellom enkelte utgaver av *DRD4*, *MAOB* og *COMT G216A*, og ADHD-relatert adferd. Dette kan tolkes som at enkelte genotyper kan føre til spesifikk adferd hos hund, men man trenger en større studie for å avklare dette.

## Ordforklaringer og forkortelser

ADHD	Attention deficit hyperactivity disorder
AF	Atrieflimmer
Allel	Ulike utgaver av et gen som er på samme lokus på kromosomet
ALT	Alternativ forlenging av telomerene
Annealing	Skjer når primeren fester seg til DNA-tråden
Apoptose	En cellulær mekanisme som fører til en celledød
ARVD/C	Arytmogen høyre ventrikel dysplasi/kardiomyopati
ATG	Startkoden i et protein- koder for den første aminosyren
ATP	Kunstig oppregulering av hjerterytmen i forkamrene i hjertet
Autosomalt kromosom	Kromosom som ikke bestemmer kjønn
BAC	Kunstige bakterielle kromosomer
Bp	Basepar
cDNA	DNA kopi laget fra mRNA
COMT	Catechol O-metyltransferase
CTVM	Misdanning av høyre hjerteklaff hos hund
DCM	Dilatert kardiomyopati
Delesjonkonstruksjon	Kunstig sammensetning av DNA
Denaturering	Skjer når dobbeltrådet DNA skiller seg fra hverandre ved oppvarming
DNA	Deoxiribonucleiacid
Dominant allel	Allel som uttrykkes framfor recessivt allel
DRD4	Dopaminreseptor D4
Ebstein anomaly	Misdanning av høyre hjerteklaff hos mennesket
Ekson	En sekvens på DNA-tråden som koder for mRNA
Endofenotype	Komponent i et kompleks trekk som kan måles i for eksempel en tallscore
Eumelanin	Hudpigment – gir svart eller brun farger
Fenotype	Hvordan et gen blir uttrykt
Gen	En del av et kromosom, et stykke DNA, som koder for et RNA molekyl

Genom	Arvestoffet i en organisme
Genotype	Allel-kombinasjon ved et lokus eller sammensetning av gener i en organisme
Haplotype	Naboalleler av gener
Heterodimer	Et molekyl som består av to identiske molekyler
Heterozygot	Ulike allel ved samme lokus på kromosomet
Homozygot	Like allel ved samme lokus på kromosomet
In vitro	I en eksperimentell situasjon
In vivo	I organismen
Intron	Ikke-kodende del i DNAet
Karyotype	Kromosomene i en celle
Kreft	Ukontrollert cellevekst
Kromosom	Del i cellekjernen som inneholder blant annet arveanlegg
Lentivirus	Vektor for overføring av gener
MAOB	Mono-amine oksidase B
Mikromatrise	Brønner med flere typer prober i brønner som fester seg komplementært til mRNA
Mikrosatellitter	Korte sekvenser av DNA
mRNA	Messenger RNA, gir proteinoppskriften til ribosomene
mtDNA	Mitokondrie DNA
Mutasjon	Varig endring av DNA
Nedstrøms	Etter promoter, i eksonene eller intronene
Neoplasi	Dannelse av nytt vev
Neuron	Nervecelle
Neurotransmittersubstans	Signalstoffer som overfører impulser mellom nervecellene, eller fra nerve til muskel- eller kjertelceller
Nukleotid	Byggesteiner i et DNA molekyl som består av en nitrogenbase koblet sammen med et suktermolekyl og et fosfat
Oppstrøms	Før promotor, eksoner og introner
OSA	Benkreft
PCR	Polymerase chain reaction
Phaeomelanin	Hudpigment – gir lyse, rød/gule farger
Polymorfisme	To eller flere utgaver av et allel



Polymorfismen	En annen utgave av et allel, som er annerledes enn villtypen
Probe	Merket DNA-sekvens som er komplementær til et område på DNAet
Revers transkriptase	Enzym som kan omdanne et RNA-molekyl til et enkelttrådig DNA-molekyl
Recessivt allel	Blir ikke uttrykt ved tilstedeværelse av dominant allel
Restriksjonsenzym	Enzym som kutter i spesielle sekvenser i DNA, såkalte restriksjonssteder
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
RNA	Ribonukleinsyre
SD	Standardavvik
shRNA	Korte hårrulls RNA
SINE	Short Interspersed Repetitive Element, korte innsatte repeterte sekvenser i DNAet
SNP	Single nucleotide polymorphism, utbytting av nukletid i DNAet som kan endre koden for aminosyren
Stopkodon	Tre baser på enden av mRNA som stopper proteinproduksjonen i ribosomene
Telomerase	Enzym som forlenger telomerene
Telomerer	Ikke kodende ende på kromosomene
Telomestatin	Krefthemmende substrat
TERT	Telomerase Revers Transkriptase
TRF	Terminal Restriction Fragment
UTR	Untranslated region
Villtype	Det antatt opprinnelige allelet
VTP	Kunstig oppregulering av hjerterytmen i hovedkamrene i hjertet

## Hensikten med oppgaven

1. I teoridelen av oppgaven er formålet å kartlegge utvalgte emner med tanke på hva som er gjort av genetiske studier på hund. De utvalgte emnene (kreft, hjertelidelser og pelsfarge) skal gi en oversikt over aktuelle problemstillinger samt resultater som foreligger når det gjelder hund og genforskning.
2. Vi ønsket også å genotype utvalgte gener (*DRD4*, *MAOB* og *COMT*), som er satt i sammenheng med adferd i forskjellige hunderaser. Hensikten er å se på alleldistribusjonen i de ulike hunderasene.
3. I tillegg ønsket vi også å se på hundens adferd. Spørreskjema ble brukt med tanke på ADHD. Vi ønsket å undersøke om man kan linke spesifikk adferd opp mot spesifikke genotyper.

# 1 Innledning

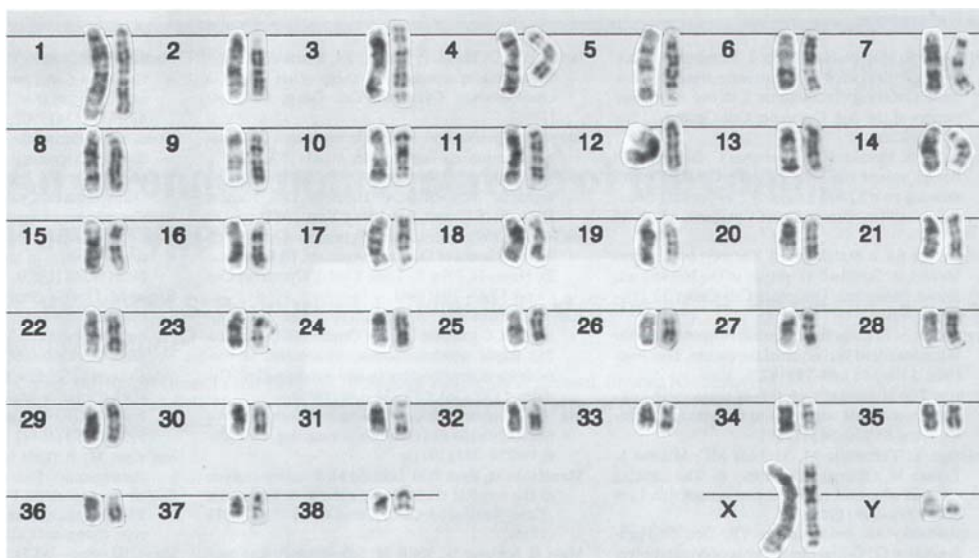
Hunden er som kjent menneskets beste venn. Vår trofaste følgesvenn har vært en del av menneskers hverdag i minst 15 000 år (Price og Gebauer 1995). I tillegg til sine sosiale egenskaper har hunden de siste årene vokst fram som et ideelt modelldyr for humane sykdommer. Grunner til dette er at hunden deler en lang rekke arvelige sykdommer med oss mennesker og er fysiologisk mer lik oss enn andre modelldyr (Tsai, Clark m. fl. 2007). Dette har ført til mye genetisk forskning på hunden de senere årene. Mye av fokuset har vært på sykdom og pelsfarge, men forskningen har også hatt som mål å finne gener som koder for adferd, da vi bruker hunden som en sosial venn. Forskning på sykdom har hatt som mål å finne gener som enten fører til sykdom eller som kan predisponere for sykdom. Ved funn av gener hos hunden er veien kort til å finne de samme genene hos mennesket. Det samme kan man si om mange behandlingsformer. Virker behandlingen på hunden vil den ofte også virke positivt på mennesket (Mellersh 2008).

I denne mastergradsoppgaven er hundens genom og arv fra ulven satt i fokus sammen med ulike forskningsfelt (kreft, hjertelidelser og pelsfarge) for å gi bredest mulig og mest mulig relevant kunnskap om hunden som rase og modelldyr for bruk i skoleverket. I tillegg genotypes ulike gener (*DRD4*, *COMT* og *MAOB*) og kartlegges i forhold til adferd. Innen læreplanene (Utdanningsdirektoratet 2006) i naturfag og biologi er kreft og hjerte sentrale begreper, samt at pelsfarge og adferd er trekk som elever lett kan observere og dermed omsette til praktisk nytte innen arvelæren.

## 1.1 Hundens genom

I 2003 igangsatte the US National Genome Research Institute et prosjekt til 30 millioner dollar for å sekvensere hele genomet til en Boxer-tispe ved navn Tasha. Grunnen til dette er at hunden ligger nært opp til mennesket evolusjonsmessig og informasjon om hundens genom vil forhåpentligvis bli et sterkt verktøy for å forstå menneskets genom og sykdommer (Mellersh 2008). Tasha ble valgt basert på en tidligere studie som viste liten grad av forskjell mellom kromosomene som danner par hos denne hunden (Parker, Kim m. fl. 2004), noe som ville gjøre sekvenseringsprosessen lettere. Totalt spenner genomet til hunden over cirka 2.4 Gb og cirka 19 300 gener (Lindblad-Toh, Wade m. fl. 2005), sammenlignet med menneskets cirka 3.2 Gb og cirka 25 000 gener (HUGO 2004).

Alle verdens hunderaser, flere enn 400 ulike raser (Lindblad-Toh, Wade m. fl. 2005), har et genom som er fordelt på 78 kromosomer og mitokondrie-DNA (mtDNA). Av de 78 kromosomene er 38 par akrosentriske autosomer og 1 par metasentriske kjønnskromosomer (Eliasson, Gustavsson m. fl. 1967). Hundens største kromosom (nr. 1) har en størrelse på 137 Mb, omtrent på samme størrelse som menneskets kromosomer 9 til 12. Alle hundens kromosomer, bortsett fra de fire største, er mindre enn menneskets kromosom 19 (Langford, Fischer m. fl. 1996).



**Figur 1** Hundens karyotype ([www.canine-gene-project.de](http://www.canine-gene-project.de))

De ulike hunderasene er oppstått gjennom målrettet avl, og innen hver rase er det stor grad av innavl. Siden noen sykdommer forekommer oftere i noen raser sammenlignet med andre, tyder det på at arbeidet med å lokalisere genetiske sykdommer i disse rasene vil være enklere

enn hos mennesker med samme sykdom, da variasjonen av gener totalt sett er mindre i de enkelte hunderasene sammenlignet med menneskenes variasjon av gener (Chase, Carrier m. fl. 2002; Cruz, Vila m. fl. 2008).

### **1.1.1 Domestisering av hunden**

Hunden (*Canis lupus familiaris*) var det første dyret på jorden som ble domestisert. Dette skjedde for over 15 000 år siden, på den tiden menneskene var nomadiske jegere og samlere (Price og Gebauer 1995; Vila, Savolainen m. fl. 1997). Hunden ble domestisert flere tusen år før noe annet dyr eller plante, og de få etterlevningene som er funnet stammer fra Nord-Amerika, Europa og den nære Østen. Hunden har så spredt seg raskt utover nye områder etter den innledende domestiseringen. Det finnes svært fragmenterte arkeologiske bevis, så den nøyaktige lokaliseringen av området hvor de første hundene ble domestisert, hvordan forholdene var der og årsakene til domestiseringen er ikke kjent (Ostrander, Giger m. fl. 2005).

Dagens tamme hunder har en svært forskjellig morfologi, en morfologi som overgår kranie- og skjelettproporsjonene i forhold til ville hundedyr (Wayne 1986). Tamme hunder har også en rik blanding av ulik adferd sammenlignet med sine ville forfedre (Coppinger og Coppinger 2001). Til tross for denne store forskjellen i ulike fenotyper blant tamme hunder så har den domestiserte hunden utviklet seg fra sin stamfar, gråulven (*Canis lupus*) (Seal, Phillips m. fl. 1970; Vila, Savolainen m. fl. 1997). I forskningssammenheng er dette gunstig, da tamhunden er en av de få domestiserte artene som har sin stamfar fritt levende i naturen (Ostrander, Giger m. fl. 2005).

Gråulven er spredt over store deler av Eurasia og Nord-Amerika. Det er vanskelig å karakterisere ville populasjoner da det finnes få underpopulasjoner. Dette skyldes gråulvens store mobilitet og dermed spredte utveksling av genetisk materiale. Konsekvensen er da at det er vanskelig å lokalisere hvor domestiseringen opprinnelig fant sted. Tamhunden og gråulven har svært likt genom. (Seal, Phillips m. fl. 1970; Vila, Savolainen m. fl. 1997). Hvilke gener som har endret seg gjennom domestiseringsprosessen vil gi kunnskap om hvordan domestiseringsprosessen har foregått.

Variasjonen i mtDNA i ville populasjoner av gråulver har blitt kartlagt (Vila, Amorim m. fl. 1999). Selv om ulvene har et stort genetisk mangfold, er de ikke blitt delt inn i mange spesifikke populasjoner. Kun en grovinndeling i Nord-Amerika, India, Himalaya og Eurasia har vært mulig. Ulver i India og Himalaya har avvikende haplotyper av mtDNA som ikke er

funnet hos tamhunden (Sharma, Maldonado m. fl. 2004) Av den grunn må sammenligningen av haplotyper funnet på den moderne tamhunden sammenlignes med store områder som Eurasia og Nord-Amerika (Vila, Savolainen m. fl. 1997). Dette gir likevel lite nøyaktighet når det gjelder å finne lokalisering for domestiseringen (Ostrander, Giger m. fl. 2005).

Nytt genetisk verktøy er tilgjengelig for å kunne gi svar på opprinnelse, lokalisering og tidspunkt for domestiseringen. Tidligere forskning har brukt mtDNA hos moderne tamhunder for å rekonstruere domestiseringshistorien (Okumura, Ishiguro m. fl. 1996), mens det i senere tid er blitt brukt mtDNA fra arkeologiske utgravninger (Leonard, Wayne m. fl. 2002). mtDNA har vist seg å være et nyttig verktøy i studiene av domestiseringen av gråulven, men svakheter finnes. Blant annet morsarv kan gi et fordreid syn på evolusjonens historie. Likevel kan disse begrensingene bli overvunnet ved å se på markører på Y-kromosomet (Olivier og Lust 1998). Samtidig kan man også se på autosomale kromosomers mikrosatellitter (Parker, Kim m. fl. 2004) eller X-kromosomets mikrosatellitter (Vila, Sundqvist m. fl. 2003). I tillegg til de mange DNA-baserte metodene finnes også metoder som ser på ekspresjonen av mRNA-mønster for å studere opprinnelsen og variasjonen hos tamhunder (Saetre, Lindberg m. fl. 2004). Fenotypiske analyser basert på morfologi og adferd kan også lede til nyttig innsikt når det blir kombinert med genetiske metoder (Chase, Carrier m. fl. 2002).

### **1.1.2 Domestiseringens arv**

Domestiserte hunder har hatt nær kontakt med det menneskelige samfunnet i kraft av sin funksjon som arbeids-, jakt-, gjeter- og selskaphunder. Hundens domestiseringsprosess kan deles inn to faser (Wayne og Ostrander 2007). Den første fasen startet som tidligere nevnt for over 15 000 år siden da mennesket begynte å temme gråulven flere steder rundt om i verden (Price og Gebauer 1995; Vila, Savolainen m. fl. 1997). Den andre fasen innebefatter selektiv avl, som i stor grad har foregått de siste århundrene og som har resultert i mer enn 400 anerkjente raser (Clutton-Brock og Clutton-Brock 1999).

I tillegg til at det er stor variasjon mellom hunderasene når det gjelder utseende, størrelse og adferd, varierer også forekomsten av sykdommer (Wayne 1986). Seleksjonsprosessene som har foregått har ført til minkende grad av variasjon av gener innen raser, og dermed økt sannsynligheten for konservering av sykdomsfremkallende genkombinasjoner (Comeron, Williford m. fl. 2008). En konsekvens av den regulerte fremavlingen av hunderaser sammen med periodiske flaskehalser, for eksempel under verdenskrigene hvor antallet hunder minket og dermed også genpoolen, har ført til at mange av dagens moderne hunderaser viser stort

innslag av spesifikke sykdommer som kreft, hjertelidelser, blindhet, epilepsi, hoftedysplasi og døvhet (Lindblad-Toh, Wade m. fl. 2005).

En sammenligning av ikke-synonyme mutasjoner, det vil si mutasjoner som gir endring i proteinproduksjon, i mtDNA viser at forekomsten er høyere i den domestiserte tamhunden enn i gråulven, om enn ikke signifikant ( $P > 0.05$ ). Men siden mtDNA ikke er rekombinant, arves kun fra mor og dermed er et lokus må videre studier gjennomføres for å få bedre data (Bjornerfeldt, Webster m. fl. 2006).

I en studie av Cruz m. fl. (Cruz, Vila m. fl. 2008) sammenlignet de sekvenser fra hundegenomet (Lindblad-Toh, Wade m. fl. 2005), med gråulv-sekvenser hentet fra 4 individer fra Alaska, Kina, India og Spania. De sammenlignet variasjonen i gener ved hjelp av single nucleotide polymorphisms (SNP) og fant at forholdet mellom ikke-synonyme og synonyme mutasjoner var 50 % høyere i hunden sammenlignet med gråulven. Studien foreslo at flertallet av disse allelene til en viss grad er helsemessige uheldige for hunden og at domestiseringen er årsaken til dette på grunn av liten variasjon i genpoolen hos individene som bringer rasene videre. Kvaliteten på det sekvenserte gråulvgenomet var lavere enn på hundegenomet og dette tilsier at resultatene må behandles med forsiktighet og videre studier må gjøres (Cruz, Vila m. fl. 2008).

## **1.2 Gener og sykdom**

Den senere tids store framganger i forhold til hund og genetisk kunnskap har ført til endringer innen veterinærbiologien og veterinærmedisinen. Tiden hvor man kun brukte tradisjonelle diagnose- og terapimetoder basert på kliniske undersøkelser er over. Det detaljerte hundegenom-kartet (Lindblad-Toh, Wade m. fl. 2005) gir oss muligheter til å sjekke allerede konstaterte sykdomsgen hos mennesket på hund. Vi vet sekvensen hos mennesket og den er ofte i stor grad sammenfallende med hundens. Hundegenom-kartet gir oss også muligheten til å gjøre studier på hund for ikke-identifiserte sykdomsgen. Samtidig gir utviklingen av det genetiske verktøyet oss muligheten til raske søk på genomet hos ønskede hunderaser for å avdekke sykdomsloki. Dette vil føre til at vi får begrenset framveksten av helsemessige uønskede gen, noe som vil gjøre hverdagen sammen med hundene bedre og kostnadene ved å ha hund mindre (Parker, Meurs m. fl. 2006).

Hunden har mange sykdommer som er linket opp mot spesifikke gener. Det er et voksende marked innen veterinærmedisin hvor stadig nye tester er tilgjengelig. Firmaer som Laboklin ([www.laboklin.com](http://www.laboklin.com)) har utviklet over 25 tester som tar for seg arvelige sykdommer hos hunden. Siden hunden deler en rekke arvelige sykdommer med oss mennesker og er fysiologisk mer lik oss enn noe annet modelldyr (Tsai, Clark m. fl. 2007) er utviklingen av genetiske tester interessant både for hunder og mennesker.

I denne mastergradsoppgaven er kreft og hjertelidelser valgt som hovedfokus når det gjelder gener og sykdom hos hund. Kreft med vekt på telomeraseaktivitet og hjertelidelser med vekt på dilatert kardiomyopati (DCM), misdanning av høyre hjerteklaff (CTVM), arytmodig høyre ventrikkel dysplasi/kardiomyopati (ARVD/C) og atrieflimmer (AF).

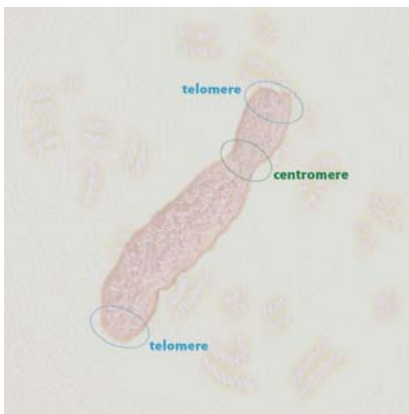


## 1.2.1 Kreft

Innen genforskning og kreft har denne mastergradsoppgaven hatt fokus på enzymet telomerase og det genetiske arbeidet som er utført i tilknytning til dette enzymet.

### 1.2.1.1 Kreft og telomeraseaktivitet

Telomerer er ikke-kodende DNA-proteinkomplekser som finnes på enden av lineære kromosomer (figur 2) (Hayflick og Moorhead 1961; Blackburn 1991). Telomerenes oppgave er å opprettholde kromosomenes integritet og stabilitet. Uten telomerene ville de lineære



**Figur 2** Telomerene på et kromosom (<http://www.genome.gov/>)

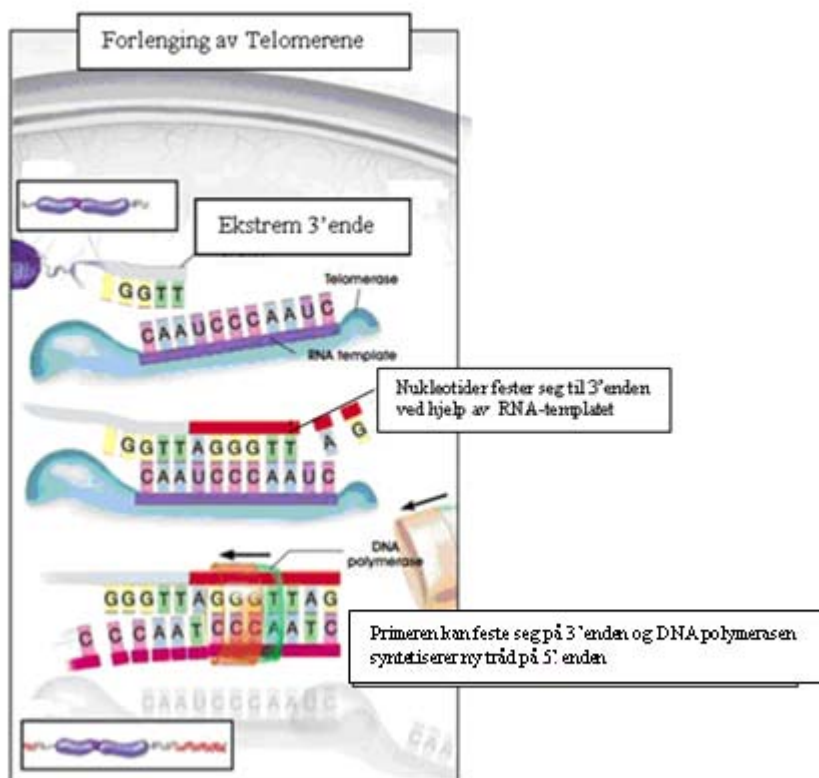
kromosomene slå seg sammen eller bli sett på som brudd på det dobbeltrådede DNA-et. Telomerer som mister sin normale funksjon kan derfor føre til genomisk ustabilitet, et kjennetegn ved kreft (Blackburn 1991; Rodier, Kim m. fl. 2005). I ryggradsdyr består telomerisk DNA av flere repeterte kopier av nukleotidene TTAGGG (Blackburn 1991). Antallet varierer mellom artene, hunden har cirka 3 000 til 23 000

basepar (bp) lange sekvenser (Nasir, Devlin m. fl. 2001; Yazawa, Okuda m. fl. 2001; Cadile, Kitchell m. fl. 2007) og mennesket har cirka 10 000 til 15 000 bp lange sekvenser (Blasco 2005).

Etter hvert som cellene deler seg så kortes telomerene gradvis ned med cirka 50 til 100 bp pr gang (Harley, Futcher m. fl. 1990). Dette kommer av DNA-polymerasens manglende mulighet til å kopiere ekstreme ender på kromosomene (Watson 1972). Telomerisk forkortning er derfor sett på som en krefthemmende prosess da videre forkortning av telomerene fører til at cellen mister evnen til celledeling og dermed dør (Campisi 1997).

Et kjennetegn ved kreftceller er deres reaktivering av enzymet telomerase slik at de ved hjelp av dette enzymet klarer å opprettholde telomerlengden og dermed unngår celledød. Kreftceller har høy telomeraseaktivitet (Kim, Piatyszek m. fl. 1994; Shay og Bacchetti 1997). Telomeraseaktivitet er til stede under embryogenesen hos mennesker, men er ellers fraværende etter fødsel i de fleste somatiske celler, utenom sædceller, aktiverte lymfocytter og stamceller som har telomeraseaktivitet, om enn på et redusert nivå (Broccoli, Young m. fl. 1995; Counter, Gupta m. fl. 1995; Hiyama, Hirai m. fl. 1995; Wright, Piatyszek m. fl. 1996).

Telomerase, som er et ribonukleoprotein-kompleks, består av en RNA-enhet (TR) som er en komplementær nukleotidrekke til den repeterte sekvensen TTAGGG på enden av telomerene, samt den katalytisk proteinkomponenten Telomerase reverse transkriptase (TERT) og assosierte proteiner (Feng, Funk m. fl. 1995; Meyerson, Counter m. fl. 1997; Nakamura, Morin m. fl. 1997). TERT katalyserer nye repeterte sekvenser på endene av kromosomene ved hjelp av TR som templat (figur 3). Selv om både TR og TERT er essensielle for telomeraseaktiviteten, så er TERT sett på som den primære determinanten for enzymet telomerase, siden TERT-ekspresjon i stor grad kun er begrenset til celler med telomeraseaktivitet (Ducrest, Amacker m. fl. 2001). Dette i kontrast til TR som er uttrykt i alle vevstyper, uavhengig av telomeraseaktivitet (Avilion, Piatyszek m. fl. 1996). TERT er derfor foreslått som markør for en rekke krefttyper (Hiyama og Hiyama 2003).



**Figur 3** Forlenging av telomerene ved hjelp av telomerase (<http://stemcells.nih.gov/>)

I den senere tid har telomerase fremstått som et ideelt mål i kreftbehandling av mennesker. Dette har blant annet ført til forskning på hund som har samme opprettholdes av telomerene ved hjelp av telomerase som mennesket (Nasir, Devlin m. fl. 2001; Nasir 2008). Hunder med kreft representerer en nyttig modell for studier av menneskelig kreft, siden mange av de

naturlig forekommende krefttilfellene hos hund har stor likhet med menneskets, med hensyn til histopatologi, biologisk adferd og respons til behandling (Long, Argyle m. fl. 2005).

Humane kreftsvulster kan også opprettholde telomerlengden ved hjelp av alternativ forlenging av telomere (ALT). Prosessen rundt ALT er ikke fullstendig kartlagt (Reddel, Bryan m. fl. 2001; Cesare og Reddel 2008). Analyser av ALT i kreftceller hos hund kan være klinisk relevant for en hundepasient, siden det humant har vist en korrelasjon med forlenget overlevelse hos pasienter (Hakin-Smith, Jellinek m. fl. 2003; Henson, Hannay m. fl. 2005).

### **1.2.1.2 Telomerlengder og telomeraseaktivitet i hund**

Nasir m. fl. (Nasir, Devlin m. fl. 2001) foreslo hunden som en alternativ modell for studier av telomerase og telomeraseaktivitet, da klassiske studier på mus hadde vist begrenset overføringsverdi til mennesker på grunn av biologiske forskjeller.

I en studie ble telomerlengder (terminal restriction fragments - TRF) målt i hvite blodceller, et spekter av normalt hundevev og i en gruppe naturlig forekommende bløtvevssvulster (Nasir, Devlin m. fl. 2001). TRF i de hvite blodcellene og hundevevet lå innenfor en ramme på 12 000 til 23 000 bp. I de naturlig forekommende svulstene i bløtvevet, delte TRF-ene seg i to undergrupper, en med snittlengde på 22 200 bp og en med snittlengde 18 200 bp. Disse resultatene i hundens TRF-biologi ligner menneskets og studiet ble starten på arbeidet med en alternativ modell for å studere telomerbiologi og telomerase-måttet antikreftterapi med hunden som modelldyr (Nasir, Devlin m. fl. 2001; Nasir 2008).

Nasir m. fl. (Nasir, Devlin m. fl. 2001) studerte også telomeraseaktiviteten i et vidt spekter av vev, for å få et bilde av distribusjonen av enzymaktiviteten hos hund. Telomeraseaktivitet ble funnet i kreftceller, men ikke i normale celler, med unntak av testiklene. I tillegg ble lave nivåer av telomeraseaktivitet målt i magesekkvev.

Yazawa m. fl. (Yazawa, Okuda m. fl. 2001) gjennomførte en studie hvor de så på telomerlengder, på alderens mulige innvirkning, og telomeraseaktiviteten i svulster hos tisper med brystkreft. Deres resultater viste at telomerlengden lå mellom 11 000 bp til 21 600 bp og de registrerte telomeraseaktivitet i 26 av de 27 hundene de sjekket. Deres konklusjon var at telomerlengden blir opprettholdt i brystkreftsvulster uavhengig av alderen til den kreftsyke hunden (Yazawa, Okuda m. fl. 2001).

### 1.2.1.3 Hundens telomerase-reverse-transkriptasegen (*TERT*)

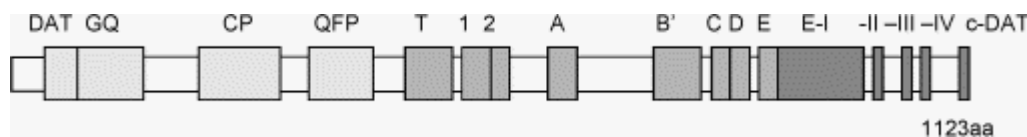
*TERT* koder for den katalytiske proteinkomponenten i telomerase. I en studie av Nasir m. fl. (Nasir, Gault m. fl. 2004) ble *TERT* fra hund karakterisert og *TERT* inneholdt deler som kjennetegner andre pattedyrs *TERT*. *TERT* er karakterisert for en rekke eukaryoter, blant annet mennesket (Meyerson, Counter m. fl. 1997; Nakamura, Morin m. fl. 1997) og mus (Greenberg, Allsopp m. fl. 1998). Aminosyrelikheten i N-terminalen på hundens *TERT*-protein viste i studien til Nasir m. fl. (Nasir, Gault m. fl. 2004) den høyeste prosentvise likheten til humant *TERT* sammenlignet med andre dyr. Dette styrker hunden som modelldyr for mennesket i telomerasebaserte studier.

Proteinene som blir bestemt av *TERT* består av tre regioner. Amino-regionen (N-terminalen), som inneholder minst fire domener som er velbevart gjennom evolusjonen og et telomerase-spesifikt T-mønster. I mange eukaryoter er N-terminalen essensiell for telomeraseaktiviteten. Den sentrale regionen består av syv evolusjonært velbevarte reverse transkriptasemønster (RT) som definerer det katalytiske kjerneområdet (Friedman og Cech 1999; Beattie, Zhou m. fl. 2000; Xia, Peng m. fl. 2000; Armbruster, Banik m. fl. 2001; Bachand og Autexier 2001; Beattie, Zhou m. fl. 2001; Lai, Mitchell m. fl. 2001; Banik, Guo m. fl. 2002). Karboksylregionen (C-terminalen) er evolusjonsmessig ikke spesielt konserverv, men innen det menneskelige proteinet er flere områder definert som sentrale for telomerasefunksjonen og telomeraseaktiviteten (Banik, Guo m. fl. 2002).

*TERT* spiller en sentral rolle i telomeraseaktiviteten og mekanismene som regulerer *TERT* er intenst forsket på i ulike studier (Ku, Cheng m. fl. 1997; Ulaner og Giudice 1997; Takakura, Kyo m. fl. 2001).

Som nevnt gjennomførte Nasir m. fl. (Nasir, Gault m. fl. 2004) en studie hvor de ønsket å se nærmere på hundens *TERT*. De isolerte og sekvenserte hundens telomerasegen, dog *TERT*, samt kartla ekspresjonen av hundens *TERT* i telomerasepositive og telomerasenegative cellelinjer for å forstå reguleringen av telomeraseaktivitet i neoplastiske og normale prosesser i hunden. Ved isolering og sekvensering brukte de cellelinjer fra en hundenyre som var telomerasepositiv og ved kartlegging av ekspresjon rensset de mRNA fra ulike cellekulturer hentet fra hund, cellekulturer som var både telomerasepositive og telomerasenegative. De samme cellelinjene var blitt brukt i studien til Nasir m. fl. (Nasir, Devlin m. fl. 2001).

Sekvensanalyser viste at hundens *TERT* cDNA bestod av en leseramme på 3372 bp, som kodet for et protein på 1 123 aminosyrer (aa), beregnet molekylmasse er 124 kDa og et isoelektrisk punkt på pH=10.4. Disse verdiene var sammenfallende med tidligere kartlagte *TERT*-sekvenser fra andre dyr (Nasir, Gault m. fl. 2004).



**Figur 4** Skjematisk presentasjon av dog*TERT* cDNA (Nasir, Gault m. fl. 2004).

Sammenligningsanalyser i forhold til andre organsimer viste at hundens *TERT* inneholdt det tidligere påviste T-mønsteret innenfor et området sentralt på proteinet, etterfulgt av RT-mønstrene 1, 2, A, B', C, D og E og derfor gav Nasir m. fl. (Nasir, Gault m. fl. 2004) sekvensen navnet dog*TERT* (figur 4).

Flere telomerasespesifikke egenskaper ved RT-mønstrene er blitt identifisert i ulike organismer noe som gjør at disse skiller seg fra andre revers transkriptaser (Lingner, Cech m. fl. 1997; Weinrich, Pruzan m. fl. 1997; Nakamura, Morin m. fl. 1997; Bryan, Sperger m. fl. 1998). Disse inkluderer et konserverert Arg-område i mønster 1, et aromatisk område som etterfølger mønster C og Trp-x-Gy-x-Ser/Leu i mønster E. Alle disse områdene er konserverert i dog*TERT* noe som støtter dog*TERT* som medlem av RT-familien (Nasir, Gault m. fl. 2004).

I tillegg til RT-mønstrene er flere områder som er essensielle for *TERT*-funksjon blitt identifisert innen *TERT*-proteiner. N-terminalen til *TERT*-proteiner inneholder tre funksjonelle områder, kalt mønstrene GQ, CP og QFP (figur 4). Spesielt flere konservative områder innen GQ er essensielle for telomerasefunksjonen (Xia, Peng m. fl. 2000). GQ, CP og QFP overlapper med regionene v-I, v-II, v-III og v-IV som er påvist i gjærceller, humant, mus, hamster og frosk (Friedman og Cech 1999; Beattie, Zhou m. fl. 2000; Bachand og Autexier 2001; Kuramoto, Ohsumi m. fl. 2001). Det er funnet ut ved mutasjonsstudier (Xia, Peng m. fl. 2000) at disse områdene er konserverert innen pattedyrfamilien. Som tabell 1 (neste side) viser så er den prosentvise likheten mellom dog*TERT* og h*TERT* den største (Nasir, Gault m. fl. 2004). En region kalt DAT området (DAT- telomerasens dissosierte aktiviteter) er identifisert til h*TERT* (Armbruster, Banik m. fl. 2001). De nevnte områdene er også identifisert i hundens *TERT*-protein (figur 4) (Nasir, Gault m. fl. 2004).

**Tabell 1** Prosentvis likhet mellom aminosyrerekkefølgen i N-terminalen til dogTERT-proteinet sammenlignet med andre ryggradsdyrs TERT-protein. Organismene er menneske (hTERT), mus (mTERT), hamster (hamTERT) og frosk (xTERT). Regionene v-I, v-II, v-III og v-IV overlapper med GQ, CP, og QFP (Kuramoto, Ohsumi m. fl. 2001; Nasir, Gault m. fl. 2004)

	<b>hTERT (%)</b>	<b>mTERT(%)</b>	<b>hamTERT(%)</b>	<b>xTERT(%)</b>
Region v-I	91.0	78.0	78.0	52.0
Region v-II	80.0	75.6	77.5	53.8
Region v-III	83.8	69.4	75.7	67.8
Region v-IV	85.9	74.9	78.8	53.8

C-terminalen til TERT-proteiner er i mindre grad kartlagt enn N-terminalområdet. Likevel er mange områder i C-terminalen konservert mellom pattedyr (Banik, Guo m. fl. 2002; Nasir, Gault m. fl. 2004).

Ekspresjonen av dogTERT korrelerte med telomeraseaktiviteten og dette støtter teorien om at TERT er den primære komponenten for determinering av telomeraseaktivitet i hundeceller, noe som er sammenfallende med mennesket (Ducrest, Amacker m. fl. 2001; Nasir, Gault m. fl. 2004).

Long m. fl. (Long, Argyle m. fl. 2005) har gjennomført en studie hvor de kikket på promotorregionen til dogTERT. Isolering og sekvensering av dogTERT-promotoren ble foretatt, likhet med hTERT-promotoren ble sjekket og dens aktivitet i telomerasepositive celler ble kartlagt. Delesjonskonstruksjoner ble syntetisert og sjekket for hvordan ulike konstruksjoner påvirket dogTERT-ekspresjonen. Dette gav detaljerte studier av hundens TERT-regulering. I studien brukte de cellelinjer hos hund som alle var påvist telomerasepositive i studien til Nasir m. fl. (Nasir, Devlin m. fl. 2001).

Screening av hundens genomiske DNA-bibliotek med en dogTERT-probe gav en positiv klon. Sekvensanalyser viste at rundt 8 kb oppstrøms for dogTERTs startkodon var med i den positive klonen. Et fragment på 5390 bp oppstrøms, sammen med ekson 1 (218 bp), intron 1 (106 bp) og noe av ekson 2 (15 bp) ble undersøkt i studien (Long, Argyle m. fl. 2005).

Sekvenseringsanalysene viste at dogTERT-promotoren deler liknende strukturer som hTERT-promotoren. 5' regulerende regionen til dogTERT er GC-rikt, mangler TATA og CAAT-bokser og inneholder flere bindingssteder for transkripsjonsfaktorer, slik som hTERT (Long, Argyle m. fl. 2005).

Analysen viste at kjerneaktivitetsområde til promotoren lå innen 314 bp oppstrøms for startkodonet (Long, Argyle m. fl. 2005). Dette resultatet er sammenfallende med *hTERT* som har sitt promotorområde cirka 300 bp ovenfor starten på transkripsjonsområdet til genet (Horikawa, Cable m. fl. 1999; Takakura, Kyo m. fl. 1999; Wick, Zubov m. fl. 1999).

Innenfor promotoren ble det i studien til Long m. fl. (Long, Argyle m. fl. 2005) også funnet flere transkripsjonsfaktor-bindingsteder (figur 5, side 26), deriblant flere Sp1-bindingsteder. Sp1-mutasjoner er tidligere satt i sammenheng med redusert human telomeraseaktivitet, men siden Sp1 er uttrykt i et bredt spekter av celler er den ikke satt i direkte sammenheng med kreft (Kyo, Takakura m. fl. 2000).

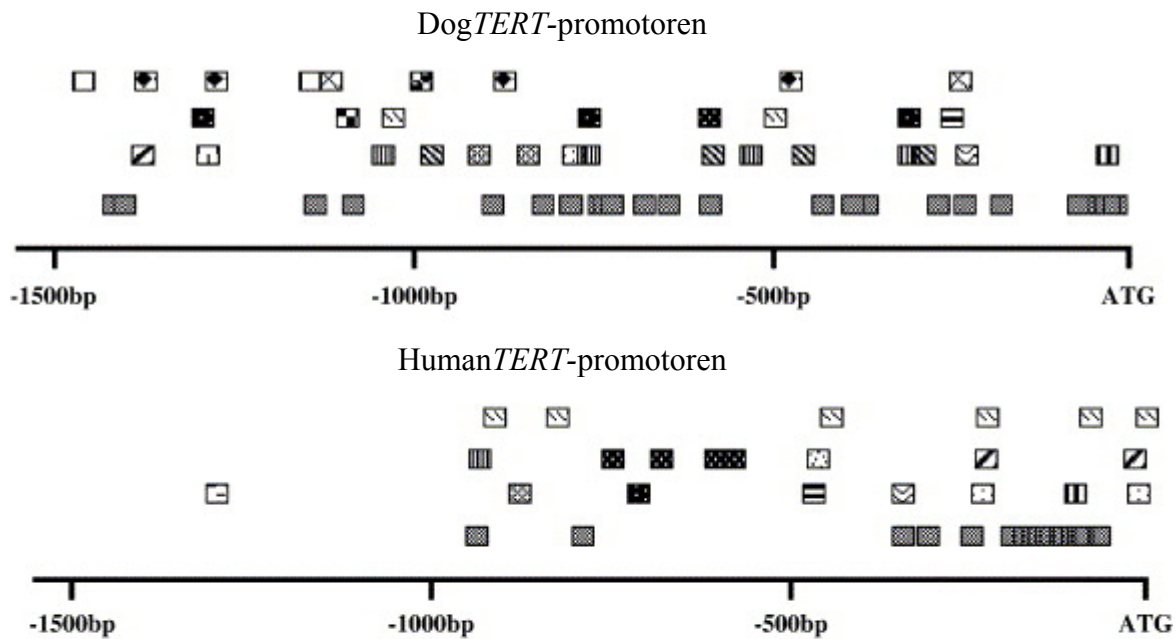
Funn ble gjort som indikerte at repressorelementer lå innenfor 314 til 1556 bp oppstrøms. Likevel ble få potensielle seter for kjente *hTERT* repressorelementer identifisert. Et enkelt sete for østrogen reseptoren Myeloid Zinc Finger 2 protein (MZF-2) ble funnet 605 bp oppstrøms i hundens promotor (figur 5, side 26) (Long, Argyle m. fl. 2005). MZF-2 bindingsteder er rapportert i *hTERT*, fire innen 200 bp oppstrøms av promotoren, og delesjonskonstruksjoner med deres 5'promotor lokalisert innen denne regionen, 600 til 800 bp oppstrøms, viser lavere uttrykkelse av *hTERT*, noe som indikerer at MZF-2 påvirker nedreguleringen (Horikawa, Cable m. fl. 1999; Takakura, Kyo m. fl. 1999).

Long m. fl. (Long, Argyle m. fl. 2005) fant samme mønsteret hos hund, delesjonskonstruksjoner med MTZ-2 (890 og 650 bp oppstrøms) viste lavere uttrykk enn konstruksjoner med sekvensen 314 bp oppstrøms. MTZ-2 spiller en rolle i nedregulering av *dogTERT* (Long, Argyle m. fl. 2005).

Flere seter som er kjent som repressorbindingsteder for *hTERT* ble også identifisert (figur 5 side 26). Dette inkluderte Wilms Tumor 1 supressor genprodukt (WT1), som ble lokalisert i kjerneområdet på hundens promotor (-254). I den humane promotoren er et WT1-setet i posisjonen -358 (Poole, Andrews m. fl. 2001). Hundens *TERT*-promotor inneholdt også E-boksbindingsteder 1397 bp oppstrøms (Long, Argyle m. fl. 2005). Mad1/Max heterodimerer har vist seg å være negative regulatorer av *hTERT* transkripsjon, ved å binde seg til E-bokssekvenser (Xu, Popov m. fl. 2001). Men c-Myc-Max heterodimere kan også binde seg til E-boks-sekvenser for å aktivere humant *TERT* (Kyo, Takakura m. fl. 2000). Mens humant *TERT*-promotoren inneholder to E-bokssekvenser, så ble kun en identifisert innen *dogTERT*-promotoren, 1397 bp oppstrøms (Long, Argyle m. fl. 2005).



I tillegg fant Long m. fl. (Long, Argyle m. fl. 2005) flere sannsynlige bindeseter for de ulike elementene (ER/Sp1, c-ets-2, MAZ, NFI, MyoD, AP1, c-Myb og PR) (figur 5, side 26). Betydningen av disse bindingssetene er for tiden ukjent, likevel er deres tilstedeværelse både i hunden og mennesket et tegn på at de har en rolle i aktiveringen eller dempingen av telomeraseuttrykket i normale celler, så vel som i kreftceller. De håpet å finne andre bindingsseter (AP2, AP4, CCAC, NF-E, NFkB, NMYC eller p53). Disse ble ikke funnet, det betyr nødvendigvis ikke at de ikke er der, de kan finnes oppstrøms for 1559 bp delen av promotoren som denne studien tok for seg (Long, Argyle m. fl. 2005).



### Transkripsjonsfaktor-bindeseter

Transkripsjonsfaktor-bindeseter i både *hTERT*- og *dogTERT*-promotoren

- Sp1
- c-Ets-2
- c-Myc
- c-Myb
- GR/PR
- MAZ
- AP1
- MZF-2
- ER/Sp1
- MyoD
- NF1
- WT1

Transkripsjonsfaktor-bindeseter funnet kun i *hTERT*-promotoren

- PR
- p53

Transkripsjonsfaktor-bindeseter funnet kun i *dogTERT*-promotoren

- GR
- c-Ets-1
- c-jun
- Myc-CF1
- SRY
- MTF-1

**Figur 5** Sammenligning av transkripsjonsfaktor-bindeseter innen 5' promotorregionen til hunden og mennesket (Long, Argyle m. fl. 2005)

Seks ulike delesjonskonstruksjoner ble laget og uttrykt i telomerasepositive celler. Utgangspunktet for konstruksjonene var et subfragment med navnet CTERTPROM1 som inneholdt områdene som ligger innenfor 1556 bp oppstrøms av promotoren, samt ekson 1, intron 1 og 15 bp av ekson 2. Disse delesjonskonstruksjonene ble tilført cellene gjennom transient transfeksjon (Long, Argyle m. fl. 2005).

Transkripsjonsaktiviteten til *dogTERT*-promotorene sank i de delesjonkonstruksjonene hvor man inkluderte ekson 1, intron 1 og deler av ekson 2. Redusert aktivitet lå mellom 50 til 75 % alt etter sammensetning (Long, Argyle m. fl. 2005). Dette er vist tidligere i en studie av *hTERT*-promotoren, hvor transkripsjonsaktiviteten ble redusert med 20 til 100 ganger avhengig av hvor stor del av ekson 2 som ble inkludert i konstruksjonene (Renaud, Bosman m. fl. 2003). I studien til Long m. fl. (Long, Argyle m. fl. 2005) ble bare en liten del av ekson 2 inkludert og videre studier må til for å avgjøre ekson 2 sin rolle i promotoraktiviteten til *dogTERT*.

Kjernepromotoren (*CTERTPROM7*) med kun 314 bp av promotorregionen ble uttrykt i celler som var telomerasepositive, nivået varierte mellom cellene (Long, Argyle m. fl. 2005).

Transkripsjonsaktiviteten til delesjonskonstruksjonene ble også sjekket i telomerasenegative normale bindevevscellelinjer, med minimal kartlagt aktivitet som resultat (Long, Argyle m. fl. 2005).

Når det gjelder definering og karakterisering av *dogTERT*-promotoren er vi nå i følge Long m. fl. (Long, Argyle m. fl. 2005) i posisjon til å evaluere promotorens innvirkning på genets uttrykking i telomerasepositive celler.

I en studie av Renwick (Renwick 2006) ble hunder med lymfeknutekreft og hunder med ikke-neoplastisk sykdom og klinisk normale hunder sjekket med hensyn til telomeraseaktivitet i lymfeknutene. Telomeraseaktivitet ble funnet i 97 % av lymfeknutene hos hund med denne typen kreft. Telomeraseaktiviteten i lymfeknutene hos hund uten kreft viste lave verdier (6,8 %).

Høye verdier av *dogTERT* ble også observert ved hjelp av immunfarging hos tilfellene med lymfeknutekreft sammenlignet med de friske hundene, som hadde lave verdier. Disse resultatene står i kontrast til tidligere funn som viser likhet ved immunfarging (Carioto, Kruth m. fl. 2001; Hipple 2003). Studien til Renwick (Renwick 2006) hadde et lavt antall individer som var normale (4 stk), imidlertid hadde de flest med lymfeknutekreft (30 stk), sammenlignet med de tidligere nevnte studiene.

Ved sammenligning av telomeraseaktivitet og *dogTERT* mRNA, viste studiet at det var fravær, eller ikke målbare verdier, av *dogTERT* når det var telomeraseaktivitet (Renwick 2006). Dette støtter tidligere studier som har foreslått at telomeraseaktiviteten ikke er bestemt av *dogTERT* alene, med at andre posttranskripsjons- og

posttranslasjonsmodifikasjoner er nødvendig (Aisner, Wright m. fl. 2002; Kyo og Inoue 2002).

#### **1.2.1.4 Effekt av telomerasehemmere i kreftceller**

Telomestatin er et naturlig produkt som er isolert fra bakterien *Streptomyces anulatus* 3533-SV4 som har vist seg å være en potent hemmer av telomerase i humane cellelinjer. Telomestatin påvirker telomerasens evne til å binde seg til telomeriske ender, med redusert telomeraseaktivitet og ingen forlenging av telomerene som konsekvens. Dette fører til raskere celledød hos kreftceller (Kim, Vankayalapati m. fl. 2002; Gomez, Paterski m. fl. 2004). Long og Argyle (Long og Argyle 2007) har gjort en studie på effektendringen på telomeraseaktiviteten og endrede lengder på TRF hos hund som følge av telomestatinbehandling.

I studien av Long og Argyle (Long og Argyle 2007) brukte man to typer kreftceller (brystkreft og benkreft) med kjent telomeraseaktivitet, samt cellelinjer uten telomeraseaktivitet (Nasir, Devlin m. fl. 2001) for å studere effekten av telomestatin. I kreftcellene fant man at telomeraseaktiviteten i brystkreftcellene og benkreftcellene ble hemmet med henholdsvis 67 % og 80 %. Telomestatin hadde ingen effekt på veksten i de normale cellelinjene (Long og Argyle 2007).

Telomestatinbehandlingen av brystkreftcelletypen førte til en reduksjon av TRF som lå rundt 30-40 %. Disse endringene ble registrert etter 7 dager, ved sjekk etter 20 dager var det ingen signifikante endringer. Disse resultatene står i kontrast til forskning på menneskeceller, som foreslår en mye større forkorting på lengden til telomerene (Tauchi, Shin-Ya m. fl. 2003).

Behandling med telomestatin reduserte veksthastigheten i cellelinjene. Reduksjonen i veksthastighet, redusert telomeraseaktivitet, telomerforkorting og celledød var mer fremtredende i benkreftcellene, dette mente Long og Argyle (Long og Argyle 2007) kunne komme av at disse cellene i utgangspunktet hadde lavere nivå av telomeraseaktivitet enn brystkreftcellene (Nasir, Devlin m. fl. 2001), og derfor er mer sensitive til telomestatinbehandling.

Det var ingen signifikant endring i TRF etter 7 til 20 dagers behandling av cellekulturene, noe som indikerer at celledød opptrådte uavhengig av TRF i begge cellelinjene, siden celledød var markant høyere etter 20 dager sammenlignet med etter 7 dager (Long og Argyle 2007).

### **1.2.1.5 RNA-interferens (RNAi)**

RNAi er en posttranskripsjonell-prosess som blir trigget av RNA-sekvensbinding som leder til at genprodukter ikke uttrykkes (Elbashir, Lendeckel m. fl. 2001; Elbashir, Martinez m. fl. 2001). I studier på mennesker har man funn som viser at RNAi brukt med telomerasens TR-enhet som mål, har ført til signifikant reduksjon i telomeraseaktiviteten (Kosciolek, Kalantidis m. fl. 2003; Li, Rosenberg m. fl. 2004).

Lund m. fl. (Lund, Paoloni m. fl. 2008) har gjennomført en studie i forhold til hundebloodkreft (canine haemangiosarcoma – HSA) hvor de utviklet korte hårrulls RNA (shRNA), som er lentivirale vektorer som har RNA-komponenten (TR) til telomerase som mål, med endonukleolytisk splitting og degenerering som konsekvens. Denne prosessen blokkerte gen-ekspressjon mer effektivt enn antisense og ribozymeteknologi (Plasterk og Ketting 2000; Elbashir, Lendeckel m. fl. 2001; Elbashir, Martinez m. fl. 2001; Sui, Soohoo m. fl. 2002; Lund, Paoloni m. fl. 2008).

Vektorene til Lund m. fl. (Lund, Paoloni m. fl. 2008) fikk betegnelsene Lenti 1, Lenti 5 og Lenti 8 og disse var komplementære til ulike områder på TR. I tillegg laget de en tilfeldig vektor som de kalte Lentiscramble (Lenti 2S). Ved hjelp av disse vektorene sjekket de effekten av telomerasehemming både in vitro, og in vivo i mus induisert HSA. shRNA lentivirus 1, 5 og 8 viste seg å hemme telomeraseaktiviteten med opp til 70 % sammenlignet med kontrollene. Lenti 2S viste ingen endring i telomeraseaktiviteten (Lund, Paoloni m. fl. 2008).

### **1.2.1.6 Telomerasestatus hos hunder med benkreft**

Benkreft (osteosarcoma-OSA) er den vanligste formen for skjelettkreft hos hund. Den står for 85 % av alle tilfeller av skjelettkreft som er rapportert. OSA hos hunder har histologiske og biologiske likhetstrekk med menneskelig OSA og hunder har lenge vært utnyttet som en terapeutisk modell for mennesker (Khanna, Lindblad-Toh m. fl. 2006).

Kow m. fl. (Kow, Bailey m. fl. 2006) undersøkte cellelinjer fra 5 hunder med OSA og 6 kliniske eksempler og fant at telomeraseaktivitet var til stede i flertallet av prøvene som ble testet, 100 % av cellelinjene og 83 % av de kliniske eksemplene. Disse resultatene viser

betydelige avvik fra menneskers telomeraseaktivitet som er anslått til å ligge mellom 32 til 44 % (Ulaner, Huang m. fl. 2003; Sanders, Drissi m. fl. 2004).

I en nyere studie med OSA-svulster har tilstedeværelse eller fravær av telomeraseaktivitet også blitt sjekket (Kow, Thamm m. fl. 2008). Sekstisyv hundepøver med OSA var med i studien. Denne studien viste liknende resultater som Kow m. fl. (Kow, Bailey m. fl. 2006). I studien var 73 % av hundepøvene telomerasepositive (Kow, Thamm m. fl. 2008).

Videre ble 10 av de telomerasenegative hundecellene med OSA analysert for variasjon i telomerlengden. Den gjennomsnittlige lengden var på 12.3 bp innenfor lengdene 5.9 til 20.8 bp (Kow, Thamm m. fl. 2008).

9 av de 10 kreftsvulstene viste signifikant heterogenitet i telomerlengde med en gjennomsnittlig differanse mellom korteste og lengste TRF på  $16.9 \pm 4.8$  bp (Kow, Thamm m. fl. 2008). Andre studier har vist at gjennomsnittlig TRF i normale celler er 3.6 kb (Cadile, Kitchell m. fl. 2007).

Cadile m. fl. (Cadile, Kitchell m. fl. 2007) antyder på ALT i telomerasenegative hundecellene, mens studier viser at TRF målt i prøver fra perifert blod hos normale hunder hadde en TRF mellom 10 til 15 kb (Moyzis, Buckingham m. fl. 1988) og mellom 12 og 23 kb (Nasir, Devlin m. fl. 2001). Det er mulig at TRF-variasjon ikke er en pålitelig metode for å avgjøre tilstedeværelse av ALT (Kow, Thamm m. fl. 2008).

## 1.2.2 Hjertelidelser

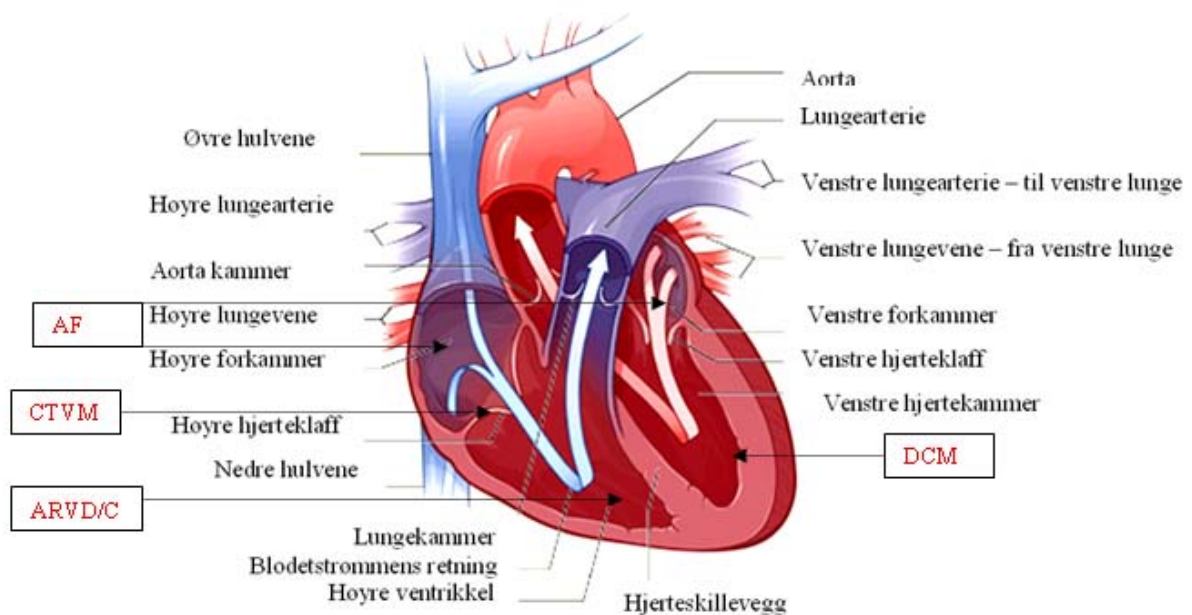
Innen veterinærmedisin har genetikken rundt hjertelidelser vært et viktig fagfelt siden tidlig på 1970-tallet (Parker, Meurs m. fl. 2006). Selv om omfanget av hjertelidelser på hund er ukjent, har to uavhengige studier fastslått at cirka 11 % av alle hundepasienter har hjertelidelser (Detweiler og Patterson 1965; Fox, Sisson m. fl. 1999).

Til tross for stor interesse for genetikken rundt dette emnet så har det vært store utfordringer knyttet til kartleggingen av forårsakende gener. I første rekke har kompleksiteten vært knyttet til at det mest sannsynlig er flere gen som er inne i bildet for de enkelte lidelsene. Ytterligere faktorer som gjør bildet mer sammensatt er at hjertelidelser uttrykkes sent i en hunds liv og at miljøfaktorer også spiller en viktig rolle (Parker, Meurs m. fl. 2006).

Mange omfattende studier er gjennomført. Noen studier har avdekket ulike områder på kromosomer som kan bli satt i sammenheng med ulike hjertelidelser, men de fleste studiene har bidratt til å eliminere vekk kandidatgener hos enkelte raser.

Her følger en oversikt over noe av det som er gjort av genetiske undersøkelser på hund med hensyn til hjertelidelsene dilatert kardiomyopati (DCM), misdanning av høyre hjerteklaff (CTVM), arytrogen høyre ventrikkel dysplasi/kardiomyopati (ARVD/C) og atrieflimmer (AF).

Figur 6 på neste side viser oppbygning av hjertet, med navn på ulike deler av hjertet som omtales under presentasjonen. I tillegg er de hjertelidelsene denne mastergradsoppgaven tar for seg markert med tekstboks med rød skrift.



**Figur 6** Hjertets oppbygning (www.nhlbi.nih.gov, National Heart Blood and Lung Institute, US). De ulike hjertelidelsene denne mastergradsoppgaven tar for seg er markert med tekstboks med rød skrift. Hjertelidelsene er dilatert kardiomyopati (DCM), misdanning av høyre hjerteklaff (CTVM), arytmoden høyre ventrikkle dysplasi/kardiomyopati (ARVD/C) og atrieflimmer (AF).

### 1.2.2.1 Dilatert kardiomyopati (DCM)

DCM er en tilstand i hjertemuskulaturen som fører til utvidelse av venstre hjertekammer (figur 6), redusert systolisk funksjon og økt sfærisk størrelse.

DCM er den vanligste formen for kardiomyopati hos mennesker og hunder. Risikoen for DCM øker på store hunder, hunder som er avlet i stort antall og eldre hunder (Ostrander, Giger m. fl. 2005). DCM er beskrevet i mange ulike raser, for det meste hos store hunder som Dobermann Pinscher (Domanjko-Petric A 2002), Grand Danois (Meurs, Miller m. fl. 2001), Newfoundlandshunder (Tidholm og Jonsson 1996) og Irske Ulvehunder (Brownlie og Cobb 1999). Det er gjort histologiske funn i DCM-påvirket hjertevev som viser klinisk variasjon og forskjeller i utvikling av DCM (Tidholm, Haggstrom m. fl. 2000). Siden klinisk DCM ofte begynner sent i hunders liv, med et langt presymptomatisk forløp, er de fleste hundene ferdige med å få avkom innen sykdommen oppdages. Derfor er det vanskelig å selektere bort uønsket fenotype (Dukes-McEwan 2003). Fenotypen i utviklet DCM hos hunder er konstant med defekter i komponentene i cytoskjelettet til hjertemuskelaturen (Wiersma, Leegwater m. fl. 2007).



Data indikerer at det sannsynligvis ligger et DCM lokus på hundekromosom nr 8 (CFA8). En koblingsstudie av hele genomet i forhold til autosomt recessivt arvet unghunds-DCM (jDCM) ble gjennomført på Portugisisk vannhunder avdekket dette. Totalt 16 familier som segregerte sykdommen ble undersøkt (Werner, Raducha m. fl. 2008).

Det sekvenserte hunde- og menneskegenomet (HUGO 2004; Lindblad-Toh, Wade m. fl. 2005) gjør komparative kartlegging mulig for å indikere en sammenheng mellom hunde- og menneskegenomet i forhold til DCM (Werner, Raducha m. fl. 2008). CFA8 er ortologt med den lange armen på humant kromosom 14 (HSA14q), med kun et lite avvik i et segment nær telomeren i menneskets kromosom, dette er plassert nær centromeren i hunden (Lindblad-Toh, Wade m. fl. 2005). Oppdagelsen av DCM-lokuset vil gi et nytt område å undersøke i humane DCM-pasienter (Werner, Raducha m. fl. 2008).

DCM er beskrevet i flere arter og flere gener som er satt i sammenheng med sykdommen er funnet i mennesker (Burkett og Hershberger 2005), mus (Zhao, Liu m. fl. 2002) og hamster (Nigro, Okazaki m. fl. 1997). Disse genene koder for det meste for proteiner som er celleskjelett i muskelcellene. Disse proteinene deles inn i sarkomere og ekstra-sarkomere proteiner, i alt 14 stykker (tabell 2, neste side). Sarkomere er de minste kontraktile enhetene i musklene (Wiersma, Leegwater m. fl. 2007). X-linkede gener koblet mot DCM finnes også (tabell 2, neste side) (D'Adamo, Fassone m. fl. 1997; Cohen og Muntoni 2004).

I tillegg er mutasjoner i mtDNA satt i sammenheng med DCM (Suomalainen, Paetau m. fl. 1992). Videre er DCM beskrevet med ujevn hjerterytme, forårsaket av gener som koder for natrium- (McNair, Ku m. fl. 2004) og kaliumkanaler (Bienengraeber, Olson m. fl. 2004).

**Tabell 2** Oversikt over gener som koder for sarkomere og ekstra-sarkomere proteiner som er satt i sammenheng med DCM hos mennesker . Disse genene er linket til autosomale kromosomer. I tillegg vises gener på X-kromosomet som er linket mot DCM (D'Adamo, Fassone m. fl. 1997; Nigro, Okazaki m. fl. 1997; Olson, Michels m. fl. 1998; Li, Tapscoft m. fl. 1999; Kamisago, Sharma m. fl. 2000; Burke og Stewart 2002; Itoh-Satoh, Hayashi m. fl. 2002; Olson, Illenberger m. fl. 2002; Zhao, Liu m. fl. 2002; MacLennan og Kranias 2003; Arimura, Hayashi m. fl. 2004; Cohen og Muntoni 2004; Hayashi, Arimura m. fl. 2004; Murphy, Mogensen m. fl. 2004)

	<b>Genet</b>	<b>Forkortelse</b>
<b>Gener som koder for sarkomere proteiner</b>	<i>A-cardiac actin</i>	<i>ACTC</i>
	<i>Cystein-rich protein 3</i>	<i>CSRP3</i>
	<i>LIM-domain binding factor 3</i>	<i>LIM-dbf 3</i>
	<i>Myosin heavy polypeptide 7</i>	<i>MYH7</i>
	<i>Titin cap</i>	<i>TCAP</i>
	<i>A-tropomyosin</i>	<i>TPM1</i>
	<i>Troponin I 3</i>	<i>TNNI3</i>
	<i>Troponin T 2</i>	<i>TNNT2</i>
	<i>Vinculin</i>	<i>VCL</i>
<b>Gener som koder for ekstra-sarkomere proteiner</b>	<i>Caveolin 1</i>	<i>CAV1</i>
	<i>Desmin</i>	<i>DES</i>
	<i>Lamin A/C</i>	<i>LMNA</i>
	<i>Phospholamban</i>	<i>PLN</i>
	<i>Sarcoglycan <math>\delta</math></i>	<i>SGCD</i>
<b>X-linkede gener for DCM</b>	<i>Dystrophin</i>	<i>DYS</i>
	<i>Tafazzin</i>	<i>TAZ</i>

Av de 14 autosomale DCM kandidatgenene i hund er genomisk informasjon og polymorfe markører allerede tilgjengelig for *ACTC* (Brouillette, Andrew m. fl. 2000; Meurs, Magnon m. fl. 2001), *DES* (Stabej, Imholz m. fl. 2004), *PLN* (Stabej, Leegwater m. fl. 2005), *SGCD* (Stabej, Leegwater m. fl. 2005) og *TPM1* (Stabej 2005). Det er utviklet et sett markører for disse genene, både mikrosatellitter og SNPer. Disse markørene er verktøy man kan bruke for å kjøre koblings- og assosiasjonsstudier mellom ulike gener og DCM i ulike hunderaser (Wiersma, Leegwater m. fl. 2007).

I studien til Stabej m. fl. (Stabej, Imholz m. fl. 2004) ble det sjekket om mutasjoner i *DES* var assosiert med DCM på Dobermann Pinscher. De isolerte kunstige bakteriekromosomer (BAC) som inneholdt hundens *DES* og bestemte lokaliseringen til genet på hundens kromosomer ved hjelp av fluorescence in situ hybridization (FISH). Ved hjelp av data i NCBI's arkiv og

GenBank ble DNA sekvensen kartlagt og syv SNPer ble identifisert. Fra *DES* til hunden ble BAC-kloner, polymorfe mikrosatellitter, isolert. Mikrosatellitten og fire informative *DES* SNPer ble funnet i en Dobermann familie med ofte forekommende DCM. Likevel fant man ingen assosiasjon mellom DCM fenotypen og noen av *DES* haplotypene. Studien konkluderte med at mutasjoner i *DES* ikke kan assosieres med Dobermann DCM. Informasjon fra denne studien vil gjøre kartlegging av *DES*-mutasjoner og mulig sammenhenger med DCM raskere å gjennomføre i andre raser (Stabej, Imholz m. fl. 2004).



**Figur 7** Irske ulvehunder ([www.hunde-irish-wolfhound.de](http://www.hunde-irish-wolfhound.de))

i tillegg ble ekson- og intronsekvenser til *TAZ*-genet screenet for polymorfismer. 64 hunder med DCM og 25 hunder uten DCM var med i studien. Statistiske analyser av mikrosatellitt-markørene viste ingen kobling til DCM. Videre så var alle de Irske Ulvehundene som var med i denne studien monomorfe for *TAZ*. Dette indikerer at *TAZ* er ikke noen sannsynlig årsak til DCM på Irsk Ulvehund (Philipp, Broschk m. fl. 2007).

Philipp m. fl. (Philipp, Vollmar m. fl. 2008) gjennomførte også en studie hvor de evaluerte seks andre kandidatgener for DCM hos de samme Irske Ulvehundene de brukte i studien fra 2007 (Philipp, Broschk m. fl. 2007). Bakgrunnen for studien var en nylig gjennomført kompleks segresjonsanalyse som viste at en autosomal genmodell med kjønns spesifikke alleliske effekter var en sannsynlig årsaken til DCM på Irske Ulvehunder (Distl, Vollmar m. fl. 2007). Gene *ACTC*, *CSRP3*, *DES*, *PLN*, *SGCD* og *Tropomodulin (ITMOD1)* ble sjekket for assosiasjon med DCM etter en analyse av cDNA sekvenser og 3'- og 5'- Untranslated Region (UTR) i forhold til genetiske DNA-markører (Philipp, Vollmar m. fl. 2008).

Ingen signifikante resultater i forhold til DCM ble oppnådd. Disse seks gene kunne dermed bli eliminert vekk som kandidatgener for DCM på Irsk Ulvehund. Likevel kan de kartlagte

sekvensforskjellene mellom Irsk Ulvehund og sekvensene kartlagt i hundens genom (Lindblad-Toh, Wade m. fl. 2005) være til nytte i senere koblings- og assosiasjonsstudier i forhold til DCM i andre hunderaser (Philipp, Vollmar m. fl. 2008).

Wiersma m. fl. (Wiersma, Stabej m. fl. 2008) evaluerte 15 kandidatgener for DCM på Newfoundlandshund, hvor 38 hadde DCM og 36 var friske. 14 av genene var fra studien de gjorde i 2007 (Wiersma, Leegwater m. fl. 2007), samt at *Titin (TTN)* ble evaluert (Wiersma, Stabej m. fl. 2008). Konklusjonen på studien var at det var ingen bevis for at disse genene var involvert i DCM hos Newfoundlandshund.

I en studie av Philips m. fl. (Philipp, Vollmar m. fl. 2008) ble *TCAP* evaluert som et kandidatgen for DCM på Irsk Ulvehund. Genomisk DNA ble analysert på 8 Irske Ulvehunder med DCM og på 5 Irske Ulvehunder uten DCM. cDNA ble sekvensert i en DCM-rammet Irsk Ulvehund, i to ikke rammede hunder, en tibetansk Terrier og en Dachshund. Sammenlignet med det kartlagte hundegenomet (Lindblad-Toh, Wade m. fl. 2005), så ble det funnet en sekvensforskjell i 3'UTR og funnet to i intronsekvensen. På Irsk Ulvehund var sekvensene monomorfe. For å kunne eliminere ut rasespesifikke haplotyper som er predisponert for DCM, ble polymorfismene genotypet på 24 blandingshunder fra totalt 9 raser. Analysene viste at mutasjonene ikke var bundet kun mot Irsk Ulvehund. Flere enn 80 % av blandingshundene var homozygote for Irsk Ulvehund sin haplotype. Konklusjonen på studien ble at *TCAP* sannsynligvis ikke er årsaken til DCM på Irsk Ulvehund (Philipp, Vollmar m. fl. 2008).

Meurs m. fl. (Meurs, Hendrix m. fl. 2008) gjennomførte en studie hvor de sekvenserte ekson og splice-områder i 5 gener hos Doberman Pinschers med DCM. Genene *Troponin C (TnC)*, *LMNA*, *CSRP3*, *Cardiac troponin T (cTnT)*, og *MYH7* som koder for proteiner i hjertemuskelaturen ble sekvensert. Dette var gener som humant er assosiert med DCM (Fatkin, MacRae m. fl. 1999; Mogensen, Murphy m. fl. 2004; Kamisago, Schmitt m. fl. 2006). Hundene de sjekket var 5 Doberman Pinschers som ikke var i slekt og 2 friske Labrador Retrievere. De sammenlignet sekvensene mellom Doberman Pinschers, kontrollgruppen og det sekvenserte hundegenomet (Lindblad-Toh, Wade m. fl. 2005). Ingen mutasjoner som kunne settes i sammenheng med DCM ble funnet, selv om SNPer ble funnet i *CSRP 3*, *MYH7* og *cTnT* (Meurs, Hendrix m. fl. 2008).

### **1.2.2.2 Misdanning av høyre hjerteklaff - canine tricuspid valve malformation (CTVM)**

Misdanning av høyre hjerteklaff hos hunder, såkalt canine tricuspid valve malformation (CTVM), hos mennesker kalt Ebstein anomaly, er en fortykkelse av høyre hjerteklaff (figur 6 s. 32). Ved liten misdanning behøver det ikke få store konsekvenser for hunden, den kan leve et normalt liv. Ved større misdannelser kan det føre til alvorlig hjertesvikt (Tidholm 1997; Hoffmann, Amberger m. fl. 2000). Kunnskapen rundt utviklingen av sykdommen er begrenset, både hos mennesker og hund. De fleste tilfellene av sykdommen virker å være sporadiske, men det forekommer familiære grupperinger hvor flere personer blir rammet av sykdommen, med hjertesvikt som konsekvens (Emanuel, O'Brien m. fl. 1976). Den hunderasen hvor CTVM er mest vanlig er Labrador Retriever (Tidholm 1997).

I en studie av Andelfinger m. fl. (Andelfinger, Wright m. fl. 2003) ble tre Labrador Retrievere i slekt, med langt fremskreden CTVM klinisk undersøkt og sjekket med ultralyd. Blodprøver ble samlet inn og analysert ved hjelp av mikrosatellitt-markører utviklet i andre studier (Jonasdottir, Mellersh m. fl. 2000; Richman, Mellersh m. fl. 2001). CTVM ble identifisert som et autosomt trekk med redusert gjennomtrengelighet. Koblingsanalyser på en av hundene viste disposisjon for CTVM på et område på kromosom 9 (CFA9). Dette området er synonymt med menneskets kromosom 17q (HSA 17). Området på HSA 17 har høy tetthet av gener, men ingen gener er satt i direkte sammenheng med Ebstein anomaly (Andelfinger, Wright m. fl. 2003).

I en oppfølgingsstudie av Andelfinger m. fl. (Andelfinger, Hitte m. fl. 2004) ble 148 markører på CFA9 analysert ved hjelp av radiation hybrid mapping i forhold til det synonyme området på HSA 17, samt i tilsvarende områder på mus og rotte. Denne komparative sammenligningen av et kromosom for lokus til CTVM førte til at det ble identifisert en rekke omgrupperinger, som gjorde det mulig å rekonstruere en evolusjonær sammenheng mellom artene (Andelfinger, Hitte m. fl. 2004). Denne studien hadde ikke som mål å finne noen gen for CTVM, men avdekket evolusjonær sammenheng mellom artene som kan være et mulig verktøy i den videre søken etter genet. Foreløpig er ingen gen som koder for CTVM funnet.

### 1.2.2.3 Arytmogen høyre ventrikkel dysplasi/kardiomyopati (ARVD/C)

ARVD/C er en tilstand med rytmeforstyrrelser i ventriklene (hertekamrene - figur 6 s. 32) som er livstruende. Dette skyldes økende utskiftning av muskelvev i høyre ventrikkels yttervegg med et vev bestående av en blanding av bindevev og fettvev. Dette område mister evnen til å delta i muskelarbeidet til hjertet og etter hvert så får man vev som bare flagrer med i hjertets bevegelser. Området med skader poser seg ut når hjertet trekker seg sammen for å skyve ut blod fra hertekamrene. Den svake herteveggen gir etter. Etter en stund vil høyre hertekammer øke i størrelse på grunn av sin slappe tilstand. Vevsutskiftningen kan også foregå i venstre hertekammer og i sjeldne tilfeller i herteskillevæggen (Gear og Marcus 2003).

Meurs m. fl. (Meurs, Ederer m. fl. 2007) sjekket 4 desmosomalgener på 10 Boxere med ARVD/C og 2 friske Labrador Retrievere. Disse desmosomalgenene er hos mennesker assosiert med ARVD/C og koder for proteiner i cellemembran som binder celler sammen (Syrris, Ward m. fl. 2006). De undersøkte ekson og splice-områder for forårsakende mutasjoner. Sekvensene ble sjekket mellom hundene med ARVD/C, kontrollhundene og det sekvenserte hundegenomet (Lindblad-Toh, Wade m. fl. 2005). Ingen forårsakende mutasjoner ble funnet (Meurs, Ederer m. fl. 2007).

I en studie av Oyama m. fl. (Oyama, Reiken m. fl. 2008) ble 13 Boxere med ARVD/C sjekket for assosiasjon med calstabin2-mangler. Calstabin2 er et protein som binder seg til ryandoninreseptorer (RyR2), og dette komplekset kontrollerer hertesammentrekningen ved å regulere  $Ca^{2+}$ -nivået i hertevevet.  $Ca^{2+}$  er nødvendig for hjertets kontraksjonsmekanisme (Wehrens og Marks 2003). Bakgrunnen for studien (Oyama, Reiken m. fl. 2008) var at Boxerhunder innehar naturlig forekommende ARDV/C med kliniske og patologiske likheter med menneskelige utgaver av sykdommen (Basso, Fox m. fl. 2004).

I studien til Oyama m. fl. (Oyama, Reiken m. fl. 2008) ble DNA fra Boxere med ARDV/C (13 stk) sammenlignet med 2 Labrador Retrievere som ikke hadde ARDV/C. Det ble registrert lavere nivå av calstabin2 i de rammede Boxerne, sammenlignet med kontrollgruppen ( $P < 0.0001$ ), likevel ble det ikke funnet noen genetiske forskjeller innen promotoregionen, eksonene eller splice-områder i calstabin2-genet mellom Boxerne og kontrollgruppen. Nukleotidene i de calstabin2-kodende områdene som ble sjekket hadde en likhet med menneskelige områder som lå mellom 91 % til 98 %. Konklusjonen på studien til

Oyama m. fl. (Oyama, Reiken m. fl. 2008) var calstabin2-nivået er assosiert med ARVD/C, men så langt er det ikke funnet mutasjoner i genet som koder for calstabin2.

#### **1.2.2.4 Atrieflimmer (AF)**

AF er uregelmessig hjerterytme på grunn av elektrisk uorden i forkamrene til hjertet (figur 6 s. 32). Dette rammer mennesker i større grad ved økende alder. Normalt slår hjertet med regelmessig jevn rytme. Ved AF blir den elektriske aktiviteten blant hjertecellene i forkamrene uregelmessig og forkamrene flimrer og bidrar derfor lite til å pumpe blodet ned i hjertekamrene. Fordi flimringen medfører at overføringen av elektriske signaler fra de to forkamrene til de to hjertekamrene blir rask og uregelmessig, vil også hjertet pumpe raskt og uregelmessig. Pulsene kan variere og dette går ut over blodtilførselen til lungene og til resten av kroppen. Derfor vil atrieflimmer føre til nedsatt fysisk kapasitet, begrense den fysiske funksjonsevnen og gi betydelig nedsatt livskvalitet. En vedvarende rask hjerterytme sliter på hjertet, og over tid kan det gi hjertesvikt (Steinberg 2004).

I en studie av Cardin m. fl. (Cardin, Libby m. fl. 2007) ble hjertemuskelvev hos hund utsatt for kunstig oppregulering av hjerterytmen, såkalt eksperimentell hjertesvikt, og endringer i mRNA-uttrykk ble vurdert. Fem grupper med fem blandingshunder i hver gruppe ble utsatt for atrial- (ATP) eller ventricular tachypacing (VTP), det vil si kunstig endring av hjerterytmen ved hjelp av pacemaker i forkamrene eller hjertekamrene. I tillegg hadde de kontrollgrupper som fikk innsatt pacemaker, men som ikke fikk den slått på. Studien viste at VTP-indusert atrieflimmer produserer forskjellig mRNA mikromatrisemønster enn ATP-indusert atrieflimmer. Studien belyste store forskjeller mellom de to ulike hjerterytme-paradigmene. VTP viste betydelig større endring i mRNA mikromatrisemønster enn ATP og endringene økte over tid. Dette indikerer også tidsavhengig utvikling i endring av genuttrykk.

I en oppfølgingsstudie av Cardin m. fl. (Cardin, Pelletier m. fl. 2008) ble tre grupper av fem blandingshunder utsatt for VTP. De vurderte tidsavhengig endring i genuttrykkene i venstre forkammer og venstre hjertekammer. De fant ut at det var dramatisk endring i genuttrykkene i venstre forkammer, mens endringene i venstre hjertekammer var mer begrenset. Dette gir

ytterligere kunnskap om et felt som fortsatt er ufullstendig kartlagt (Cardin, Pelletier m. fl. 2008).

Regulering av hjerterytmen ved hjelp av radiobølger er den mest vanlige formen for behandling av AF (Park, Chou m. fl. 2004). I en studie av Li m. fl. (Li, Li m. fl. 2007) ble bieffekten av denne behandlingen, utvikling av stenose (innsnevring i lungevenene) sjekket mot mRNA nivå og uttrykking av enzymet transforming growth factor beta 1 (TGF $\beta$ 1). TGF $\beta$ 1 er et enzym som deltar i interaksjonen mellom celler under embryotisk utvikling. I studien ble 14 blandingshunder med AF og 14 friske sjekket mot behandling med radiobølger. I alt 4 grupper ble sjekket, 7 friske uten noen form for behandling, 7 friske med behandling av radiobølger, 7 med AF og ingen behandling og tilslutt 7 med AF og behandling. Nivået av TGF $\beta$ 1- mRNA, samt nivået av TGF $\beta$ 1 ble sjekket både før og etter eventuell behandling. Nivåene økte signifikant ( $P < 0.05$ ) i de to gruppene som ble utsatt for radiobølger både hos de friske og syke hundene. Dette resultatet indikerer at TGF $\beta$ 1 kan spille en sentral rolle i utvikling av stenose etter radiobølge-behandling (Li, Li m. fl. 2007).



### 1.3 Gener og pelsfarge

Genetikken rundt pelsfarge på hunder er blitt studert i mange år, og blant andre postulerte Clarence C. Little (Little 1957) en rekke gener som kunne forklare arv av pelsfarge og pelsmønster på hunder. Han baserte sine hypoteser på data hentet fra avl på hund, og brukte bokstaver for å indikere ulike lokier for plassering av alleler. Han foreslo to eller flere alleler avhengig av hvilket loki man tok for seg. Flere oppdrettere har prøvd å studere pelsfarge i deres hunderase og mange har støttet seg til Little når det gjelder valg av bokstaver for de ulike lokiene (Schmutz og Berryere 2007).

Det er flere gener som er satt i sammenheng med pelsfargen på hunder. Flere av disse genene har minst tre alleler og i noen tilfeller forårsaker ulike alleler fra forskjellige gener den samme uttrykte pelsfargen. Alleler som er funnet viser stor variasjon med hensyn til mutasjonstyper. I noen tilfeller er det punktmutasjoner, premature stoppkoder, delesjoner, duplikasjoner eller SINE-insersjoner. Interaksjonen mellom disse ulike lokiene er nødvendig for å skape de ulike pelsmønstrene. Genetikken rundt pelsfarge på hund avslører hvor komplekse sammenhengene er og at det kan være vanskelig å anslå pelsfargen selv om man vet genotypen (Schmutz og Berryere 2007).

I noen raser er kun et relativt smalt spekter av farger tillatt innen standarden, og i andre raser har alle hundene det samme pelsmønsteret. Noen farger er blitt sett på som diskvalifiserende i enkelte raser, fordi andre farger ble sett på som krysning med andre raser eller at andre farger kunne gi utilsiktede bi-effekter. I alt syv gener som er satt i sammenheng med pelsfarge og mønster på hund er identifisert; *Melanocortin 1 receptor (MR1C)*, *Agouti signal peptide (ASIP)*, *Tyrosinase related protein 1 (TYRP1)*, *Beta-defensin 103(CBD103)*, *Melanophilin (MLPH)*, *Silver (SILV)* og *Microphtalmia-associated transcription factor (MITF)*. Disse genene er satt opp i tabell 3 på neste side med allelene i anslått hierarkisk rekkefølge (Schmutz og Berryere 2007).

**Tabell 3** Gener som er satt i sammenheng med pelsfarge, **uthevet** allel er bekreftet på DNA-nivå og allelene er i anslått hierarkisk rekkefølge (Schmutz og Berryere 2007).

Navn på gen	Forkortelse	Kromosom-lokalisering	Pelsfarge	Alleluttgaver i anslått hierarkisk rekkefølge
<i>Melanocortin 1 receptor</i>	<i>MC1R</i>	CFA5	Svart-brunt til gul-rød	$E^M > E > e$
<i>Agouti signal peptide</i>	<i>ASIP</i>	CFA24	Fra rød til svart	$a^y > a^w > a^l > a$
<i>Tyrosinase related protein 1</i>	<i>TYRP1</i>	CFA11	Svart eller brunfarge	$B > b(b^s, b^d, b^c)$
<i>Beta-defensin 103</i>	<i>CBD103</i>	CFA16	Svart og brun med innslag av andre farger	$K^B > k^{br} > k^y$
<i>Melanophilin</i>	<i>MLPH</i>	CFA25	Fortynning av pelsfarge	$D > d > d2$
<i>Silver</i>	<i>SILV</i>	CFA10	Merlet pels	$M > m$
<i>Microphthalmia-associated transcription factor</i>	<i>MITF</i>	CFA20	Tilfeldige flekker	$S > s^i > s^p > s^w$

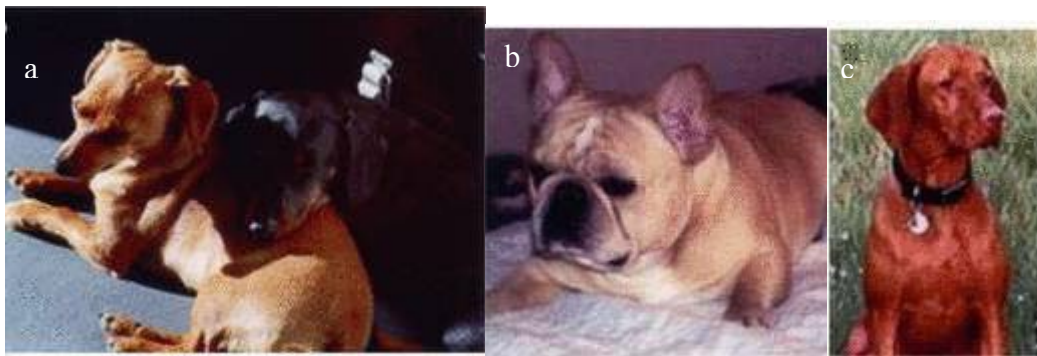
### 1.3.1 Hovedfargelokus hos hund

Denne oversikten viser forskning med fokus på molekylærgenetikk som bruker hypotesene til Little (Little 1957) som utgangspunkt. Det er et sammensatt samspill mellom genotypene og det er vanskelig å anslå den eksakte pelsfargen.

Hovedfargen til hunder bestemmes av følgende fire gener: *MC1R*, *ASIP*, *TYRP1* og *CBD103*

### 1.3.1.1 *Melanocortin 1 receptor (MC1R)* – svart-brunt til gul-rød

*MC1R* var det første genet som ble studert ved hjelp av molekylær tilnærming hos hunder. *MC1R* koder for reseptoren melanocortin (Everts, Rothuizen m. fl. 2000). Reseptoren er plassert i cellemembranen på melanocytene, det vil si de pigmentproduserende hudcellene. Melanocytstimulerende hormon (MSH) er et hormon som stimulerer melanocytene. Når MSH bindes til reseptoren produserer cellen eumelanin - svart eller brunt pigment (Cone, Lu m. fl. 1996). Little kalte allelet for extension og derfor har dette allelet fått bokstaven E (villtype) og e (mutasjonen) (Little 1957). *E/-* kan gi mørk pelsfarge (se figur 8 a-høyre) avhengig av samspill med andre gen. Homozygot *e/e* fører til en klar rød pelsfarge i hund (figur 8a (venstre), b og c)) (Everts, Rothuizen m. fl. 2000; Newton, Wilkie m. fl. 2000).



**Figur 8** (a-venstre) Klar rød miniatyr Dachshund som er homozygot for mutert *MC1R*  $k^y/k^y$ ,  $e/e$ ,  $B/B$  og (a-høyre) Miniatyr Dachshund med ikke mutert *MC1R*-allel  $k^y/k^y$ ,  $E/-$ ,  $B/B$ ,  $a^1/a^1$  (b) Fransk Bulldog som er homozygot for mutert *MC1R*  $k^{br}/k^y$ ,  $e/e$ ,  $B/B$ ,  $a^y/a^y$ ; (c) gull Vizsla homozygot for mutert *MC1R*  $K^B/K^B$ ,  $e/e$ ,  $b/b$  (Schmutz og Berryere 2007)

Hunder med *e/e* har ensfarget gul-rød pels fordi de ikke kan produsere eumelanin. Denne mutasjonen fører til et trunkert protein som gjør at *MC1R*-reseptoren mister sin funksjon. MSH binder seg ikke til reseptoren og eumelanin blir ikke produsert, og i slike tilfeller aktiveres cellens gul-røde fargepigment, phaeomelanin. Dette gjelder for pelsfargen, hundene kan ha svart snute, lepper og øyelokkrender på lik linje med andre hunder (Cone, Lu m. fl. 1996; Everts, Rothuizen m. fl. 2000; Newton, Wilkie m. fl. 2000; Schmutz, Berryere m. fl. 2002). *MC1R*-mutasjonen, som får arginin til å erstattes med et prematur stopkodon (R306Ter), er funnet i et vidt spekter av hunderaser (Newton, Wilkie m. fl. 2000; Schmutz, Berryere m. fl. 2002).

Et tredje allel  $E^M$  er oppstått som følge av en annen mutasjon, methionin byttes ut med valin ved aminosyre 264 (M264V) (Schmutz, Berryere m. fl. 2003). Denne mutasjonen gir hos hunder som er lyse en maske av eumelanin i ansiktet (figur 9a), noe som ikke kommer til syne hos hunder som er helsvarte, brune eller blå. Ved aldring kan de sistnevnte hundene endres mot grå og da kan masken bli synlig (figur 9b). Hunder som har et hvitt maskeområde vil heller ikke utvise masken selv om de innehar  $E^M$ , da de ikke produserer eumelanin i dette området (figur 9c) (Schmutz og Berryere 2007).



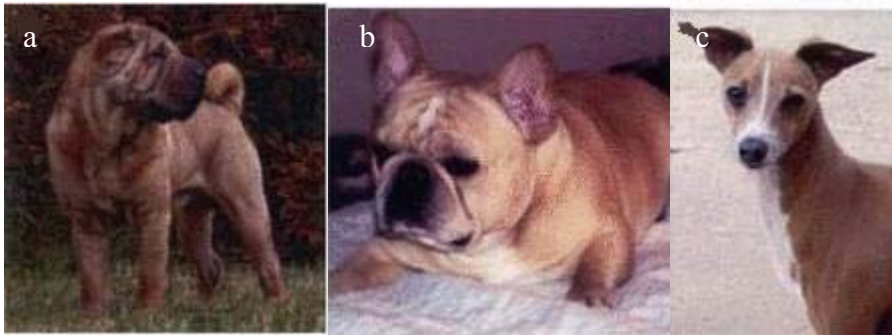
**Figur 9** (a) Maskert kinesisk Shar-Pei  $k^y/k^y$ ,  $E^M/E$ ,  $B/B$ ,  $\alpha^y/\alpha^y$ ; (b) Maskert Kerry Blue Terrier som viser masken ettersom den blir gråere ved aldring  $K^B/K^B$ ,  $E^M/E$ ,  $B/B$ ,  $D/D$ ,  $G/G$  og (c) Italiensk Greyhound som ikke produserer eumelanin i maskeområdet  $k^y/k^y$ ,  $E^M/E$ ,  $B/B$ ,  $\alpha^y/\alpha^y$ ,  $d/d$  (Schmutz og Berryere 2007)

### 1.3.1.2 Agouti signal-peptide (ASIP) – fra rød til svart

*ASIP* har flere alleler som er involvert i pelsfargen på hund. *ASIP* er lokalisert til CFA 24 (Kerns, Newton m. fl. 2004). Notasjon er A for dominant, som forøvrig ikke er funnet, og a for recessiv (Little 1957). I studien til Kerns m. fl. (Kerns, Newton m. fl. 2004) fant man at proteinet som *ASIP* koder for er 98 % identisk med revens gen. Studiens komparative analyser av Dobermann Pinscher Agouti cDNA, revens cDNA og 180 kb av Doberman Pinscherens genomiske DNA foreslår at forskjellige pigmenteringsmønstre i hundefamilien er kontrollert av alternativ bruk av ulike promotorer og ingen oversetting av de første eksonene.

Det finnes fire alleler i hund med følgende hierarki  $a^y > a^w > a^l > a$ . *ASIP* styrer pelsfargen hos hund ved å kontrollere forholdet mellom rødt (phaeomelanin) og svart (eumelanin) pigment. Det er avtagende mengde rød pels, fra dominant rød ( $a^y$ ) hvor hele hunden er rød med noen svarte hår, via ulvegrå ( $a^w$ ), svart med noen røde områder ( $a^l$ ), til recessivt svart ( $a$ ) hvor hele hunden er svart (Bultman, Klebig m. fl. 1994).

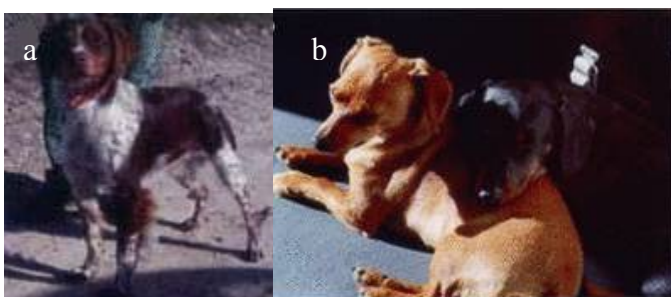
Et av de vanligste allelene i hund er  $a^y$ . Dette allelet har to aminosyreforandringer sammenlignet med villtypen,  $a^w$ . Denne pelsfargen kalles fawn eller dominant rød i de fleste raser (figur 10 a, b og c), men også sobel i noen få (Berryere, Kerns m. fl. 2005).



**Figur 10** Tre hunder som er homozygote for  $a^y$ -allelet (a) fawn maskert kinesisk Shar-Pei  $k^y/k^y, E^M/E, B/B, a^y/a^y$ ; (b) fawn fransk Bulldog  $k^{br}/k^y, e/e, B/B, a^y/a^y$ ; (c) fawn italiensk Greyhound  $k^y/k^y, E^M/E, B/B, a^y/a^y, d/d$  (Schmutz og Berryere 2007)

$a^y$  er identifisert i 22 raser, med to mutasjoner: A82S og R83H i forhold til  $a^w$ . I studien til Kerns og Berryere (Kerns og Berryere 2005) fant man begge mutasjoner i totalt 45 hunder med fawn fenotype. Mutasjonen A82S ble funnet i flere raser enn R83H. Svarte hår forekom i varierende mengde, særlig langs rygg, nakke og hale.

Villtypen  $a^w$ , ulvegrå, forårsaker at noen hårstrå har bånd med eumelanin og phaeomelanin fra rot til tupp. Disse båndene er vanlig i ryggregionen. ASIP sekvensen av dette allelet er homologt med gråulvens sekvens (Berryere, Kerns m. fl. 2005) og aminosyresekvensen er også den samme for coyote (Schmutz, Berryere m. fl. 2007).  $a^l$  tror man finnes i hunder som er svarte og brune (figur 11 a, b høyre). Ingen forskjell er funnet i de kodende områdene, ekson 2-4, av hunder med denne fenotypen sammenlignet med hunder med fargebånd i pelsen. Disse allelene må sannsynligvis ha forskjell i promotorregionen (Vrieling, Duhl m. fl. 1994).



**Figur 11** To hunder man tror er homozygot for  $a^l$  (a) Brun og tan Fransk Brittany:  $k^y/k^y, E/E, b/b, a^l/a^l$ ; (b-høyre) svart og tan miniatyr Dachshund  $k^y/k^y, E/-, B/B, a^l/a^l$  (Schmutz og Berryere 2007)

Allelet  $a$ , som også finnes i hester (Rieder, Taourit m. fl. 2001), er et recessivt allel som gir hunder svart pels. Dette muterte allelet er R96C (C288T). Det er den eneste årsaken til svart pels i Schäferhund og Shetland Sheepdog (Kerns, Newton m. fl. 2004; Berryere, Kerns m. fl. 2005), men allelet opptrer også i svart Schipperke, Groenendael og Puli. Allelet er også funnet i Samojedhund og amerikansk Eskimohund (Schmutz og Berryere 2007).

ASIP-promotorer er ennå ikke identifisert hos hund. Mange hundeoppdrettere har postulert at det finnes et femte allel,  $a^s$ , for ryggbrun, men det er ikke funnet noe bevis for dette (Schmutz og Berryere 2007).

### 1.3.1.3 Tyrosinase related protein 1 (TYRP1) – svart eller brunfarge

*Tyrosinase related protein 1 (TYRP1)* er et gen som koder for svart eller brun farge på pels og synlig hud som nese, lepper, øyelokksrender og poter hos hund. Notasjonen er  $B$  for dominant eller  $b$  for recessiv etter Little (Little 1957).  $B$  gjør hunden i stand til å produsere svart pigment og  $b$  gjør hunden i stand til å produsere brunt pigment. Svart som  $B$  produserer må ikke forveksles med dominant svart, hvor hunden kun kan produsere svart pigment. Mønster eller tilstedeværelse av svart farge bestemmes av andre genotyper som  $E/-$  og  $a/a$ . *TYRP1* er kartlagt til CFA 11 (Schmutz, Berryere m. fl. 2002). Svart pels og synlig hud kan fås ved dominant nedarving (figur 12 a-høyre). Recessivt nedarvet kan gi brunfarget pels og synlig hud (figur 12 a-venstre og b). Tre andre alleler er funnet i *TYRP1*, en kombinasjon av hvilken som helst to kan gi brun pelsfarge og brun synlig hud. En variant ( $b^s$ ), inneholder et prematurt stopkodon i ekson 5, den andre ( $b^d$ ) har et fjernet område i ekson 5 og den tredje varianten ( $b^c$ ) har en basepar-substitusjon i ekson 2 (Schmutz, Berryere m. fl. 2002).



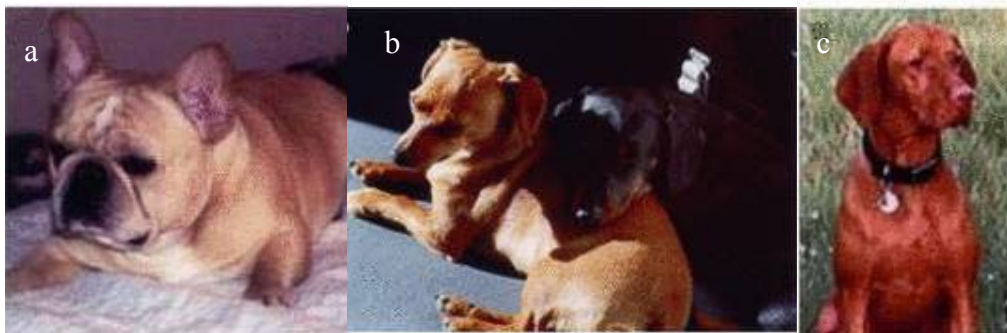
**Figur 12** En hund som er heterozygot med  $B$  og dermed svarte farger i pelsen og synlig hud.(a) (høyre) Svart Large Munsterlander  $K^B/K^B$ ,  $E/E$ ,  $B/b$  og to hunder som er homozygote for  $b$  og dermed brune farger i pelsen og synlig hud, (a)(venstre) brun tysk korthåret Pointer  $K^B/K^B$ ,  $E/E$ ,  $b/b$  og (b) Brun og tan Fransk Brittany  $k^y/k^y$ ,  $E/E$ ,  $b/b$ ,  $a^1/a^1$ (Schmutz og Berryere 2007)

Alle tre allelene som koder for brunt er funnet i flere raser, men noen raser med brune individer har ikke alle tre allelene. Det er mulig det er et fjerde ukjent *TYRPI*-allel som også gir brune individer men dette er ennå ikke funnet (Schmutz, Berryere m. fl. 2002). I mus er det også tre alleler som gir brun pelsfarge og hud, hver med sin litt forskjellige fenotype (Jackson 1988; Zdarsky, Favor m. fl. 1990; Javerzat og Jackson 1998). Brunfargetypen varierer også i hund, både i og mellom raser, men det finnes ingen konsis brunfarge assosiert med de seks mulige genotypene av *TYRPI* i hunder (Schmutz og Berryere 2007).

I noen hunderaser slik som Doberman Pinscher og Australsk Gjeterhund, blir brune hunder ofte omtalt som røde. Disse er på bakgrunn av genetiske undersøkelser fastslått som brune, da de har *TYRPI* mutasjoner (Schmutz og Berryere 2007).

### Samspill mellom *TYRPI* og *MC1R*

*TYRPI* allelene samspiller med *MC1R* allelene. En hund med *e/e* ved *MC1R* har en kremete, gul eller rød pelsfarge, mens nesehud, øyerender og potene, som har keranisert hud, er enten svarte (se figur 13 a og b venstre), brune (figur 13 c) eller en fortykning av disse. Alt avhengig av *TYRPI*-genotypen (Schmutz, Berryere m. fl. 2002). Slik interaksjon mellom to typer gener som påvirker nese og hårfarge forskjellig ble foreslått lenge før påvisning av genene (Templeton 1977). Uansett så er fortsatt mekanismen for regulering av fenotypen ikke ennå forstått, til tross for at gener og mutasjoner er funnet. Sannsynligvis så påvirker *e/e* keranisert hud annerledes enn pigmentene vi finner i hårrøttene (Schmutz og Berryere 2007).

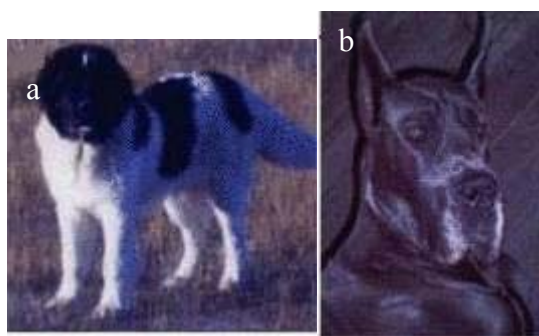


**Figur 13** Samspill mellom *TYRPI* (*B*) og *MC1R*(*e*) (a) fawn fransk Bulldog  $k^{br}/k^y$ ,  $e/e$ ,  $B/B$ ,  $a^y/a^y$ ; (b) (venstre) klar rød miniatyr Dachshund  $k^y/k^y$ ,  $e/e$ ,  $B/B$  (c) gull Vizsla  $K^B/K^B$ ,  $e/e$ ,  $b/b$  (Schmutz og Berryere 2007).

### 1.3.1.4 *Beta-defensin 103 (CBD103)* – svart og brun med innslag av andre farger

Symbolet K er valgt som notasjon for dominant nedarving av fargen svart (Little 1957) og genet er *CBD103* (Candille, Kaelin m. fl. 2007).  $K^B$  koder for svart gjennomfarging,  $k^{br}$  for brindle og  $k^y$  for varierende uttrykk av svart på grunn av samspill med *ASIP*. K er tatt fra den siste bokstaven i det engelske ordet for svart, black (Schmutz og Berryere 2007). Little (Little 1957) postulerte at det for total gjennomfarging av svart var et dominant allel *A*, på *agouti* lokuset, men som nevnt har man ikke funnet dette. Mutasjonen *a* i *ASIP* er et allel som når den nedarves recessivt forårsaker svarte områder på pelsen (Berryere, Kerns m. fl. 2005).

I størstedelen av hunderasene må hundene for å få total gjennomfarging av svart, brun eller grå har minst et av allelene *E* eller  $E^M$  på *MC1R* lokuset, samt det dominante allelet på K-lokuset,  $K^B$  (figur 14 a og b). Total gjennomfarging av svart betyr ikke at hvite flekker kan opptre. Tiltross for at det er allel *B* i *TYRP1* som gir svart farge, og dominante alleler i *MC1R* (*E* eller  $E^M$ ) som gjør det mulig å uttrykke det svarte pigmentet er det allel  $K^B$  som gir en ensfarget svart hund. (Kerns 2005; Candille, Kaelin m. fl. 2007; Kerns, Cargill m. fl. 2007). Genet på K-lokuset er ikke tidligere beskrevet med en funksjon i pigmenteringsprosessen og derfor er mekanismene i dens funksjon av stor interesse blant forskere (Candille, Kaelin m. fl. 2007).



**Figur 14** Hunder med dominant  $K^B$  og *E* for forekomst av sort gjennomfarget pels (a) Landseer Newfoundland  $K^B/K^B$ , *E/E*, *B/B*, *s/s* og (b) Grand Danois  $K^B/-$ , *E/E*, *B/B*,  $a^y/a^y$ , *d/d* (Schmutz og Berryere 2007)

Det finnes også to andre alleler på dette K-lokuset. En enkelt kopi av  $k^{br}$ -allelet sammen med  $k^y$ -allelet er nok til få hunder til å uttrykke fenotypen brindle med innslag av andre farger (Candille, Kaelin m. fl. 2007). Hunder med denne fenotypen har striper med phaeomelanin og eumelanin i varierende mønster (figur 15, neste side). På noen hunder så virker de svarte, da



det er mest eumelanin som ble uttrykt. Hunder med  $k^{br}$  sammen med  $a^y$  har brindlemønsteret over hele kroppen, mens de som har genotypen  $a^l/a^l$  sammen  $k^{br}$  kun har mønsteret på brystet (Berryere, Kerns m. fl. 2005).



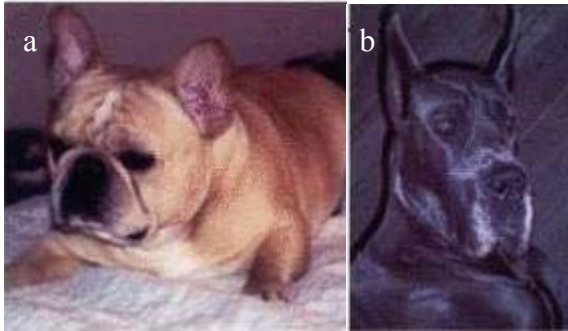
**Figur 15** Brindle Staffordshire Bull Terrier med striper av med phaeomelanin og eumelanin i varierende mønster på grunn av  $k^{br}$ -allelet og mønsteret forekommer over hele kroppen på grunn av  $a^y$ -allelet:  $k^{br}/k^y$ ,  $E/E$ ,  $B/B$ ,  $a^y/a^l$  (Schmutz og Berryere 2007)

Hunder med  $k^y/k^y$  genotypen kan få sin pelsfarge uttrykt som fawn (Figur 16 a og b), ulvegrå eller eumelanin-brun (Figur 16 c og d høyre) alt avhengig av deres genotype på ASIP (Schmutz og Berryere 2007).



**Figur 16** Ulike hunder med  $k^y/k^y$  genotypen og variasjon i ASIP (a) fawn maskert kinesisk Shar-Pei  $k^y/k^y$ ,  $E^M/E$ ,  $B/B$ ,  $a^y/a^y$  (b) fawn italiensk Greyhound  $k^y/k^y$ ,  $E^M/E$ ,  $B/B$ ,  $a^y/a^y$ ,  $d/d$ , (c) Brun og tan Fransk Brittany  $k^y/k^y$ ,  $E/E$ ,  $b/b$ ,  $a^l/a^l$  (b)og (høyre) svart og tan miniatyr Dachshund  $k^y/k^y$ ,  $E/-$ ,  $B/B$ ,  $a^l/a^l$ (Schmutz og Berryere 2007)

Det er utført DNA-tester på noen få raser, eksempelvis Labrador Retriever, kun med *MC1R*-genotyping som har vært vellykket for å anslå forholdet mellom eumelanin- og phaeomelanin-pigmentering. Årsaken til dette er sannsynligvis at rasene er utstyrt med  $e/e$  som er epistatisk til både  $K^B/-$  og  $k^{br}$  (figur 17 a, neste side). På en annen side, i andre raser, slik som Grand Danois (figur 17 b, neste side), er eumelanin og phaeomelanin pigmentering er kontrollert av  $K^B/-$  mot  $k^y/k^y$ , da denne rasen virker å inneholde kun genotypen  $a^y/a^y$  når allelene  $E$  eller  $E^M$  er tilstede (Schmutz og Berryere 2007).



**Figur 17** (a) Fawn fransk Bulldog  $k^{br}/k^y$ ,  $e/e$ ,  $B/B$ ,  $\alpha^y/\alpha^y$ ; (b) blå Grand Danois  $K^B/-$ ,  $E/E$ ,  $B/B$ ,  $\alpha^y/\alpha^y$ ,  $d/d$  (Schmutz og Berryere 2007)

Alle hunder som har pelsfargen svart, brun eller grå, helfarget eller flekkete, arvet som dominant, har minst ett  $E$  eller  $E^M$ -allel. I tillegg har slike hunder også minst ett  $K^B$ -allel (Candille, Kaelin m. fl. 2007; Kerns, Cargill m. fl. 2007).

### 1.3.1.5 Gen som påvirker uttrykket av hovedpelsfarger

Hunder innehar hovedpelsfarger som er kodet fra genene som til nå er nevnt. Disse fargene kan komme i forskjellige utgaver alt avhengig av hvilke andre gener som spiller inn. Oversikten som følger viser gener som påvirker uttrykket av hovedpelsfarger, samt gener som er blitt foreslått som kandidatgener.

#### ***Melanophilin (MLPH) - fortynning av pelsfarge***

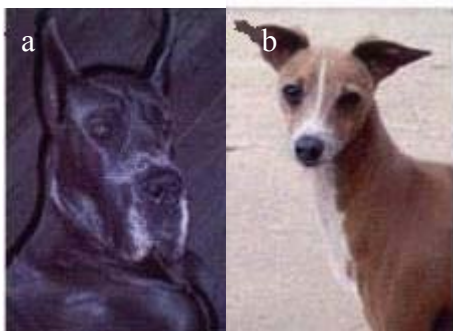
Pelsfargefortynning på hunder, såkalt dilutert (eng. dilute – fortynne) pelsfarge, er karakterisert med en spesifikk pigmentert fenotype og er noen ganger uttrykt sammen med hårtap eller stadig tilbakevendende hudbetennelser, også kalt ”color dilution alopecia” (CDA) (Kim, Kang m. fl. 2005) eller ”black hair follicular dysplasia” (BHFD) (von Bomhard, Mauldin m. fl. 2006). Pelsfargefortynning blir arvet som et mendelsk autosomt recessivt trekk (Schmutz og Berryere 2007). Notasjonen er  $D$  for ikke bleking og  $d$  for bleking (Little 1957).

Bleket fenotype er funnet på hunder som Doberman Pinscher, tysk Pinscher, Large Munsterlanders og Beagles med en co-segregert spesifikk haplotype av genet *Melanophilin (MLPH)* (Philipp, Hamann m. fl. 2005). Man har funnet en SNP i dette genets ekson 2 på blekede Doberman Pinschers, Beagler og Large Munsterlanders, og i ekson 7 til tyske

Pinschere (Philipp, Hamann m. fl. 2005). Ingen mutasjoner i *MLPH* som forårsaker blekede hunder var imidlertid identifisert før en studie av Drogemuller m. fl. (Drogemuller, Philipp m. fl. 2007). De identifiserte en SNP innen ekson 1 som viste perfekt assosiasjon til fortynnet pelsfargefenotype hos 65 individer av hund fra 7 forskjellige raser. Disse resultatene gir foreløpige støtte til at denne rapporterte *MLPH*-mutasjonen kan være den forårsakende mutasjonen for pelsfargefortynning hos hunder (Drogemuller, Philipp m. fl. 2007). En eller flere mutasjoner i *MLPH* gjør at pigmentet klumper seg i melanocytene og som gjør at pigment avgis ujevnt. Ujevn fordeling av pigment i hårstråene gir redusert lysabsorpsjon og dermed et lysere utseende. Blekede hunder har trolig like mye pigment som normale hunder, men pigmentet klumper seg og det gir et fortynnet utseende. Fortynningsallelet *d* påvirker fargen i både pels og hud (Philipp, Hamann m. fl. 2005).

Blå blir også brukt til å angi tilsvarende fenotype i andre raser. Disse blå individene kan være født grå, mens i andre raser har det tatt måneder med en overgang fra svart til grå (Schmutz and Berryere 2007). Denne typen fargeutvikling ble av forskere tidligere kalt progressiv gråing og ble plassert på G lokuset (Little 1957). Nå antas genet å være lokalisert D lokuset (Schmutz and Berryere 2007).

Flere hunderaser har individer som er grå eller fortynnet i pelsfargen (Figur 18 a og b).



**Figur 18** (a) blå Grand Danois  $K^B/-$ ,  $E/E$ ,  $B/B$ ,  $\alpha^y/\alpha^y$ ,  $d/d$  og (b) dilute fawn italiensk Greyhound  $k^y/k^y$ ,  $E^M/E$ ,  $B/B$ ,  $\alpha^y/\alpha^y$ ,  $d/d$  (Schmutz og Berryere 2007)

Noen få raser har forskjellige former for utvikling av gråfarge, noen Grand Danois og alle Weinmaraner er født blå eller bleket, mens Kentucky Blue Terrier og Old English Sheepdog er født svarte og lysner i pelsen etter hvert som de blir voksne. Begge disse arvede trekkene omhandler modifisering av områder med eumelanin og phaeomelanin, uten at *d* er representert (Figur 19 a, neste side) (Schmutz og Berryere 2007).



**Figur 19** (a) Kerry Blue Terrier som lysner i pelsen etter som den blir eldre, uten å ha dilute-allelet  $d$ :  $K^B/K^B$ ,  $E^M/E$ ,  $B/B$ ,  $D/D$ ,  $G/G$ ; (b) Bleket fawn italiensk Greyhound  $k^y/k^y$ ,  $E^M/E$ ,  $B/B$ ,  $a^y/a^y$ ,  $d/d$  (Schmutz og Berryere 2007)

Dominant røde (fawn) hunder med en maske av eumelanin er lettere å observere hvis de har  $d$  fordi deres maske er grå istedenfor svart. Blekede lyse hunder har en kullfarget nese og poter (Figur 19b) istedenfor svart (Schmutz, Berryere m. fl. 2003). Hunder med  $e/e$  genotypen på *MC1R* (Newton, Wilkie m. fl. 2000) eller hunder som har en rød fenotype har vært vanskelig å anslå som bleket (Philipp, Hamann m. fl. 2005). Hunder som er brune og bleket, slike som Whippets og Greyhound, har grå striper på en blekbrun bakgrunn. Hunder som Weinmarans, som har mutasjoner i begge allel som forårsaker brun på *TYRP1* og  $d/d$  er brunbleke (Schmutz, Berryere m. fl. 2002). Nese og poter på slike hunder er også blekbrune. Noen hunder som kinesisk Shar-Pei hunder blir karakterisert som lilla og i Doberman Pinschers, kalles de Isabella (Schmutz og Berryere 2007).

### Progressiv gråing

Little (Little 1957) hadde en hypotese om at hunder med progressiv gråing hadde en mutasjon som skilte seg fra allelet som han hadde gitt notasjonen  $d$  på D-lokuset. Gråingen begynner på forskjellige deler av pelsen og ved forskjellige alder hos hunder som viser progressiv gråing. Notasjonen er  $G$  for gråing og  $g$  for ikke gråing (Little 1957). Noen hunder reagerer på vaksiner eller hudskader som får pelsen til å gå tilbake til ungpelsfarge, men over tid vil denne pelsen igjen endre seg og lysne (Schmutz og Berryere 2007). Dette passer med Little hypotese (Little 1957) om at progressive gråing er kontrollert av et separat lokus han kalte  $G$  lokus (figur 19 a). Uansett er ingen lokalisering av dette lokuset blitt gjort.

## Hvite og/eller kremfargede

En rekke hunderaser er født hvite eller med kremfarget pels, samtidig som de har pigmentert nesehud og poter. Dette er et eksempel på at migrasjon av pigmenter inn i pels og keranisert hud ikke er kontrollert av de samme genene (Schmutz og Berryere 2007). Et eksempel på en rase er Samoiedhund. I en studie av Kerns m. fl. (Kerns, Cargill m. fl. 2007) sjekket man genotypen til noen Samoiedhunder og alle hadde  $e/e$  på *MC1R* og  $a/a$  på *ASIP*. Også andre hvite raser er genotypet og alle hadde  $e/e$  på *MC1R*. Hunderasene inkluderer Akita, Shar-Pei, Poodle, Puli, Schäferhund, Caucasian Mountain Dog og Miniature Schnauzer. Noen individer kan kalles kremfargede, da litt phaeomelanin pigment finnes, ofte på ørene. På Akita hadde ingen individer med  $E$  eller  $E^M$  kremfarge, selv om noen var lyserød på grunn av  $a^y/-$  genotypen. Dette indikerer at et gen bare bleker individer med  $e/e$  genotypen. I Akita, Puli, Schäferhund, Caucasian Mountain Dog og Miniature Schnauzer finnes ingen rødlige individer til tross for at  $e/e$  genotypen finnes, noe som indikerer at disse rasene er fiksert for allelet som bleker (Schmutz, Berryere m. fl. 2007).

I raser som blant andre Labrador Retriever og Golden Retriever, er alle hundene som er pigmentert med phaeomelanin  $e/e$  ved *MC1R*. Disse hundene varierer fra gull-gul til mer kremete farge, ingen er hvite (Schmutz og Berryere 2007).

Det første genet som er rapportert å bleke bare phaeomelanin er *Solute carrier family 7, member 11 (SLC7A11)* (Chintala, Li m. fl. 2005). I studier av familier med disse fargene Schmutz m. fl. (Schmutz og Berryere 2007) virker det som om trekkene er nedarvet autosomt recessivt. Kremetfargen ble ikke nedarvet sammen med polymorfismen i *TYRP1*, heller ikke *Solute carrier family 45, member 2 (SLC45A2)*.

Likevel er det funnet individer, slik som Afganske Mynder og Pudler, som har  $E$  og  $E^M$  på *MC1R*. Den genetiske mekanismen som kontrollerer denne hvitfargingen er ikke kartlagt (Schmutz og Berryere 2007).

## Flekker eller mønster i pelsen

Det er gjort forskning for å finne ut hvilke gener som koder for flekker i pelsen på hund. Både genene *Endothelin reseptor B (EDNRB)* og *Type III reseptor tyrosine kinase (KIT)* er ekskludert som årsaken til hvite områder, slik som på Border Collie og Boxere (Metallinos og Rine 2000; van Hagen, van der Kolk m. fl. 2004).

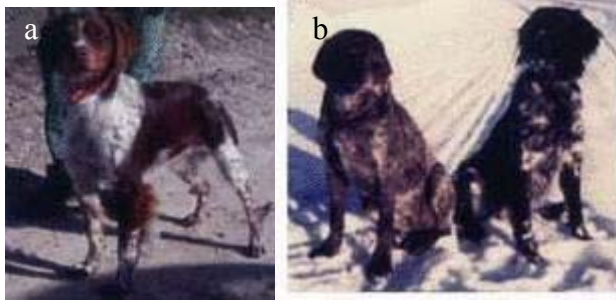
### ***Microphthalmia-assosiert transkriptor faktor (MITF) - tilfeldige hvite flekker***

Genet *Microphthalmia-assosiert transkriptor faktor (MITF)* er koblet mot tilfeldige hvite flekker på pelsen. S er valgt som notasjon etter Little (Little 1957). Homozygot S gir helfarget ikke hvit pels, mens kombinasjoner av  $S$ ,  $s^i$ ,  $s^p$  og  $s^w$  (i-irsk flekkete, p-piebald og w-ekstrem hvit) gir hvite flekker (Rothschild, Van Cleave m. fl. 2006; Karlsson, Baranowska m. fl. 2007). I en studie av Rothschild m. fl. (Rothschild, Van Cleave m. fl. 2006) ble Beagler krysset med Newfoundlandshund og det ble funnet en fullstendig co-segresjon mellom en SNP i intron 3 i *MITF* og recessivt nedarvet tilfeldig hvite eller piebald flekker. Studien ekskluderte seks andre kandidatgener. I en studie av Karlsson m. fl. (Karlsson, Baranowska m. fl. 2007) er dette genet også påvist på hunder med hvite flekker. Genet, *MITF*, er lokalisert til CFA20. I studien ble Boxere, Bull Terrier, Dalmatinere og Cavalier King Charles Spaniels brukt (Karlsson, Baranowska m. fl. 2007).

Mutasjoner i *MITF* påvirker melanoblastoverlevelsen negativt derfor kan mangel på pigmenter eller hvite områder på grunn av manglende melanocytter være et forventet resultat (Bismuth, Maric m. fl. 2005). Flere utgaver av *MITF* er blitt beskrevet i arter som mus og menneske (Udono, Yasumoto m. fl. 2000).

Flekkene i Boxere er ofte ansett å sammenfalle med co-dominat arvemønster: ingen hvite ( $S/S$ ), hvite underside og hvitt ansikt ( $S/s$ ), predominat hvit ( $s/s$ ). (Rothschild, Van Cleave m. fl. 2006; Karlsson, Baranowska m. fl. 2007). I dette eksemplet er det ikke tatt hensyn til hvilke utgaver av  $s$  vi har med å gjøre fordi Little (Little 1957) foreslo variasjoner innen disse allelene som kunne gjøre det vanskelig å anslå nøyaktig fenotype. Pape (Pape 1990) foreslo at andre gener var med på å regulere denne fenotypen. Videre arbeider vil avgjøre hvor mange allel av  $s$ -typen som er inne i bildet i forhold til hvite flekker på pelsen, og om det også er andre gen som er inne i bildet i modifiseringen av fenotypen.

Ticking er veldig små prikker på hvit bakgrunn (figur 20 a, b, høyre).



**Figur 20** (a) Brun og tan Fransk Brittany  $k^y/k^y$ ,  $E/E$ ,  $b/b$ ,  $a^l/a^l$ ; og (b) (venstre) brun tysk korthåret Pointer  $K^B/K^B$ ,  $E/E$ ,  $b/b$  (høyre) svart Large Munsterlander  $K^B/K^B$ ,  $E/E$ ,  $B/b$  (Schmutz og Berryere 2007)

Disse er ikke tilstede ved fødsel, men opptrer etter noen uker. Det er ikke noen tilgjengelig studie på dette fenomenet (Schmutz og Berryere 2007). Noe data er presentert som foreslår at genet assosiert med a-typisk produksjon av urin istedenfor allantoin forårsaker mønsteret (Safra, Schaible m. fl. 2006).

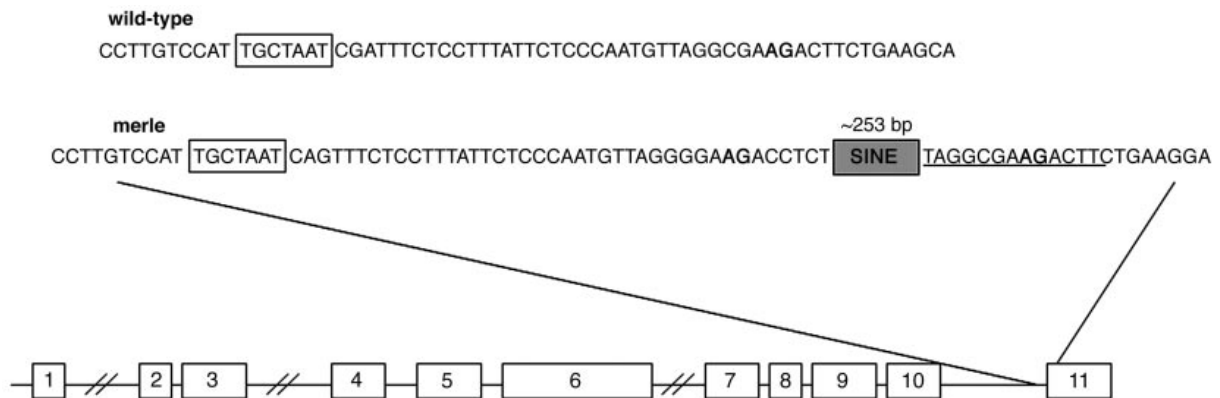
Roan er et mønster som består av blandede hår som enten er pigmentert eller ikke pigmentert (figur 20 (b) venstre). Roan kan også opptre på hunder med ticking. Det er foreslått at det arves som et recessivt trekk (Schmutz og Berryere 2007). Det er satt spørsmål ved om roan egentlig er et separat mønster fra ticking (Little 1957). I kveg er roan satt i sammenheng med mutasjon i *KIT ligand (KITLG)* (Seitz, Schmutz m. fl. 1999). Schmutz m. fl. (Schmutz og Berryere 2007) har gjort studier men ingen co-segregering mellom *KITLG* og roan eller ticking er funnet.

### Merlet pels



**Figur 21** Merlet Australsk Gjeterhund  $k^y/k^y$ ,  $E/E$ ,  $B/B$ ,  $a^l/a^l$ ,  $M/m$  (Schmutz og Berryere 2007)

Merlet pels (figur 21, forrige side) kommer av et ”Short interspersed nuclear element” (SINE) og en rekke med thymidine-nukleotider i intron 10/ekson 11 i sølvgenet, *Silver* (*SILV*) (figur 22) (Clark, Wahl m. fl. 2006).



**Figur 22** Strukturen til villtype SILV og merle med SINE sekvensen som er satt inn i intron 10/ekson 11. Gjennomsnittlig lengde på insersjonen er på 253 bp (Clark, Wahl m. fl. 2006).

Dette allelet er kjent som *M* (dominant) av Little (Little 1957). Før lokalisering av denne sekvensen ble det postulert at merlet pels kom av et transposert element, da oppdrettere hadde fått avkom som hadde merlet pels tross for at ingen av foreldrene hadde denne pelstypen (Sponenberg 1985). Forskere har lokalisert merlet pels til CFA10 (Hedan, Corre m. fl. 2006). Flere hundeoppdrettere anser at de har hunder som produserer valper med merlet pels, selv om de faktisk ikke har det, og disse blir kalt kryptisk merlete eller fantom merlete. Årsaken til dette kan komme av et SINE element uten en rekke med thymidiner (Clark, Wahl m. fl. 2006).

Schmutz m. fl. (Schmutz og Berryere 2007) har kartlagt SINE i hunder som ikke er merlete, et eksempel er en trikolor Shetland Sheepdog som fikk syv avkom, hvor ingen var merlete.

Siden merlet pels er mørkere i eumelanin områder omgitt av lysere områder, og hunder med *e/e* genotypen i *MC1R* ikke produserer noe eumelanin pigmenter i pelsen, kan ikke slike hunder utrykke noen merlet fenotype til tross for at de bærer mutasjonen for merlet pels (Schmutz og Berryere 2007).



## Harlequinpels

Harlequin er mønsteret som finnes i Grand Danois som består av fillete svarte lapper på hvit bakgrunn (figur 23).



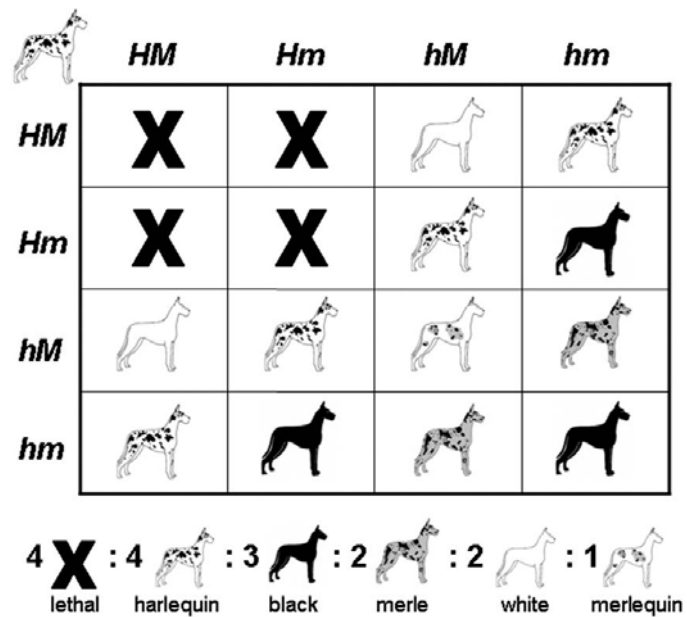
**Figur 23** Grand Danois med harlequin pels (<http://klassikdog.dogstudio.su>)

Sponenberg (Sponenberg 1985) postulerte at for å få harlequin-mønsteret måtte hunden ha en kopi av merlemutasjonen og en kopi av en annen mutasjon, kalt H (Harlequin). Det ble bekreftet at Harlequin på Grand Danois hadde minst en kopi av merlemutasjonen (Clark, Wahl m. fl. 2006). Videre studier på kandidatgener har ekskludert *MITF* og *endothelin receptor type B (EDNRB)*, mens *Paired box 3 (PAX3)* co-segrerte med Harlequin (Schmutz og Berryere 2007).

I en studie av Clark m. fl. (Clark, Starr m. fl. 2008) ble 45 Grand Danois fra 5 ulike familier genotypet for 280 mikrosatellitt-markører i en screening av hele genomet. En telomerisk markør på enden av kromosom 9 ble sjekket videre for kobling mot Harlequin. Detaljert kartlegging av denne regionen ved hjelp av nye markører og 10 Grand Danois fra en sjetten familie konkluderte med at Harlequin-lokuset ligger i en 3.27 Mb region på kromosom 9, som inneholder rundt 20 gener. Denne regionen innehar synonyme områder med menneskelig kromosom 9q, og var fra tidligere ikke satt i sammenheng med pelsfarge (Clark, Starr m. fl. 2008).

Alle hundene i studien til Clark m. fl. (Clark, Starr m. fl. 2008) var heterozygote for Harlequin kromosomet, noe som støtter hypotesen om at H-lokuset kan være dødelig ved homozygot

tilstedeværelse (figur 24) (Sponenberg 1985). Dette gir følgende resultat ved ulike kombinasjoner av Merle- og Harlequin-allelene:



**Figur 24** Punnett square som viser fenotypiske pelsfarger ved avl mellom hunder med harlequin- og merle-allel. Homozygot for *H* er muligens dødelig (Clark, Starr m. fl. 2008).

## 1.4 Gener og adferd

Opp gjennom årene har det blitt lansert ulike kandidatgener for avvikende adferd som schizofreni, ADHD og risikorelatert adferd hos mennesker. Kandidat-genene har inkludert *Dopamin receptor D4 (DRD4)*, *Monoamine oksidase A (MAOA)*, *Monoamine oksidase B (MAOB)*, gen innen serotoninfunksjonen og *Catechol o-methyl transferase (COMT)* (Klinteberg, Levander m. fl. 1987; Noble, Ozkaragoz m. fl. 1998; Benjamin, Osher m. fl. 2000; Gingrich og Hen 2001 ; Caspi, McClay m. fl. 2002).

*DRD4* som koder for reseptorer av neurotransmittersubstansen dopamin er lengdepolymer og er ved lange utgaver hos mennesker blant annet assosiert med risikorelatert adferd (Noble, Ozkaragoz m. fl. 1998). *MAOA* og *MAOB* koder for enzymene monoamine oksidase A og B, enzymer som bryter ned monoaminer som dopamin. Hos mennesker er mutasjoner i *MAOA* kombinert med omsorgssvikt antatt å gi betydelig økt risiko for kriminell løpebane (Caspi, McClay m. fl. 2002), og lave mengder *MAOB* i blodet er satt i sammenheng med blant annet sensasjonssøkende adferd (Klinteberg, Levander m. fl. 1987). Serotonin-gener, som koder for neurotransmittersubstanser, spiller en sentral rolle i regulering av blant annet frykt, angst, aggresjon og søvnkontroll hos mennesker (Gingrich og Hen 2001). Mutasjoner innen *COMT*, som koder for enzymer som inaktiverer blant annet dopamin er satt i sammenheng med schizofreni hos mennesker (Benjamin, Osher m. fl. 2000).

Disse genene er også blitt isolert og sekvensert hos hund og noen av dem (*DRD4* og serotonin-gener) er studert i forhold til adferd på hund (Niimi, Inoue-Murayama m. fl. 1999; Niimi, Inoue-Murayama m. fl. 2001; Hashizume, Suzuki m. fl. 2003; van den Berg, Versteeg m. fl. 2003; Ito, Nara m. fl. 2004; Masuda, Hashizume m. fl. 2004; van den Berg, Imholz m. fl. 2004; Hashizume, Masuda m. fl. 2005; van den Berg, Kwant m. fl. 2005; Hejjas, Vas m. fl. 2007 ; Lee, Kim m. fl. 2008; Vage og Lingaas 2008; van den Berg, Vos-Loohuis m. fl. 2008). Kun noen utgaver av *DRD4* viste assosiasjon med adferdstypene impulsiv adferd og aggresjonsrelatert adferd (Ito, Nara m. fl. 2004; Hejjas, Vas m. fl. 2007). Fire gener innen serotoninfunksjonen er sjekket i forhold til aggressiv adferd; *serotonin receptor 1A (htr1A)*, *serotonin receptor 1B (htr1B)*, *serotonin receptor 2A (htr2A)* og *serotonin transportgenet (slc6A4)*. Koblingsanalyser på Golden Retrievere med ulik grad av aggressiv adferd fant ingen bevis for at disse genene er koblet til aggresjon (van den Berg, Versteeg m. fl. 2003; van den

Berg, Imholz m. fl. 2004; van den Berg, Kwant m. fl. 2005; van den Berg, Vos-Loohuis m. fl. 2008).

I denne mastergradsoppgaven er *DRD4*, *MAOB* og *COMT* genotypet og sjekket mot spørreskjema validert for kartlegging av adferd relatert til Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) på hund. Adferdsfenotypen er kartlagt gjennom endofenotyping.

### **Endofenotyping**

Nyere forskning tar sikte på å identifisere den såkalte endofenotypen. Dette er en mellomliggende struktur eller karakteristikk som ligger mellom adferd og biologisk basis for en fenotype. Ideen er at endofenotyper vil gjøre det enklere å få kunnskap om det genetiske grunnlaget og hjelpe til å klargjøre klassifisering og diagnostisering av adferden. Målet er å karakterisere komponenter, ofte komplekse trekk, som er genetisk bestemt ved hjelp av fortrinnsvis tall. Dette er en framvoksende del av genetiske assosiasjonsstudier. Man håper å finne komplekse genetiske årsaker til multifaktorbaserte fenotyper, slik som psykiatriske lidelser (Hejjas, Vas m. fl. 2007).

Her følger en gjennomgang av genene denne mastergradsoppgaven har genotypet, endofenotypet og evaluert i forhold til adferd:

#### **1.4.1 Dopaminreseptor-D4 (*DRD4*)**

*DRD4* koder for reseptorer som mottar neurotransmittersubstansen dopamin (Van Tol, Bunzow m. fl. 1991). Dopamin ble kunstig framstilt i 1910 (Barger og Dale 1910). Dopamin ble karakterisert som et svakt efedrinlignende stoff. Lite ble så gjort med oppdagelsen før man oppdaget at enzymet aromatic-L-amino-acid decarboxylase omdanner levodopa (L-dopa) til dopamin (Holtz og Westermann 1956) og at dopamin ble fastslått til å være en neurotransmitter i sentralnervesystem (Carlsson 1959). Dopamin ble da satt i sammenheng med bevegelseskontroll hos mennesker da man fant en sammenheng mellom lave dopaminmengder i sentralnervesystemet og bevegelsesproblemer hos pasienter rammet av Parkinsons sykdom (Bernheimer og Hornykiewicz 1965). En rekke forskingsprosjekter ble igangsatt etter denne oppdagelsen, og resultatene fra disse prosjektene har ført til en rekke terapeutiske behandlinger av Parkinsons sykdom som for eksempel L-DOPA terapi (Bernheimer, Birkmayer m. fl. 1973).

I dag vet vi at dopamin er involvert i en rekke nevrologiske og psykiatriske sykdommer, som for eksempel schizofreni og ADHD hos mennesker. Dopamin er også sentral i hjernens belønningssystem og i virkning av narkotiske stoffer (Di Chiara og Bassareo 2007). Selv om dopaminneuroner står for kun 1 % av hjernes totale mengde neuroner så har stoffet en stor innvirkning på hjernens funksjon (Bjorklund og Dunnett 2007). Effekten man får når dopamin binder seg til sine reseptorer er satt i sammenheng med innlæring og hukommelse hos mennesker (Kandel 2001).

Forskning indikerer også at dopamin er involvert i belønningsrelatert læring, det vil si at dopamin blir frigjort når en belønning mottas på grunn av at en oppgave er løst eller innlært (Miller, Wickens m. fl. 1990; Berridge og Robinson 1998; Pessiglione, Seymour m. fl. 2006). Det er fortsatt mye uklart om hvordan dopamin influerer på adferdsvalg knyttet til belønning (Arias-Carrion og Poppel 2007). I tillegg så er lave nivåer av homovanilic syre (HVA), en metabolitt fra omdanning av dopamin, i ryggmargsvæsken hos hunder, tenkt å ha en sammenheng med adferd som impulsiv aggresjon hos hund (Reisner, Mann m. fl. 1996).

*DRD4* er polymorf i flere regioner, og det er funnet sammenhenger mellom disse polymorfismene og psykiatriske lidelser og søken etter ukjente opplevelser (Catalano, Nobile m. fl. 1993; Benjamin, Li m. fl. 1996; Ebstein, Novick m. fl. 1996; LaHoste, Swanson m. fl. 1996; Ebstein, Segman m. fl. 1997). Til tross for dette så er det også gjort forskning som ikke viser noen sammenheng mellom disse polymorfismene og psykiatriske lidelser (Vandenbergh, Zonderman m. fl. 1997; Castellanos, Lau m. fl. 1998). Sammenhenger mellom *DRD4* og søken etter ukjente opplevelser er videre dokumentert i studier av genmodifiserte mus (*DRD4* -/-) som mangler genet i begge alleler. Disse reagerer mindre mot søken etter ukjente opplevelser enn villtypemus (*DRD4* +/+) (Dulawa, Grandy m. fl. 1999). En slik sammenheng kan man kanskje finne hos andre pattedyr, slik som den oppgavens modelldyr, hund.

Polymorfismer i blant annet ekson III regionen i *DRD4* er kartlagt hos hund. Det er identifisert 8 alleler med ulike lengder og allelnavnet er det samme som lengden i bp: 396, 435, 447a, 447b, 486, 498, 549 og 576. De 7 første ble kartlagt i 1999 og 2001 (Niimi, Inoue-Murayama m. fl. 1999; Niimi, Inoue-Murayama m. fl. 2001). Den åttende polymorfismen ble kartlagt av Ito m. fl. (Ito, Nara m. fl. 2004). Polymorfismene er enten insersjoner eller delesjoner av 12 bp og 39 bp enheter. I *DRD4*-allelene med lengde 447 bp finnes to utgaver på grunn av en baseparsubstitusjon, 447a og 447b (Niimi, Inoue-Murayama m. fl. 1999). Det er også funnet polymorfismer i ekson I regionen i *DRD4*, det vil si i alt 2 allel (Ito, Nara m. fl.

2004). Videre er det også kartlagt arter innen rovdyr (Carnivora), hvor det kun hos hundedyr (Canidae) er funnet polymorfismer i ekson III hos *DRD4* (Inoue-Murayama, Matsuura m. fl. 2002). Dette indikerer at denne formen for polymorfisme ikke er spredt utover i ordenen rovdyr.

Forskere (Niimi, Inoue-Murayama m. fl. 1999) har funnet ut at korte utgaver av ekson III i *DRD4*-genet er mest vanlig hos rolige hunderaser som Golden Retriever og at den aggressive hunderasen Shiba har lange utgaver. Likevel har det også vist seg at dette kommer av genetiske forskjeller mellom anglo-amerikanske raser (eks. Golden Retriever) og asiatiske raser (eks. Shiba) (Parker 2006)

Ito m. fl. (Ito, Nara m. fl. 2004) sjekket også de ulike lengdepolymorfismene opp mot aggresjonsrelatert adferd hos hund. Deres konklusjon var at 396, 435 og 447a kunne knyttes til mindre aggresjonsrelatert adferd enn 447b, 486, 498, 549 og 576. Signifikant forskjell i impulsiv adferd er avdekket i en studie av Schäferhunder som var dressert for å være politihunder, de med 447a hadde signifikant høyere grad av impulsiv adferd enn de med 435 (Hejjas, Vas m. fl. 2007).

#### **1.4.2 Monoamin oksidase B (MAOB)**

*MAOB* koder for enzymet MAOB som oksiderer dopamin og andre monoaminer. Enzymet finnes både i hjernen og perifert vev. I hundens hjerne er MAOB fortrinnsvis lokalisert i hypotalamus og hippocampus (Hashizume, Suzuki m. fl. 2003).

I studier på mennesker er sammenhenger mellom lave nivåer av blodcelle-MAOB-aktivitet og spesifikke personlighetstrekk slik som sensasjonssøken, unngåing av monotone aktiviteter, impulsivitet og aggressiv adferd blitt registrert (Klenteberg, Levander m. fl. 1987; Orelan og Hallman 1995; Garpenstrand, Norton m. fl. 2002).

Humant har man funnet en SNP lokalisert på intron 13 i *MAOB* som er satt i sammenheng med MAOB-aktivitet i hjernen (Balciuniene, Emilsson m. fl. 2002) og i blodceller (Garpenstrand, Norton m. fl. 2002).

Man tror at MAOB spiller en viktig rolle i oksidasjon av monoaminer sammen med co-faktoren Flavin Adenine Dinucleotide (FAD) (Shih, Chen m. fl. 1999), og det avgjørende område for binding av FAD er antatt å være mellom den 62. og den 103. aminosyren etter methionin hos mennesker (Gottowik, Malherbe m. fl. 1995). Tidligere studier har

dokumentert at bindesete for FAD er det samme hos hunder som hos mennesker (Hashizume, Suzuki m. fl. 2003). Aminosyresubstitusjonen som SNPen forårsaker tror man ligger på den 67. aminosyrekodonet, et område som sannsynligvis er viktig for FAD-binding. Ved SNPen i dette området får man utbytting av aminosyren i proteinet som gjør at MAOB ikke oksiderer monoaminer like effektivt (Hashizume, Masuda m. fl. 2005).

I studier er signifikante forskjeller i fordeling av polymorfismer av *MAOB* mellom hunderaser observert. I en studie av Hashizume m. fl. (Hashizume, Masuda m. fl. 2005) identifiserte de en SNP (T199C) på ekson III på hundens *MAOB*. *MAOB* sitter på X-kromosomet, det vil si at tisper (XX) har to alleler, mens hanner (XY) kun har et allel. I alt fem hunderaser ble kartlagt og mer enn 90 % av Golden Retrieverne var bærere av villtypen mens mer enn 83 % av Miniatur Schnauzere var bærere av polymorfismen (Hashizume, Masuda m. fl. 2005). Slik variasjon er tidligere dokumentert på grunn av selektive oppdrett ved studier av *DRD4* (Niimi, Inoue-Murayama m. fl. 2001). Basert på disse resultatene tror man at SNPen, inkludert *MAOB*, følger spesifikke hunderaser som er avlet fram ved målrettet oppdrett, men videre studier må gjøres (Hashizume, Masuda m. fl. 2005).

### **1.4.3 Catechol O-Methyltransferase (COMT)**

*COMT* koder for enzymet COMT som inaktiverer blant annet dopamin og catechol-inneholdende medikamenter slik som L-dopa. Den vanlige genetiske polymorfismen Val158Met i det menneskelig *COMT* er satt i sammenheng med økt risiko for schizofreni (Benjamin, Osher m. fl. 2000).

I en studie av Masuda m. fl. (Masuda, Hashizume m. fl. 2004) gjort på hunders *COMT* (Golden Retriever, Labrador Retriever, Maltese, Miniatur Schnauzer, Shiba) fant man ut at likhetsforholdet mellom hunders *COMT* og mennesket, mus og rotte var på henholdsvis 84 %, 82 % og 82 %. Man fant 3 SNPen i det kodende området, og disse SNPene inkluderte guanine til adenine substitusjon på det 39. nukleotidet (G39A), guanine til adenine substitusjon på det 216. nukleotidet (G216A) og guanine til adenine substitusjon på 482. nukleotidet (G482A). Homozygot for villtypene var dominant i alle hunderasene, men polymorfismene var i større grad tilstede i Labrador Retriever og Miniatur Schnauzer (Masuda, Hashizume m. fl. 2004).

Masuda m. fl. (Masuda, Hashizume m. fl. 2004) slo fast at *COMT* på hund er svært homologt med *COMT* hos andre arter. De mente derfor at *COMT* er et viktig enzym som er konservert gjennom pattedyrenes evolusjon.

Polymorfismen G216A i *COMT* er en stille mutasjon som ikke fører til noen aminosyresubstitusjon i proteinet *COMT* koder for. Forskning har vist at slike stille mutasjoner kan ha sammenheng med personlighetsforstyrrelser og mentale sykdommer (Lappalainen, Long m. fl. 1998; Manuck, Flory m. fl. 1999; Tan, Chong m. fl. 2001; Kranzler, Hernandez-Avila m. fl. 2002). I disse artiklene ble det antatt at slike stille mutasjoner grunnet koblingsulikevekt, kan være assosiert med andre gener som har sammenheng med adferd. Det at studerte dyr hos Masuda m. fl. (Masuda, Hashizume m. fl. 2004) som har A i *COMT G216A* også ofte hadde A i *COMT G482A*, støtter denne spekulasjonen. G216A er lokalisert i en  $\alpha$ -heliks-region, som inneholder et bindeområde for et co-enzym til *COMT*, S-adenosyl-L-methionine (SAME). Effektiviteten av bindingen kan muligens påvirkes av ulike utgaver av G216A (Masuda, Hashizume m. fl. 2004).



## 2 Material og metode

Studiepopulasjonen i denne mastergradsoppgaven bestod av 139 individer fra 6 ulike hunderaser. Disse var fordelt på 84 Samojedhunder, 11 Leonbergere, 11 Rottweilere, 10 Flatcoated Retrievere, 10 Welsh Corgi Pembroke og 13 Golden Retrievere.

**Tabell 4** Oversiktstabell med beskrivende statistikk på individene som deltok i mastergradsoppgaven

	<b>Samojedhund</b>	<b>Leonberger</b>	<b>Rottweiler</b>	<b>Flatcoated Retriever</b>	<b>Welsh Corgi Pembroke</b>	<b>Golden Retriever</b>
	n = 84	n = 11	n = 11	n = 10	n = 10	n = 13
Egenskaper						
Hannkjønn <sup>1,2</sup>	39 (46 %)	4 (36 %)	7 (64 %)	6 (60 %)	2 (20 %)	4 (31 %)
Hunnkjønn <sup>1,2</sup>	37 (44 %)	7 (64 %)	4 (36 %)	4 (40 %)	8 (80 %)	9 (69 %)
Alder ved innsamling <sup>3,4,7</sup>	7.40±2.27	2.88±2.25	2.55±1.91	1.86±1.00	3.99±4.04	3.10±2.72
Familiehund <sup>5,6,7</sup>	37	10 (2)	7	8 (2)	10 (6)	10 (2)
Kennelhund <sup>5,6,7</sup>	1	2 (2)	4	4 (2)	6 (6)	5 (2)
Oppmerksomhets- sviktscore <sup>6,7</sup>	5.03 ± 4.47	4.64±1.96	3.73±1.49	4.14±1.96	4.10±1.91	2.92±2.66
Impulsiv adferd score <sup>6,7</sup>	3.08 ± 2.86	2.72±2.05	2.91±1.92	3.50±1.35	2.90±1.20	2.31±2.02

1 Mangler informasjon hos noen av hundene (8 Samojedhunder i forhold til kjønn)

2 Det er ingen signifikant forskjell mellom antall hanner og hunner mellom rasene (P=0.202)

3 Alder på samojedhunden ved gjennomføring av spørreundersøkelse

4 Det er signifikant forskjell i alder på Samojedhunder og de andres alder (P=0.003)

5 Noen har svart både familiehund og kennel – (2) betyr 2 eiere har svart begge

6 Det er signifikant forskjell på antall familiehunder og kennelhunder (P=0.01)

7 38 av Samojedhundene ble kartlagt i forhold til adferdskjema

Her følger en kort presentasjon av hunderasene denne mastergradsoppgaven har foretatt genetiske undersøkelser på. For mer inngående informasjon om rasene se Adlercreutz (2003).

### **Samojedhund**

Samojedhund er opprinnelig en nordsibirsk hund, hvor den ble brukt som trekkhund, gjeterhund og vakthund. Den er utviklet til den hunden den er i dag for det meste i England, samt at USA og andre land i Europa har bidratt i avlen. Den er en kort, rett rektangulær polar spisshund. Den er sterk,



**Figur 25** Samojedhund  
(www.rajuma.com)

elegant, bevegelig, rolig og selvsikker. Fargen på pelsen varierer mellom hvit fløtefarget eller ren hvit grunnfarge med svakt lysebrune tegninger. Mankehøyde på hann er 57 cm (+/- 3 cm), mens tisper er 53 cm (+/- (cm))(Adlercreutz 2003).

### **Leonberger**

Leonberger kommer fra Tyskland. Den er opprinnelig avlet fram for å likne løve (leon), som dyremotivet i byvåpenet til byen Leonberg. Det er en stor, sterk hund med vennlig temperament. Pelsfargen ligger i et spekter fra løvegul, gyllen til rødbrun, med sort eller mørk maske. Mørke hårspisser



**Figur 26** Leonberger  
(www.canis.no)

forekommer. Mankehøyden hos hannen mellom 72 – 80 cm og tisper 65-75 cm (Adlercreutz 2003).

## Rottweiler

Rottweileren kommer fra Tyskland. Opprinnelige bruksområder er driving av buskap og



**Figur 27** Rottweiler  
([www.rotweiler411.com](http://www.rotweiler411.com))

beskyttelse av eierne. Senere er den anerkjent som politihund i Tyskland. Den er både en respektinngytende hund og en god familiehund. Den er mellomstor, med romlig brystkasse og har

kraftige utholdende bevegelser. Pelsfargen er sort med godt avgrensede rødbrune tegninger på kinn, snute, underside av hals, bryst og ben, samt over øyne og under hale. Mankehøyden hos hannen er 61-68 cm og hos tisper 56-63 cm (Adlercreutz 2003).

## Flatcoated Retriever



**Figur 28** Flatcoated Retriever  
([www.canis.no](http://www.canis.no))

Flatcoated Retrieveren kommer fra Storbritannia. Den ble opprinnelig avlet fram som ren fuglehund, for apportering av skutt fugl. Den er tillitsfull, glad og vennlig. Hunden er mellomstor, elegant, aktiv og

livlig, med naturlige jakthundegenskaper. Pelsfargen er sort eller leverfarget. Mankehøyden for hannhund er 58 – 61 cm, mens den for tisper er 56-59 cm (Adlercreutz 2003).

## Welsh Corgi Pembroke

Welsh Corgi Pembroke kommer fra Storbritannia. Den er avlet fram som en allround



**Figur 29** Welsh Corgi Pembroke  
([www.canis.no](http://www.canis.no))

gårdshund, som etter hvert ble spesialisert til gjeterhund. Den er kraftig, robust, lavstilt og gir et inntrykk av mye kraft og utholdenhet. Pelsfargen er ensfarget rød, sobel, sandfarget, svart og tan, eventuelt med hvite tegninger på ben, bryst og hals. Noe hvitt på hode og snute forekommer. Mankehøyden ligger mellom 25-31 cm. (Adlercreutz 2003).

## Golden Retriever

Golden Retriever kommer fra grensetraktene mellom England og Skottland. Den er avlet fram



**Figur 30** Golden Retriever  
([www.pets911.com](http://www.pets911.com))

som en hund med utpreget apporterings- og arbeidslyst. Den er følsom, lett å trene, lydig og meget vennlig. Den er velbalansert, kraftig og aktiv, med flytende bevegelser. Pelsfargen varierer i spekteret fra gyllen til fløtefarget. Noen få hvite hårstrå kan

forekomme. Mankehøyden på hann er 56-61 cm, mens tisper ligger mellom 51-56 cm (Adlercreutz 2003).

## Innsamling og ekstrahering av DNA

DNA-materialet fra Samojedhundene var innsamlet ved hjelp av blodprøver i en tidligere studie ved HiT hvor det ble brukt utsaltingsmetode for ekstraksjon (Miller, Dykes m. fl. 1988). DNA fra de andre hundene ble samlet inn ved hjelp av svaberprøver tatt i munnen på hundene og avsatt på Whatman Indicating FTA® Micro kort. Svabere og Whatman Indicating FTA® Micro kort var kjøpt hos WWR-Norge og ekstraksjon ble gjort i henhold til oppsett fra leverandør (Appendiks A).

## Genotyping

Genotyping av hundene ble gjort ved hjelp av polymerase chain reaction (PCR). I *DRD4* PCR-en ble det brukt fluorescerende forwardprimere og produktene ble visualisert på ABI 3130 XL. *MAOB* og *COMT* ble kuttet med restriksjonsenzymmer og ble visualisert på polyakrylamidgel ved hjelp av Etidiumbromid.

Følgende primere ble brukt:

**Tabell 5** Primere brukt i de ulike PCR-reaksjonene, samt  $T_a$  som er temperaturen for best resultat for annealing av primere

Gen	Primere	Sekvens	$T_a$ (°C)
<i>DRD4</i>	Forward – D4F	5'-TTC TTC CTA CCC TGC CCG CTC ATG- 3'	67.5
<i>DRD4</i>	Revers – D4DogR	5'-CCG CGG GGG CTC TGC AGG GTC G-3'	67.5
<i>MAOB</i>	Forward	5'-TCC ATG GATA CA CCT CAA GG- 3'	60
<i>MAOB</i>	Revers	5'-TGA TGG ATF AGA CGC TCT AC-3'	60
<i>COMT 216A</i>	Forward	5'-ATG GGA TGA GGG AGG CAG G- 3'	62
<i>COMT 216A</i>	Revers	5'-AGA ATG GTG ACC TGG AAC GG-3'	62
<i>COMT G482A</i>	Forward	5'-ATC TTG GAT GCA GTG GTG C- 3'	56
<i>COMT G482A</i>	Revers	5'- ATG CTT CTT CTT CAG CTC GG-3'	56

### ***DRD4***

DNA ble amplifisert etter modifisert oppsett fra Niimi m. fl.(Niimi, Inoue-Murayama m. fl. 1999), i en PCR-reaksjon på totalt 20 µl. 1 µl DNA templat (ca 100 ng/µl)(Samojedhundene) eller 1 rensset Whatman Indicating FTA® Micro kort med DNA (d= 2 mm) sammen med dH<sub>2</sub>O og følgende konsentrasjoner ble brukt: 1x Pfu Buffer, 250 µM dNTP(-dGTP), 125 µM dGTP & 7-deaza dGTP, 0.5 µM Forward primer DRD4, 0.5 µM Reversprimer DRD4 og 0.0375 U/µl Pfu Turbo DNA polymerase. PCR-programmet var på 2 minutter med 98°C og deretter 34 repetisjoner med 98°C i 30 sekunder, 67.5°C i 1 minutt og 72°C i 1 minutt. Tilslutt 10 minutter med 72°C. 1 µl av PCR-produktet sammen med 11.5 µl Formamid (Appendiks C) og 0.5 µl GS-500 Rox (Appendiks C) ble deretter kjørt på 3130 XL fra Applied Biosystems for å beregne lengden på PCR-produktene.

## **MAOB**

DNA ble amplifisert etter modifisert oppsett fra Hashizume m. fl. (Hashizume, Masuda m. fl. 2005). PCR-reaksjon på totalt 20 µl for DNA ekstrahert ved hjelp av utsaltningsmetoden og 50 µl for DNA ekstrahert fra Whatman Indicating FTA® Micro kort. 1 µl DNA templat (ca 100 ng/µl)(Samojedhundene) eller 1 rensset Whatman Indicating FTA® Micro kort med DNA (d=2 mm) sammen med dH<sub>2</sub>O og følgende konsentrasjoner ble brukt: 1x TaqMan Genotyping mastermix, 0.5 µM Forward primer, 0.5 µM Reverse primer. PCR-programmet var på 5 minutter med 95°C og deretter 35 repetisjoner med 95°C i 30 sekunder, 60°C i 30 sekunder og 72°C i 30 sekunder. Tilslutt 5 minutter med 72°C. Deretter ble 4 µl PCR-produkt satt til kutting ved 37°C over natten i følgende blanding på totalt 15 µl: dH<sub>2</sub>O, 1 x NE Buffer og 8 U av restriksjonsenzymet Hinf. Etter kutting ble Restriction Fragment Length Polymorfismene (RFLP) kjørt på 6 % polyakrylamidgel (Appendiks C). 4.0 µl loading dye (Appendiks C) og 9 µl PCR-produkt(Appendiks C). I en av brønnene ble det tilsatt 2.5 µl med størrelsesmarkør (Appendiks C). De kuttete PCR-produktene ble pipettert i brønner i gelen og kjørt i 30 minutter ved en spenning på 150 V. Gelen ble så lagt i en løsning med Etidiumbromid (Appendiks C) som binder seg til DNA-fragmentene, i 10 minutter. Så ble de lagt i vannbad for å fjerne overflødig Etidiumbromid i 5 minutter. Tilslutt ble gelen belyst med UV-lys og bilde ble tatt for å visualisere resultatet på gelen. Brønnene med PCR-produkt, noen kuttet og andre ukuttet, ble sammenlignet med brønnen med størrelsesmarkør og størrelse på produktene ble bestemt.

## **COMT**

DNA ble amplifisert etter modifisert oppsett fra Masuda m. fl. (Masuda, Hashizume m. fl. 2004). PCR-reaksjon på totalt 20 µl for DNA ekstrahert ved hjelp av utsaltningsmetoden og 50 µl for DNA ekstrahert fra Whatman Indicating FTA® Micro kort. 1 µl DNA templat (ca 100 ng/µl)(Samojedhundene) eller 1 rensset Whatman Indicating FTA® Micro kort med DNA (d = 2 mm) sammen med dH<sub>2</sub>O og følgende konsentrasjoner ble brukt:

**COMT G216A:** 2 % DMSO, 1x PCR Buffer, 1mM MgCl, 0.2 mM dNTP, 0.1 µM Forward primer, 0.1 µM Revers Primer og 0.5 U Taq-polymerase. PCR-programmet var på 5 minutter med 95°C og deretter 35 repetisjoner med 95°C i 30 sekunder, 62°C i 30 sekunder og 72°C i 1 minutt. Tilslutt 5 minutter med 72°C. Deretter ble en total blanding på 15 µl med 4 µl PCR-

produkt, dH<sub>2</sub>O, 1 x NE Buffer og 8 U av restriksjonsenzymet Eag I satt til kutting ved 37°C over natten. Visualisering av RFLP på polyakrylamidgel på samme måte som *MAOB*.

**COMT G482A:** 1x PCR Buffer, 1mM MgCl, 0.2 mM dNTP, 0.1 µM Forward primer, 0.1 µM Revers Primer og 0.5 U Taq-polymerase. PCR-programmet var på 5 minutter med 95°C og deretter 35 repetisjoner med 95°C i 30 sekunder, 56°C i 30 sekunder og 72°C i 1 minutt. Tilslutt 5 minutter med 72°C. Deretter ble en totalblanding på 15 µl med 4 µl PCR-produkt, dH<sub>2</sub>O, 1 x NE Buffer 4 og 4 U av restriksjonsenzymet Sfc I satt til kutting ved 37°C over natten. Visualisering av RFLP på polyakrylamidgel på samme måte som *MAOB*.

### **Utfordringer knyttet til analysearbeidet**

Ved bestemming av *DRD4*-lengdepolymorfismer kom ikke alle allelene opp ved første kjøring. Etter 2 til 3 kjøring, uten endring i oppsettet, var alle bortsett fra 2 kartlagt. Disse 2 ble ikke tatt med i det videre arbeidet.

Ved kjøring av PCR og kutting med restriksjonsenzymet på *MAOB* tok vi utgangspunkt i oppsettet til Hashizume m. fl. (Hashizume, Masuda m. fl. 2005), men det ble brukt en TaqMan Genotyping Mastermix istedenfor for kippet som var oppgitt av Hashizume. Dette fungerte bra for både DNA fra blodprøver og fra Whatman Indicating FTA® Micro kortene. Taqman Universal PCR Mix ble også utprøvd men det fungerte ikke, verken på DNA ekstrahert ved hjelp av utsaltingsmetoden eller Whatman Indicating FTA® Micro kortene.

For *COMT G216A* og *COMT G482A* tok vi utgangspunkt i oppsettet til Masuda m. fl. (Masuda, Hashizume m. fl. 2004), men brukte Universal PCR Mix istedenfor kippet oppgitt i artikkelen. Vi fikk opp PCR-produkter, men de var for svake til å kuttes på. Ulike optimaliseringer ble gjennomført. I første omgang ble mengde PCR-produkt økt, dette ble testet med forprøver med vann og disse kom fram på gelen. Men etter en natts kutting dukket ingenting opp. Videre ble økning av antall sykluser under PCR-kjøring forsøkt. Dette gav flere uspesifikke bånd, men også sterkere bånd av det vi ønsket. Likevel var det ikke nok. Dobbel mengde primere og også dobbel mengde DNA ble forsøkt, samt PCR-kjøring på PCR-produkt, uten suksess. Tilslutt valgte vi å gå vekk fra bruk av TaqMan Universal PCR Mastermix og heller bruke enkeltstående reagenser. Etter kjøring hvor både mengde TaqMan polymerase, MgCl<sub>2</sub> og temperatur på polymeriseringen ble variert kom vi fram til en

miks som fungerte. Vi endte opp med en temperatur som lå over Masuda m. fl. (Masuda, Hashizume m. fl. 2004) sine kjøring, 62 °C istedenfor 61°C på *COMT G216A* og 56 °C istedenfor 53 °C på *COMT G482*.

På *COMT G216A* måtte vi bruke 2 % DiMethyl Sulfoxide (DMSO) for å få nok produkter til kutting. Dette skyldes mest sannsynlig et GC-rikt område > 60%. DMSO hindrer at GC-områder på samme DNA-tråd slår seg sammen og hindrer polymeriseringen. Vi hadde dobbel mengde MgCl<sub>2</sub> og Taq-polymerase i forhold til standardoppsettet.

På *COMT G482A* økte vi Taq-polymerasen til det dobbelte av standardoppsettet.

## **Fenotyping**

Fenotyping av hundenes adferd ble gjort ved hjelp av et validert hunde-ADHD- spørreskjema (Vas, J. m. fl. 2007). Skjema var opprinnelig utviklet for kartlegging av barns mulige ADHD ved intervju av foreldre (DuPaul, Ervin m. fl. 1998). Skjema til Vas m. fl. (Vas, J. m. fl. 2007) ble modifisert og oversatt til norsk. I tillegg fikk alle hundeeierne utdelt et informasjonsskriv som redegjorde for formålet til undersøkelsen (Appendiks B)

Skjemaet inneholdt spørsmål som hørte til to kategorier adferd; en kategori for oppmerksomhetssvikt, for eksempel ” Din hund har vanskeligheter med å lære, fordi den lett blir distraheret” og en kategori for impulsiv adferd, for eksempel. ”Den kan ikke være stille, den er vanskelig å roe”. I alt 12 spørsmål ble stilt, med halvparten fra hver av de to kategoriene oppmerksomhetssvikt og impulsiv adferd (Appendiks B).

Spørsmålene var gradert fra 0 til 3, der 0 stod for aldri, 1 stod for noen ganger, 2 stod for ofte og 3 stod for svært ofte. Dette gav en maksscore på 18 poeng innen hver av kategoriene. Denne scoren karakteriserer hundens såkalte endofenotype, som er en mellomliggende struktur mellom adferd og biologisk basis for adferden. Den gir kunnskap om det genetiske grunnlaget og er en hjelp til å klassifisere og diagnostisere adferden.

I tillegg ble det spurt om navn på eier, navn på hund, hundens fødselsdato, om hunden var en familie- eller kennelhund og om eventuell kvalifikasjonstrening hunden hadde gjennomgått.



Sammenlagt score på oppmerksomhetssvikt-skalaen eller impulsiv adferd-skalaen innen ulike allelkombinasjoner ble sjekket opp mot hverandre. Nullhypotesen var at det ikke var noen forskjell i score på skalaene uavhengig av hvilken genotype hundene hadde.

De fleste av Leonbergere, Rottweilere, Flatcoated Retrievere, Welsh Corgi Pembroke og Golden Retrievere (51 av 55) ble intervjuet samtidig som prøvene ble samlet inn. Disse intervjuene ble gjort på en hundeutstilling hvor hundene deltok. 2 Rottweilere og 2 Golden Retrievere ble testet og intervjuet hjemme hos eierne. Prøvene på Samoiedhundene var innsamlet for noen år tilbake og et utvalg på 38 Samoiedhunder ble kartlagt ved hjelp av spørreskjemaet over telefon. Under telefonintervjuene kom det fram at noen av hundene var døde og alder ved bortgang ble satt som alder på hundene.

### **Statistikk**

Minitab Statistical Software release 15.0 ble benyttet til statistisk analyse av materialet som ble samlet inn.

Forskjeller i egenskaper mellom grupper ble evaluert ved hjelp av  $\chi^2$ -test for kategoriske variable og Mann-Whitney U-test ble benyttet for sammenligning av score mellom ulike allelkombinasjoner. P-verdier  $< 0.05$  ble ansett som signifikante.

$\chi^2$ -testen analyserer frekvenser, både mellom observerte frekvenser og en teoretisk frekvens (Goodness of fit-test), eller som i denne oppgaven assosiasjonstest mellom to, og eventuelt flere, frekvensfordelinger.  $\chi^2$ -test bør ha 5 eller flere tellinger i hver celle i gjennomsnitt og minst 1 telling i hver celle (Wheater og Cook 2000).

Mann-Whitney U-testen er en robust ikke-parametrisk test som sammenligner to sample. Den blir også kalt for Wilcoxon two-sample test. Fordelen med denne testen er at den kan brukes ned til så få som 4 observasjoner. Den kan brukes både på ordinal- og intervalldata, den har ikke noen krav om normalfordeling og samplene trenger ikke være like store (Wheater og Cook 2000). Fordelen med ikke-parametriske tester er også at de er mindre følsomme for ekstreme observasjoner, som blant annet kan skyldes måle- eller inntastingsfeil (Løvås 1999).

### 3 Resultater

Hardy Weinberg likevekt ble sjekket for alle rasene under ett med hensyn til fordeling av allel-kombinasjoner av *MAOB*, *COMT G216A* og *COMT G482A*. Beregnede frekvenser ble sjekket mot observerte i en  $\chi^2$ -test. *MAOB* og *COMT G482A* stemte overens med likevekten, ingen signifikante forskjeller ( $P=0.49$  og  $P=0.69$ ), mens *COMT G216A* ikke var i likevekt, det var signifikant forskjell ( $P=0.00$ ). *COMT G216A* hadde flere heterozygote individer enn det likevekten forutsetter.

Det var ikke mulig å kjøre  $\chi^2$ -test på frekvensfordeling av *MAOB*, *COMT G216A* og *COMT G482A* mellom de ulike rasene, fordi flere av rasene ikke hadde alle allel-utgavene. Det ble derfor ikke tatt hensyn til rase under statistiske analyser mellom ulike genotyper.

Det var signifikant forskjell mellom antall kennelhunder og familiehunder ( $P=0.01$ ).

Det var ingen signifikante forskjeller mellom alder og score på spørreundersøkelsen. Det samme gjaldt hunderase og score på spørreundersøkelsen. To av hunderasene viste indikasjoner på forskjell sammenlignet med en annen. Samojedhund og Flatcoated Retriever sammenlignet med Golden Retriever i forhold til oppmerksomhetssvikt. Samojedhunden og Flatcoated Retrieveren scoret høyere på oppmerksomhetssviktskalaen ( $P=0.11$  og  $P=0.10$ ). Flatcoated Retriever viste også resultater som lå nær signifikans sammenlignet med Golden Retriever i forhold til høyere score på impulsiv adferd ( $P=0.07$ ). Forsøk på å gruppere Samojedhunden og Flatcoated Retriever opp mot de andre hundene gav heller ingen signifikante resultat. Det nærmeste var sjekk av Flatcoated Retriever opp mot en gruppering av Leonberger, Rottweiler, Welsh Corgi Pembroke og Golden Retriever i forhold til impulsiv adferd ( $P=0.09$ ).

#### ***DRD4***

Ved sjekk av genotypen til de ulike hunderasene i forhold til *DRD4* så hadde Samojedhundene de eneste individene med forekomst av *490*. Totalt 81.92 % av Samojedhundene hadde *490* og 30.12 % av disse var homozygote. Flatcoated Retrievere hadde 40 % med allel-kombinasjonen *467/467*, heterozygote med *467* fordelte seg slik: Leonbergerne(63.64 % ), Rottweilerne (27.27 %), Flatcoated Retrievere (40 %), Welsh Corgi Pembroke (60 %) og Golden Retrieverne (16.67 %). 100 % av Leonbergerne og Rottweilerne var bærere av *422*.(Tabell 6, neste side).

**Tabell 6** Genotypen til DRD4-genet i de ulike rasene. Prosentvis fordeling innen rasene i parentes.

<b>DRD4</b>	<b>Samojedhund<sup>1</sup></b> n=83	<b>Leonberger</b> n=11	<b>Rottweiler</b> n=11	<b>Flatcoated Retriever</b> n=10	<b>Welsh Corgi Pembroke</b> n=10	<b>Golden Retriever<sup>1</sup></b> n=12
<i>396/431</i>	4 (4.82 %)					
<i>396/490</i>	3 (3.61 %)					
<i>422/422</i>		4 (36.36 %)	6 (54.55 %)	1 (10.00 %)	2 (20.00%)	1 (8.33 %)
<i>422/435</i>			2 (18.18 %)	1 (10.00 %)		4 (3.33 %)
<i>422/467</i>		7 (63.64 %)	3 (27.27 %)	4 (40.00 %)	6 (60.00%)	2 (16.67 %)
<i>431/431</i>	11 (13.25 %)					
<i>435/435</i>					2 (20.00 %)	5 (41.66 %)
<i>431/490</i>	40 (48.19 %)					
<i>467/467</i>				4 (40.00 %)		
<i>490/490</i>	25 (30.12 %)					

<sup>1</sup> Et individ uten resultat

Ved beregning av gjennomsnittsscore med standardavvik på oppmerksomhetssvikt og impulsiv adferd skilte genotypen *490/490* seg betydelig fra de andre kombinasjonene i forhold til oppmerksomhetssvikt (Tabell 7, neste side).

**Tabell 7** Gjennomsnittscore ( $\pm$  standardavvik) på oppmerksomhetssvikt og impulsiv adferd for de ulike genotypene *DRD4*. *490/490* skiller seg ut i forhold til score på oppmerksomhetssvikt i forhold til de andre genotypene. Maksscore er 18 poeng i hver av kategoriene.

	<b>Oppmerksomhetssvikt</b> <sup>1</sup>	<b>Impulsiv adferd</b> <sup>1</sup>
	n = 91	n = 91
<i>396/431</i> <sup>2</sup>	Ingen resultat	Ingen resultat
<i>396/490</i>	0 $\pm$ N/A (1)	1 $\pm$ N/A (1)
<i>422/422</i>	4.21 $\pm$ 1.19 (14)	2.5 $\pm$ 1.34 (14)
<i>422/435</i>	2.86 $\pm$ 2.27 (7)	1.86 $\pm$ 1.77 (7)
<i>422/467</i>	4.27 $\pm$ 2.24 (22)	3.23 $\pm$ 2.03 (22)
<i>431/431</i>	7.00 $\pm$ 6.36 (5)	4.40 $\pm$ 5.18 (5)
<i>435/435</i>	2.86 $\pm$ 2.79 (7)	2.43 $\pm$ 1.51 (7)
<i>431/490</i>	3.38 $\pm$ 2.50 (21)	2.43 $\pm$ 2.18 (21)
<i>467/467</i>	4.75 $\pm$ 2.22 (4)	3.75 $\pm$ 0.5 (4)
<i>490/490</i>	8.40 $\pm$ 4.95 (10)	4.00 $\pm$ 2.79 (10)

1 Antall individer i parentes

2 Genotypen er funnet, men ingen kartlegging av adferd

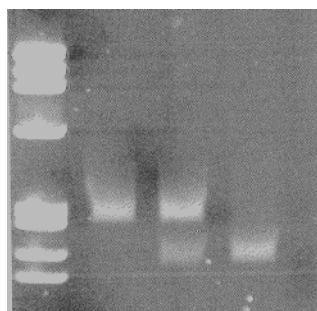
Sammenligning av score på oppmerksomhetssvikt (høyeste score med laveste) mellom *490/490* og *422/435* ( $P=0.01$ ), *490/490* og *422/467* ( $P=0.02$ ), *490/490* og *431/490* ( $P=0.004$ ) *490/490* og alle allel-kombinasjoner utenom *490/490* ( $P=0.004$ ) gav signifikante forskjeller (Tabell 8).

**Tabell 8** Allelkombinasjoner som gav signifikante forskjeller i score på oppmerksomhetssvikt, kombinasjoner med høyest score står først.

<b>Allel-kombinasjon</b>	<b>P-verdi</b>
<i>490/490</i> og <i>422/435</i>	0.01
<i>490/490</i> og <i>422/467</i>	0.02
<i>490/490</i> og <i>431/490</i>	0.004
<i>490/490</i> og de andre allelkombinasjonene	0.004

## MAOB

Stige 1 2 3



Ved kutting med restriksjonsenzymet Hinf I ble det opprinnelige PCR-produktet på 257 bp kuttet i fragment på 180 bp og 77 bp når PCR-produktet inneholdt en SNP. Homozygot tisper med villtype og hann som er bærer av villtype fikk opp fragmenter på 257 bp. Homozygot tisper med SNP og hann som er bærer av SNP fikk opp 180 bp og 77 bp. Heterozygot tisper fikk opp alle tre. Fragmentene 257 bp (villtype) og 180 bp (SNP) ble brukt til å skille dem ved visualisering på polyakrylamidgelen (figur 31).

**Figur 31** Viser RFLP av MAOB

1: Homozygot (tisper) villtype *T/T* eller bærer villtype *T* (hann) (257 bp), 2: Heterozygot villtype (257 bp) og SNP (180 bp) kun tisper *T/C* 3: Homozygot SNP (tisper) *C/C* eller bærer SNP (hann) (180 bp) *C*

Fordeling av polymorfe utgaver av *MAOB* varierte mellom rasene. Flertallet av rasene var bærere av villtypen, unntaket var Welsh Corgi Pembroke hvor 70.00 % var bærere av SNPen. Hos Samojedhundene og Rottweilerne var 100 % av individene bærere av villtypen (Tabell 9).

**Tabell 9** Genotypefrekvensen til polymorfismene av *MAOB* i de undersøkte rasene. Prosentvisfordeling innen rasen i parentes.

Genotype	Samojedhund <sup>1,2</sup> n = 76	Leonberger n = 11	Rottweiler n = 11	Flatcoated Retriever n = 10	Welsh Corgi Pembroke n = 10	Golden Retriever n = 13
Tisper villtype/villtype	38 (50.00)	3 (27.27)	3 (27.27)	4 (40.00)	2 (20.00)	5 (38.46)
Tisper heterozygot	0	4 (36.36)	0	0	6 (60.00)	3 (23.10)
Tisper SNP/SNP	0	0	0	0	0	1 (7.70)
Hann villtype	38 (50.00)	4 (36.36)	8 (72.73)	5 (50.00)	1 (10.00)	2 (15.38)
Hann SNP	0	0	0	1 (10.00)	1 (10.00)	2 (15.38)

<sup>1</sup> Mangler kjønnsbestemmelse på 8 stk

Tisper som var homozygote for villtypen hadde større variasjon i forhold til adferdsscore på oppmerksomhetssvikt sammenlignet med tisper som var heterozygote (SD= 3.57 mot SD=1.66) (Tabell 10).

**Tabell 10** Gjennomsnitt og standardavvik på oppmerksomhetssviktscore og impulsiv adferdsscore i forhold *MAOB* på tisper. Antall individer i parentes.

Oppmerksomhetssvikt			Impulsiv adferd		
Tispe villtype/villtype	Tispe heterozygot	Tispe SNP/SNP	Tispe villtype/villtype	Tispe heterozygot	Tispe SNP/SNP
4.00±3.57 (37)	4.25±1.66 (12)	1.00±N/A (1)	2.38±2.05 (37)	3.42±1.51 (12)	3.00±N/A (1)

Hanner med villtypen hadde høy gjennomsnittsscore og stor variasjon i forhold til oppmerksomhetssvikt. Lavere gjennomsnittsscore og mindre variasjon fant studien hos de samme hannene i forhold til impulsiv adferd (tabell 11).

**Tabell 11** Gjennomsnitt og standardavvik på oppmerksomhetssvikt og impulsiv adferdsscore i forhold til *MAOB* på hannhunder. Antall individer i parentes.

Oppmerksomhetssvikt		Impulsiv adferd	
Hann villtype	Hann SNP	Hann villtype	Hann SNP
5.00±3.54 (38)	4.00±2.83(2)	2.95±2.10 (35)	3.50±3.54 (2)

Bærer av kun villtype viste større variasjon i score på oppmerksomhetssvikt i forhold til bærer av SNP (SD= 3.56 mot SD=1.91) (Tabell 12).

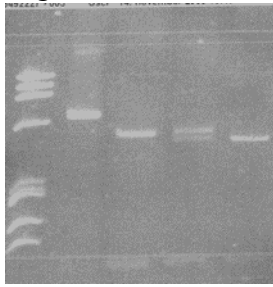
**Tabell 12** Gjennomsnitt og standardavvik på oppmerksomhetssvikt og impulsiv adferdsscore i forhold til *MAOB* på bærer av kun villtype og bærer av SNP. Antall individer i parentes.

Oppmerksomhetssvikt		Impulsiv adferd	
Bærer kun villtype	Bærer SNP	Bærer kun villtype	Bærer SNP
4.42±3.56 (75)	4.11±1.91 (15)	2.70±2.38 (75)	3.72±1.49(15)

Under det videre statistiske arbeidet ble ulike kombinasjoner alleler sjekket i forhold til signifikante forskjeller i adferdsscore. Kun bærer av SNP fikk signifikant høyere score enn bærer av kun villtype i forhold til impulsiv adferd (P=0.02).

## COMT G216A

Stige 1 2 3 4



Ved kutting med restriksjonsenzymet Eag I ble det opprinnelige PCR-produktet på 663 bp kuttet på et eller to kuttsteder. Homozygot villtype fikk opp fragmenter på 464 bp, 156 bp og 43 bp, mens homozygot for SNP fikk opp 507 bp og 156 bp. Heterozygot fikk opp alle disse. Fragmentene 464 bp (villtype) og 507 bp (SNP) ble brukt til å skille dem ved visualisering på polyakrylamidgelen (figur 32).

**Figur 32** Viser RFLP av COMT G216A

1: PCR-produkt (663 bp) 2: Homozygot SNP (507 bp) A/A 3: Heterozygot villtype (464bp)/SNP (507 bp) G/A 4: Homozygot villtype (464) G/G

Genotypfrekvensen varierte noe mellom rasene. De fleste hadde et flertall som var homozygote for villtypen. Unntakene var Rottweilerne og Flatcoated Retrieverne som hadde følgende fordeling mellom homozygot villtype og homozygot SNP, 50 % / 50% og 33.33% / 66.67% (Tabell 13).

**Tabell 13** Genotypfrekvensen av polymorfismene til *COMT G216A* genot i de undersøkte rasene Prosentvisfordeling innen rasen i parentes.

Genotype	Samojedhund <sup>1</sup> n = 82	Leonberger <sup>2</sup> n = 4	Rottweiler <sup>2</sup> n = 4	Flatcoated Retriever <sup>2</sup> n = 3	Welsh Corgi Pembroke <sup>3</sup> n = 5	Golden Retriever <sup>2</sup> n = 6
Homozygot villtype	57 (69.51)	3 (75.00)	2 (50.00)	1 (33.33)	4 (80.00)	4 (66.67)
Heterozygot	12 (14.63)	1 (25.00)	0	0	1 (20.00)	1 (16.67)
Homozygot SNP	13 (15.85)	0 (0)	2 (50.00)	2 (66.67)	0 (0.00)	1 (16.67)

1 2 uten resultat

2 7 uten resultat

3 5 uten resultat

Individer som var homozygote for villtypen hadde høyest gjennomsnittsscore i forhold til oppmerksomhetssvikt, men også den største variasjonen (SD=4.29). I forhold til impulsiv adferd viste individer som hadde SNP-allel, enten homo- eller heterozygote, lavere gjennomsnittsverdier og de minste standardavvikene (Tabell 14).

**Tabell 14** Gjennomsnitt og standardavvik for score på oppmerksomhetssvikt og score på impulsiv adferd for *COMT*G216A. Antall individer i parentes.

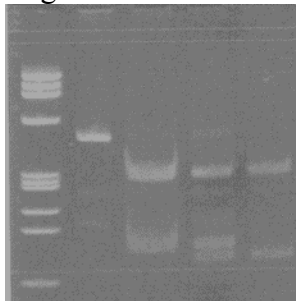
<b>Oppmerksomhetssvikt</b>			<b>Impulsiv adferd</b>		
Villtype	Villtype / SNP	SNP/SNP	Villtype	Villtype/ SNP	SNP/SNP
5.17 ±4.29(41)	3.71±1.38(7)	2.44±2.40(9)	3.12± 2.74(41)	2.00±1.22(7)	2.11±1.27(9)

Signifikante statistiske forskjeller ble kun påvist mellom homozygot villtype og homozygot SNP i forhold til oppmerksomhetssvikt (P=0.05). Homozygot SNP hadde lavest score.



## COMT G482A

Stige 1 2 3 4



Ved kutting med restriksjonsenzymet Sfc I ble det opprinnelige PCR-produktet på 494 bp kuttet på et eller to kuttseter. Homozygot villtype fikk opp fragmenter på 332 bp og 162 bp, mens homozygot for SNP fikk opp 332 bp, 144 bp og 18 bp. Heterozygot fikk opp alle disse. Fragmentene 162 bp (villtype) og 144 bp (SNP) ble brukt til å skille dem ved visualisering på polyakrylamidgelen (figur 33).

**Figur 33** Viser RFLP til COMT G482A

1:PCR-produkt (494) 2: Homozygot villtype (162 bp) *G/G* 3: Heterozygot villtype (162 bp)/SNP (144 bp) *G/A* 4: Homozygot SNP (144 bp) *A/A*

Genotypefrekvensen viste at alle rasene utenom Flatcoated Retriever hadde flest hunder som var homozygot for villtypen (> 69.23 %). Hos Flatcoated Retrieverne var flertallet heterozygote (54.54 %)(Tabell 15).

**Tabell 15** Genotypefrekvensen av polymorfismene til *COMT G482A* i de undersøkte rasene. Prosentvisfordeling innen rasen i parentes.

Genotype	Samojedhund <sup>1</sup> n = 83	Leonberger n = 11	Rottweiler n = 11	Flatcoated Retriever n = 10	Welsh Corgi Pembroke n=10	Golden Retriever n=13
Homozygot villtype	58 (69.88)	11 (100)	11 (100)	3 (27.25)	9 (90.00)	9 (69.23)
Heterozygot	22 (26.50)	0	0	6 (54.54)	1 (10.00)	3 (23.08)
Homozygot SNP	3 (3.61)	0	0	1 (9.10)	0	1 (7.69)

1 1 uten resultat

Gjennomsnittsverdier og standardavvik varierte lite innen de ulike scorene i forhold til *COMT G482A* (tabell 16).

**Tabell 16** Gjennomsnitt og standardavvik i score på oppmerksomhetssvikt og score på impulsiv adferd på de ulike genotypene av *COMT G482A*. Antall individer i parentes.

Oppmerksomhetssvikt <sup>1</sup>			Impulsiv adferd <sup>1</sup>		
Villtype	Villtype / SNP	SNP/SNP	Villtype	Villtype/ SNP	SNP/SNP
4.66±3.54 (67)	3.50±2.40(20)	4.60±2.79(5)	3.01±2.36(67)	2.20±1.44(20)	3.80±3.56 (5)

<sup>1</sup> antallet individer i parentes

Ingen statistisk signifikante forskjeller ble funnet ved sammenligninger innen *COMT G482A* i forhold til oppmerksomhetssvikt eller impulsiv adferd. Nærmest var homozygot villtype med høyere score i forhold til heterozygot når det gjaldt impulsiv adferd (P=0.19).

I tillegg så hadde 77.4 % av individene med A i *COMT G216A* hadde også A i *COMT G482A*.

## Evaluering av ulike genotyper mot hverandre

Det ble gjort statistiske analyser av innsamlet tallmateriale og det meste viste ingen signifikante forskjeller. Forsøk på å gruppere ulike genotyper sammen opp mot andre grupperinger av genotyper ble forsøkt, men det ble for få til å oppfylle Mann-Whitney U-metodens minstekrav om et antall på minst 4 innen hver gruppe. Noen statistisk signifikante funn ble gjort og disse er nevnt i foregående gjennomgang. Nedenfor viser tabell 17 disse resultatene i uthevet skrift. I tillegg er noen ikke signifikante tatt med da de kan være interessante i forhold til helheten.

**Tabell 17** Utvalg av statistisk kontroll av assosiasjon mellom ulike utvalg. Signifikante resultater er i uthevet skrift.

Utvalg av statistisk kontroll av assosiasjon mellom ulike utvalg (høyest score står først):	P-verdi	
	Oppmerksomhets-svikt	Impulsiv adferd
Ikke-voksne (< 2år) og voksne (>2år)	0.69	0.46
Samojedhund og Golden Retriever	0.11	0.51
Flatcoated Retriever og Golden Retriever	0.10	0.07
Flatcoated Retriever og gruppe av Leonberger, Rottweiler, Welsh Corgi Pembroke og Golden Retriever	0.55	0.09
<u>DRD4</u>		
490/490 og 422/435	<b>0.01</b>	0.13
490/490 og 422/467	<b>0.02</b>	0.64
490/490 og 431/490	<b>0.004</b>	0.09
490/490 og de andre genotypene	<b>0.004</b>	0.17
490/490 og 422/422	0.06	0.10
<u>MAOB</u>		
Bærer SNP og bærer kun villtype	0.76	<b>0.02</b>
<u>COMT G216A</u>		
Villtype/ villtype og SNP/SNP	<b>0.05</b>	0.19
villtype /SNP og SNP/SNP	0.10	0.65
<u>COMT G482A</u>		
Villtype / villtype og villtype /SNP	0.68	0.19

## 4 Diskusjon

Hensikten med den praktiske delen av mastergradsoppgaven var å genotype seks hunderaser for polymorfismer i *DRD4*, *MAOB* og *COMT*, samt å se på mulige assosiasjoner mellom polymorfismene i disse genene og adferdsavvikene oppmerksomhetssvikt og impulsiv adferd som er relatert til ADHD. Adferd ble kartlagt ved hjelp av et validert spørreskjema som kartla endofenotypen (Vas, J. m. fl. 2007).

Siden dataene varierte i forhold til normalfordeling og antallet individer i enkelte grupper var meget lavt (n=4), ble Mann-Whitney U-test brukt til de statistiske analysene. Det ble ikke påvist signifikante forskjeller i score mellom rasene. For å få store nok grupper til å analysere endofenotypen ble de ulike genotypene organisert i grupper uavhengig av hunderase.

### ***DRD4***

*DRD4* ekson III har flere lengdepolymorfismer og følgende alleler ble påvist: 396, 422, 431, 435, 467 og 490. Dette er i samsvar med tidligere studier i forhold til to av allelene (396 og 435)(Niimi, Inoue-Murayama m. fl. 1999; Ito, Nara m. fl. 2004), men vi fikk også påvist alleler som ikke er publisert tidligere (422, 431, 467 og 490). Mindre forskjeller mellom studier kan skyldes metodeforskjeller, 431 og 490 ligger tett opp til alleler som er publisert (435 og 486). Niimi m. fl. (Niimi, Inoue-Murayama m. fl. 1999) brukte 377 DNA Sequencer (Perkin-Elmer, U.S.A), Ito m. fl. (Ito, Nara m. fl. 2004) brukte ABI 3100 DNA Sequencer (Perkin-Elmer, U.S.A), mens det i denne studien ble brukt ABI 3130 xl (Perkin-Elmer, U.S.A). Resultater som styrker at 431 og 435 er to ulike polymorfismer er at begge er påvist i denne studien. 435 ble påvist i 75.0 % Golden Retrievere noe som stemmer godt overens med studien til Niimi m. fl. (Niimi, Inoue-Murayama m. fl. 2001) hvor 435 var det mest vanlige allelet i denne rasen, 78.9 % hadde allelet.

Sammenligning av score (høyeste mot laveste score) på oppmerksomhetssvikt i forhold til genotype gav signifikante forskjeller for kombinasjonen 490/490 sett opp mot kombinasjonene 422/435 (P=0.01), 422/467 (P=0.02), 431/490 (P=0.004) og alle de andre allelkombinasjonene (P=0.004). Det var kun Samoiedhundene som hadde allelkombinasjonen 490/490. Når man sammenlignet raser og adferd uavhengig av genotype fant man ingen signifikante forskjeller mellom Samoiedhunden og de andre rasene. Dette viser viktigheten av å se på genotype og ikke bare raser når man skal kartlegge adferd.

*DRD4* resultatene føyer seg inn i rekken av resultater som viser at ulike lengder av *DRD4* kan ha noe å si for hunders adferd (Ito, Nara m. fl. 2004; Hejjas, Vas m. fl. 2007). Ito m. fl. (Ito, Nara m. fl. 2004) sjekket ulike lengdepolymerfismer opp mot aggresjonsrelatert adferd. Deres konklusjon var at allelene 396, 435 og 447a kunne knyttes til mindre aggresjonsrelatert adferd enn allelene 447b, 486, 498, 549 og 576. Inndeling etter deres resultater ble også forsøkt i denne studien, men det gav ingen signifikante resultater. Årsaken til dette skyldes sannsynligvis at adferden som ble kartlagt og metodene som ble brukt var forskjellige. Ito m. fl. (Ito, Nara m. fl. 2004) kartla aggresjonsrelatert adferd og intervjuet hundespesialister som veterinærer, hundeinstruktører og hundepassere. I denne studien ble oppmerksomhetsvikt og impulsiv adferd kartlagt ved å intervju hundens eier.

### **MAOB**

Den observerte allelfrekvensen for *MAOB* varierte mellom rasene, men de fleste var homozygote for villtypen. Unntaket var Welsh Corgi Pembroke som hadde flertall som var bærere av polymorfismen. I en studie av Hashizume m. fl. (Hashizume, Masuda m. fl. 2005) fant man ut at over 90 % av Golden Retrievere hadde villtypen i minst et allel, noe som avviker fra denne oppgavens resultat på 76.94 %. Avviket kan skyldes det lave antallet Golden Retrievere (n=13). I studien til Hashizume m. fl. (Hashizume, Masuda m. fl. 2005) fant man at 83 % av Miniatur Schnauzerne var bærere av polymorfismen. Disse forskjellene mellom raser kan skyldes selektiv avl slik det er vist i en studie av *DRD4* (Niimi, Inoue-Murayama m. fl. 2001).

Signifikant forskjell i adferdsscore i forhold til impulsiv adferd ble resultatet ved å gruppere bærere av villtypen (homozygote tisper og hann med villtype allelet) mot bærere av polymorfismen (heterozygote og homozygote tisper, og hanner med polymorfismen). Signifikant høyere score på bærer av polymorfismen ble resultatet ( $P=0.02$ ). Dette gir indikasjon på en mulig sammenheng mellom det å være bærer av polymorfismen i *MAOB* og høyere grad av impulsiv adferd. Så vidt vi vet er dette første gangen en polymorfisme i *MAOB* har blitt analysert med tanke på adferd hos hund.

Denne studien hadde for få individer til å analysere på tvers av raser i forhold til genotype og adferd. Welsh Corgi Pembroke var den eneste rasen som hadde flertall med bærere av polymorfismen. Welsh Corgi Pembroke gir inntrykk av kraft og energi (Adlercreutz 2003). *MAOB* sin rolle i forhold til dette gir denne studien ingen svar på, men dette bør også følges opp i videre arbeider. I en studie av Hashizume m. fl. (Hashizume, Suzuki m. fl. 2003) ble det kartlagt at *MAOB* fortrinnsvis er uttrykt i hipphalamus og hippocampus. Man tror disse

områdene er involvert i kontroll av følelser, slik som aggresjon (Krotewicz og Romaniuk 1995).

### **COMT**

For *COMT G216A* varierte allelfrekvensen mellom de ulike hunderasene, men de fleste hadde flertall av homozygote for villtypen. Rottweilerne og Flatcoated Retrieverne var unntakene da de hadde henholdsvis 50.00 % og 66.67 % som var homozygote for polymorfismen. Bortsett fra Samojedhundene ble det kun undersøkt noen få individer fra hver rase (3-6 individer) og *COMT G216A* var ikke i Hardy-Weinberg likevekt. Mangel på likevekt innen Hardy-Weinberg kan skyldes at utvalget av hunder var skjevfordelt og dette påvirker resultatenes eksterne validitet. Det lave antallet individer i undersøkelsen gjør også at resultatene må tolkes forsiktig.

Resultater for *COMT G216A* og adferd viste signifikante forskjeller i score på oppmerksomhetssvikt mellom individer som var homozygote for villtype og individer som var homozygote for polymorfismen ( $P=0.05$ ). De med polymorfismen fikk lavere score. Det ble ikke påvist signifikante resultater for *COMT G216A* i forhold til impulsiv adferd.

Så vidt vi vet er dette første gangen polymorfismer i *COMT* har blitt analysert med tanke på adferd hos hund. Polymorfismen i *COMT G216A* gir ingen aminosyreendring i *COMT* proteinet og kalles derfor en stille mutasjon. Stille mutasjoner har tidligere blitt satt i sammenheng med personlighetsforstyrrelser og mentale sykdommer hos mennesker (Lappalainen, Long m. fl. 1998; Manuck, Flory m. fl. 1999; Tan, Chong m. fl. 2001; Kranzler, Hernandez-Avila m. fl. 2002). Det er antatt at effekten av slike stille mutasjoner kan skyldes koblingsulikevekter, det vil si ikke-tilfeldig assosiasjon mellom to eller flere alleler. Studerte hunder hos Masuda m. fl. (Masuda, Hashizume m. fl. 2004) som hadde A i *COMT G216A* hadde også ofte A i *COMT G482A*, noe som kan støtte denne spekulasjonen. Dette var også tilfellet i denne mastergradsoppgaven, 77.4 % av individene med A i *COMT G216A* hadde også A i *COMT G482A*. Koblingsulikevekter er et vanlig fenomen. Humant har man blant annet funnet koblingsulikevekter mellom *DRD4* og *Tyrosine Hydroxylase* (Barr, Wigg m. fl. 2000).

Ingen signifikante forskjeller ble funnet mellom genotypene for *COMT G482A* og adferdsscorene.

## Generelt om validering av adferd

Som nevnt under *DRD4* fikk ikke denne studien signifikante resultater ved å bruke inndelingen til Ito m. fl. (Ito, Nara m. fl. 2004). Ito brukte fagpersonell, mens denne studien brukte eierne. Sistnevnte kan forårsake annerledes svar, noe som i seg selv ikke behøver å være negativt. Hundeeierne lever tett sammen med sine dyr og bør ha gode muligheter til å kjenne sin hunds adferd. Utgangspunktet for spørreskjemaet var foreldre til barn med mulig ADHD, og ingen kjenner sine barn bedre enn foreldrene. Det som er viktig i så henseende er godt utviklede og validerte spørreskjemaer (Vas, J. m. fl. 2007).

En annen fordel man har ved bruk av denne metoden er at man lettere kan få samlet inn større mengde data sammenlignet med undersøkelser gjennomført av fagpersonell. Fagpersonell er ofte presset på tid og karakterisering av endofenotypen krever tid. I tillegg kjenner de ikke hundene så godt som eierne og kan følgelig ha problemer med å registrere de små nyansene.

Ved bruk av spørreskjema mot foreldrene opplevde Dupaul m. fl. (DuPaul, Ervin m. fl. 1998) stor grad av positiv innstilling, de fleste fylte ut spørreskjemaet. Liknende resultater har flere hundestudier også vist (Topal, Miklosi m. fl. 1998; Sallander, Hedhammar m. fl. 2001; Fuchs, Gaillard m. fl. 2005). Av de 95 som ble spurt i denne studien svarte 93 ja til å fylle ut spørreskjemaet. Av de to som svarte nei, var en tilskuer med en hund som ikke deltok i hundeutstilling og den andre var i ferd med å stille ut hunden sin. Sistnevnte avslo også å gjennomføre undersøkelsen etter gjennomført utstilling.

Et annet element som bør være med i vurderingen av spørreundersøkelsen er de ulike settingene de enkelte eierne befant seg i under karakteriseringen av endofenotypen. Selv om spørreskjemaet var validert for denne typen undersøkelser så var hundeeierne i forskjellige situasjoner da de ble spurt. Samojedhundeeierne ble intervjuet over telefon i relativt rolige omgivelser, samt at flere av hundene (14 stk av 38 stk) døde for en tid tilbake. Dette kan ha gitt annerledes svar i forhold til eierne som ble intervjuet på hundeutstilling, hvor stressnivået varierte. Noen forberedte seg til utstilling, andre var underveis i utstillingen, mens noen var ferdige. Dette er faktorer som sannsynligvis har spilt inn på svarene de gav. *490/490* var den genotypen som gav høyeste score i forhold til oppmerksomhetssvikt og det var kun Samojedhunder som hadde denne genotypen. Eierne deres kan muligens ha hatt et mer nyansert bilde av hundens adferd, sammenlignet med eierne av utstillingshundene. Sistnevnte eiere hadde som mål å fremstille sin hund på best mulig måte denne dagen, noe som kan ha preget svarene.

Telefonintervjuene av hundeeierne ble gjennomført etter hundeutstillingen og under disse intervjuene kom det fram at de enkelte hundeeierne hadde forskjellige oppfatninger om hva kennel- og familiehund var. Noen av eierne mente kennelhund betydde at den var kjøpt fra kennel, mens andre mente kennelhund betydde at hunden oppholdt seg i kennel på hjemstedsadressen til eieren sammen med andre hunder, og ikke var en del av livet innenfor hjemmets fire vegger. Dette gav begrensinger i forhold til analysen og derfor ville statistiske beregninger, basert på usikker kunnskap, være uforsvarlig å gjennomføre. Liknende utfordringer var knyttet til kvalifikasjonstrening. Eierne opererte med ulike oppfatninger av hva for eksempel lydighetstrening var, derfor ble ingen statistiske beregninger utført på disse svarene.

Avslutningsvis skulle man ønsket å ha hatt et større materiale for å styrke resultatene. Ved å ha tilgang til et større materiale kunne studien kombinert allel-kombinasjoner fra de ulike genene for å se på hvilken innvirkning disse sammen ville ha på adferdsscoren til hunden.



## 5 Konklusjon

I denne mastergradsoppgaven ble spesifikke polymorfismer i *DRD4*, *MAOB* og *COMT* hos 6 hunderaser genotypet. Disse genotypene ble deretter evaluert i forhold til adferdsscore som var kartlagt ved hjelp av spørreskjema. Polymorfe alleler av *DRD4* ble funnet, blant annet alleler som ikke tidligere er publisert (422, 431, 467 og 490). Innen *MAOB* og *COMT* ble tidligere publiserte polymorfe alleler funnet. For *DRD4* fant man ut at individer som var homozygote for det lengste allelet (490) hadde signifikant høyere scoreverdi på oppmerksomhetssvikt sett i forhold til andre genotyper av *DRD4*. *MAOB* hadde signifikant høyere score på impulsiv adferd for individer som var bærere av polymorfismen og *COMT G216A* hadde signifikant høyere score i forhold til oppmerksomhetssvikt hos individer som var homozygote for villtypen sett i forhold til homozygote for polymorfismen.

Konsekvensen av slike resultater kan bli at man i fremtiden bruker genetiske analyser som et verktøy i seleksjonsprosessen av hund. Et begrep som ”genetisk passende hund” kommer kanskje i vokabularet vårt i utvelgelsesprosessen av for eksempel førerhunder for blinde. Dette fordi en hund fra en i utgangspunktet rolig hunderase kan være et dårlig alternativ ved forekomst av polymorfismer linket mot avvikende adferd.

Alle resultatene i denne mastergradsoppgaven bør sjekkes i nye og større studier. Denne oppgaven opererte med et minimum av antall individer og man trenger en større studie for å bekrefte eller avkrefte disse resultatene.

## 6 Referanser

- Adlercreutz, C. J. (2003). "Teknologisk forlags store hundeleksikon."
- Aisner, D. L., W. E. Wright, m. fl. (2002). "Telomerase regulation: not just flipping the switch." Curr Opin Genet Dev **12**(1): 80-5.
- Andelfinger, G., C. Hitte, m. fl. (2004). "Detailed four-way comparative mapping and gene order analysis of the canine ctvm locus reveals evolutionary chromosome rearrangements." Genomics **83**(6): 1053-62.
- Andelfinger, G., K. N. Wright, m. fl. (2003). "Canine tricuspid valve malformation, a model of human Ebstein anomaly, maps to dog chromosome 9." J Med Genet **40**(5): 320-4.
- Arias-Carrion, O. og E. Poppel (2007). "Dopamine, learning, and reward-seeking behavior." Acta Neurobiol Exp (Wars) **67**(4): 481-8.
- Arimura, T., T. Hayashi, m. fl. (2004). "A Cypher/ZASP mutation associated with dilated cardiomyopathy alters the binding affinity to protein kinase C." J Biol Chem **279**(8): 6746-52.
- Armbruster, B. N., S. S. Banik, m. fl. (2001). "N-terminal domains of the human telomerase catalytic subunit required for enzyme activity in vivo." Mol Cell Biol **21**(22): 7775-86.
- Avilion, A. A., M. A. Piatyszek, m. fl. (1996). "Human telomerase RNA and telomerase activity in immortal cell lines and tumor tissues." Cancer Res **56**(3): 645-50.
- Bachand, F. og C. Autexier (2001). "Functional regions of human telomerase reverse transcriptase and human telomerase RNA required for telomerase activity and RNA-protein interactions." Mol Cell Biol **21**(5): 1888-97.
- Balciuniene, J., L. Emilsson, m. fl. (2002). "Investigation of the functional effect of monoamine oxidase polymorphisms in human brain." Hum Genet **110**(1): 1-7.
- Banik, S. S., C. Guo, m. fl. (2002). "C-terminal regions of the human telomerase catalytic subunit essential for in vivo enzyme activity." Mol Cell Biol **22**(17): 6234-46.
- Barger, G. og H. H. Dale (1910). "Chemical structure and sympathomimetic action of amines." J Physiol **41**(1-2): 19-59.
- Barr, C. L., K. G. Wigg, m. fl. (2000). "Further evidence from haplotype analysis for linkage of the dopamine D4 receptor gene and attention-deficit hyperactivity disorder." Am J Med Genet **96**(3): 262-7.
- Basso, C., P. R. Fox, m. fl. (2004). "Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy causing sudden cardiac death in boxer dogs: a new animal model of human disease." Circulation **109**(9): 1180-5.
- Beattie, T. L., W. Zhou, m. fl. (2000). "Polymerization defects within human telomerase are distinct from telomerase RNA and TEP1 binding." Mol Biol Cell **11**(10): 3329-40.
- Beattie, T. L., W. Zhou, m. fl. (2001). "Functional multimerization of the human telomerase reverse transcriptase." Mol Cell Biol **21**(18): 6151-60.
- Benjamin, J., L. Li, m. fl. (1996). "Population and familial association between the D4 dopamine receptor gene and measures of Novelty Seeking." Nat Genet **12**(1): 81-4.
- Benjamin, J., Y. Osher, m. fl. (2000). "An interaction between the catechol O-methyltransferase and serotonin transporter promoter region polymorphisms contributes to tridimensional personality questionnaire persistence scores in normal subjects." Neuropsychobiology **41**(1): 48-53.
- Bernheimer, H., W. Birkmayer, m. fl. (1973). "Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations." J Neurol Sci **20**(4): 415-55.

- Bernheimer, H. og O. Hornykiewicz (1965). "[Decreased homovanillic acid concentration in the brain in parkinsonian subjects as an expression of a disorder of central dopamine metabolism]." Klin Wochenschr **43**(13): 711-5.
- Berridge, K. C. og T. E. Robinson (1998). "What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience?" Brain Res Brain Res Rev **28**(3): 309-69.
- Berryere, T. G., J. A. Kerns, m. fl. (2005). "Association of an Agouti allele with fawn or sable coat color in domestic dogs." Mamm Genome **16**(4): 262-72.
- Bienengraeber, M., T. M. Olson, m. fl. (2004). "ABCC9 mutations identified in human dilated cardiomyopathy disrupt catalytic KATP channel gating." Nat Genet **36**(4): 382-7.
- Bismuth, K., D. Maric, m. fl. (2005). "MITF and cell proliferation: the role of alternative splice forms." Pigment Cell Res **18**(5): 349-59.
- Bjorklund, A. og S. B. Dunnett (2007). "Dopamine neuron systems in the brain: an update." Trends Neurosci **30**(5): 194-202.
- Bjornerfeldt, S., M. T. Webster, m. fl. (2006). "Relaxation of selective constraint on dog mitochondrial DNA following domestication." Genome Res **16**(8): 990-4.
- Blackburn, E. H. (1991). "Structure and function of telomeres." Nature **350**(6319): 569-73.
- Blasco, M. A. (2005). "Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond." Nat Rev Genet **6**(8): 611-22.
- Broccoli, D., J. W. Young, m. fl. (1995). "Telomerase activity in normal and malignant hematopoietic cells." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(20): 9082-6.
- Brouillette, J. A., J. R. Andrew, m. fl. (2000). "Estimate of nucleotide diversity in dogs with a pool-and-sequence method." Mamm Genome **11**(12): 1079-86.
- Brownlie, S. E. og M. A. Cobb (1999). "Observations on the development of congestive heart failure in Irish wolfhounds with dilated cardiomyopathy." J Small Anim Pract **40**(8): 371-7.
- Bruford, M. W., D. G. Bradley, m. fl. (2003). "DNA markers reveal the complexity of livestock domestication." Nat Rev Genet **4**(11): 900-10.
- Bryan, T. M., J. M. Sperger, m. fl. (1998). "Telomerase reverse transcriptase genes identified in *Tetrahymena thermophila* and *Oxytricha trifallax*." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(15): 8479-84.
- Bultman, S. J., M. L. Klebig, m. fl. (1994). "Molecular analysis of reverse mutations from nonagouti (a) to black-and-tan (a(t)) and white-bellied agouti (Aw) reveals alternative forms of agouti transcripts." Genes Dev **8**(4): 481-90.
- Burke, B. og C. L. Stewart (2002). "Life at the edge: the nuclear envelope and human disease." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(8): 575-85.
- Burkett, E. L. og R. E. Hershberger (2005). "Clinical and genetic issues in familial dilated cardiomyopathy." J Am Coll Cardiol **45**(7): 969-81.
- Cadile, C. D., B. E. Kitchell, m. fl. (2007). "Telomere length in normal and neoplastic canine tissues." Am J Vet Res **68**(12): 1386-91.
- Campisi, J. (1997). "Aging and cancer: the double-edged sword of replicative senescence." J Am Geriatr Soc **45**(4): 482-8.
- Candille, S. I., C. B. Kaelin, m. fl. (2007). "A  $\alpha$ -defensin mutation causes black coat color in domestic dogs." Science **318**(5855): 1418-23.
- Cardin, S., E. Libby, m. fl. (2007). "Contrasting gene expression profiles in two canine models of atrial fibrillation." Circ Res **100**(3): 425-33.
- Cardin, S., P. Pelletier, m. fl. (2008). "Marked differences between atrial and ventricular gene-expression remodeling in dogs with experimental heart failure." J Mol Cell Cardiol **45**(6): 821-31.

- Carioto, L. M., S. A. Kruth, m. fl. (2001). "Telomerase activity in clinically normal dogs and dogs with malignant lymphoma." Am J Vet Res **62**(9): 1442-6.
- Carlsson, A. (1959). "The occurrence, distribution and physiological role of catecholamines in the nervous system." Pharmacol Rev **11**(2, Part 2): 490-3.
- Caspi, A., J. McClay, m. fl. (2002). "Role of genotype in the cycle of violence in maltreated children." Science **297**(5582): 851-4.
- Castellanos, F. X., E. Lau, m. fl. (1998). "Lack of an association between a dopamine-4 receptor polymorphism and attention-deficit/hyperactivity disorder: genetic and brain morphometric analyses." Mol Psychiatry **3**(5): 431-4.
- Catalano, M., M. Nobile, m. fl. (1993). "Distribution of a novel mutation in the first exon of the human dopamine D4 receptor gene in psychotic patients." Biol Psychiatry **34**(7): 459-64.
- Cesare, A. J. og R. R. Reddel (2008). "Telomere uncapping and alternative lengthening of telomeres." Mech Ageing Dev **129**(1-2): 99-108.
- Chase, K., D. R. Carrier, m. fl. (2002). "Genetic basis for systems of skeletal quantitative traits: principal component analysis of the canid skeleton." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(15): 9930-5.
- Chintala, S., W. Li, m. fl. (2005). "Slc7a11 gene controls production of pheomelanin pigment and proliferation of cultured cells." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(31): 10964-9.
- Clark, L. A., A. N. Starr, m. fl. (2008). "Genome-wide linkage scan localizes the harlequin locus in the Great Dane to chromosome 9." Gene **418**(1-2): 49-52.
- Clark, L. A., J. M. Wahl, m. fl. (2006). "Retrotransposon insertion in SILV is responsible for merle patterning of the domestic dog." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(5): 1376-81.
- Clutton-Brock, J. og J. D. a. f. e. t. Clutton-Brock (1999). A natural history of domesticated mammals. Cambridge, U.K., Cambridge University Press.
- Cohen, N. og F. Muntoni (2004). "Multiple pathogenetic mechanisms in X linked dilated cardiomyopathy." Heart **90**(8): 835-41.
- Comeron, J. M., A. Williford, m. fl. (2008). "The Hill-Robertson effect: evolutionary consequences of weak selection and linkage in finite populations." Heredity **100**(1): 19-31.
- Cone, R. D., D. Lu, m. fl. (1996). "The melanocortin receptors: agonists, antagonists, and the hormonal control of pigmentation." Recent Prog Horm Res **51**: 287-317; discussion 318.
- Coppinger, R. og L. Coppinger (2001). Dogs : a startling new understanding of canine origin, behavior, and evolution. New York, Scribner.
- Counter, C. M., J. Gupta, m. fl. (1995). "Telomerase activity in normal leukocytes and in hematologic malignancies." Blood **85**(9): 2315-20.
- Cruz, F., C. Vila, m. fl. (2008). "The legacy of domestication: accumulation of deleterious mutations in the dog genome." Mol Biol Evol **25**(11): 2331-6.
- D'Adamo, P., L. Fassone, m. fl. (1997). "The X-linked gene G4.5 is responsible for different infantile dilated cardiomyopathies." Am J Hum Genet **61**(4): 862-7.
- Detweiler, D. K. og D. F. Patterson (1965). "The prevalence and types of cardiovascular disease in dogs." Ann N Y Acad Sci **127**(1): 481-516.
- Di Chiara, G. og V. Bassareo (2007). "Reward system and addiction: what dopamine does and doesn't do." Curr Opin Pharmacol **7**(1): 69-76.
- Distl, O., A. C. Vollmar, m. fl. (2007). "Complex segregation analysis of dilated cardiomyopathy (DCM) in Irish wolfhounds." Heredity **99**(4): 460-5.
- Domanjko-Petric A, S. P., Zemva A (2002). "Dilated cardiomyopathy in Dobermanns, survival, causes of death and pedigree review in a related line." Journal of Veterinary Cardiology **4**: 17-24.

- Drogemuller, C., U. Philipp, m. fl. (2007). "A noncoding melanophilin gene (MLPH) SNP at the splice donor of exon 1 represents a candidate causal mutation for coat color dilution in dogs." J Hered **98**(5): 468-73.
- Ducrest, A. L., M. Amacker, m. fl. (2001). "Regulation of human telomerase activity: repression by normal chromosome 3 abolishes nuclear telomerase reverse transcriptase transcripts but does not affect c-Myc activity." Cancer Res **61**(20): 7594-602.
- Dukes-McEwan (2003). "Proposed Guidelines for the Diagnosis of Canine Idiopathic Dilated Cardiomyopathy." Journal of Veterinary Cardiology(5): 17-19.
- Dulawa, S. C., D. K. Grandy, m. fl. (1999). "Dopamine D4 receptor-knock-out mice exhibit reduced exploration of novel stimuli." J Neurosci **19**(21): 9550-6.
- DuPaul, G. J., R. A. Ervin, m. fl. (1998). "Peer tutoring for children with attention deficit hyperactivity disorder: effects on classroom behavior and academic performance." J Appl Behav Anal **31**(4): 579-92.
- Ebstein, R. P., O. Novick, m. fl. (1996). "Dopamine D4 receptor (D4DR) exon III polymorphism associated with the human personality trait of Novelty Seeking." Nat Genet **12**(1): 78-80.
- Ebstein, R. P., R. Segman, m. fl. (1997). "5-HT2C (HTR2C) serotonin receptor gene polymorphism associated with the human personality trait of reward dependence: interaction with dopamine D4 receptor (D4DR) and dopamine D3 receptor (D3DR) polymorphisms." Am J Med Genet **74**(1): 65-72.
- Elbashir, S. M., W. Lendeckel, m. fl. (2001). "RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs." Genes Dev **15**(2): 188-200.
- Elbashir, S. M., J. Martinez, m. fl. (2001). "Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate." EMBO J **20**(23): 6877-88.
- Eliasson, K., I. Gustavsson, m. fl. (1967). "The meiotic chromosomes of the male dog (*Canis familiaris*)." Hereditas **58**(1): 135-7.
- Emanuel, R., K. O'Brien, m. fl. (1976). "Ebstein's anomaly. Genetic study of 26 families." Br Heart J **38**(1): 5-7.
- Everts, R. E., J. Rothuizen, m. fl. (2000). "Identification of a premature stop codon in the melanocyte-stimulating hormone receptor gene (MC1R) in Labrador and Golden retrievers with yellow coat colour." Anim Genet **31**(3): 194-9.
- Fatkin, D., C. MacRae, m. fl. (1999). "Missense mutations in the rod domain of the lamin A/C gene as causes of dilated cardiomyopathy and conduction-system disease." N Engl J Med **341**(23): 1715-24.
- Feng, J., W. D. Funk, m. fl. (1995). "The RNA component of human telomerase." Science **269**(5228): 1236-41.
- Fox, P. R., D. Sisson, m. fl. (1999). Textbook of canine and feline cardiology : principles and clinical practice. Philadelphia ; London, Saunders.
- Friedman, K. L. og T. R. Cech (1999). "Essential functions of amino-terminal domains in the yeast telomerase catalytic subunit revealed by selection for viable mutants." Genes Dev **13**(21): 2863-74.
- Fuchs, T., C. Gaillard, m. fl. (2005). "External factors and reproducibility of the behaviour test in German shepherd dogs in Switzerland." Applied Animal Behavior Science **94**: 287-301.
- Garpenstrand, H., N. Norton, m. fl. (2002). "A regulatory monoamine oxidase a promoter polymorphism and personality traits." Neuropsychobiology **46**(4): 190-3.
- Gear, K. og F. Marcus (2003). "Arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy." Circulation **107**(4): e31-3.

- Gingrich, J. A. og R. Hen (2001). "Dissecting the role of the serotonin system in neuropsychiatric disorders using knockout mice." Psychopharmacology (Berl) **155**(1): 1-10.
- Gomez, D., R. Paterski, m. fl. (2004). "Interaction of telomestatin with the telomeric single-strand overhang." J Biol Chem **279**(40): 41487-94.
- Gottowik, J., P. Malherbe, m. fl. (1995). "Structure/function relationships of mitochondrial monoamine oxidase A and B chimeric forms." Eur J Biochem **230**(3): 934-42.
- Greenberg, R. A., R. C. Allsopp, m. fl. (1998). "Expression of mouse telomerase reverse transcriptase during development, differentiation and proliferation." Oncogene **16**(13): 1723-30.
- Hakin-Smith, V., D. A. Jellinek, m. fl. (2003). "Alternative lengthening of telomeres and survival in patients with glioblastoma multiforme." Lancet **361**(9360): 836-8.
- Harley, C. B., A. B. Futcher, m. fl. (1990). "Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts." Nature **345**(6274): 458-60.
- Hashizume, C., K. Masuda, m. fl. (2005). "Identification of a cysteine-to-arginine substitution caused by a single nucleotide polymorphism in the canine monoamine oxidase B gene." J Vet Med Sci **67**(2): 199-201.
- Hashizume, C., M. Suzuki, m. fl. (2003). "Molecular cloning of canine monoamine oxidase subtypes A (MAOA) and B (MAOB) cDNAs and their expression in the brain." J Vet Med Sci **65**(8): 893-8.
- Hayashi, T., T. Arimura, m. fl. (2004). "Tcap gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy and dilated cardiomyopathy." J Am Coll Cardiol **44**(11): 2192-201.
- Hayflick, L. og P. S. Moorhead (1961). "The serial cultivation of human diploid cell strains." Exp Cell Res **25**: 585-621.
- Hedan, B., S. Corre, m. fl. (2006). "Coat colour in dogs: identification of the merle locus in the Australian shepherd breed." BMC Vet Res **2**: 9.
- Hejjas, K., J. Vas, m. fl. (2007). "Association of polymorphisms in the dopamine D4 receptor gene and the activity-impulsivity endophenotype in dogs." Anim Genet **38**(6): 629-33.
- Henson, J. D., J. A. Hannay, m. fl. (2005). "A robust assay for alternative lengthening of telomeres in tumors shows the significance of alternative lengthening of telomeres in sarcomas and astrocytomas." Clin Cancer Res **11**(1): 217-25.
- Hipple (2003). "Telomerase activity and related properties of normal canine lymph node and canine lymphoma." Veterinary and Comparative Oncology **Volume 1** (3): 140-151.
- Hiyama, E. og K. Hiyama (2003). "Telomerase as tumor marker." Cancer Lett **194**(2): 221-33.
- Hiyama, K., Y. Hirai, m. fl. (1995). "Activation of telomerase in human lymphocytes and hematopoietic progenitor cells." J Immunol **155**(8): 3711-5.
- Hoffmann, G., C. N. Amberger, m. fl. (2000). "[Tricuspid valve dysplasia in fifteen dogs]." Schweiz Arch Tierheilkd **142**(5): 268-77.
- Holtz, P. og E. Westermann (1956). "[Nerve tissue DOPA decarboxylase and histidine decarboxylase]." Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol **227**(6): 538-46.
- Horikawa, I., P. L. Cable, m. fl. (1999). "Cloning and characterization of the promoter region of human telomerase reverse transcriptase gene." Cancer Res **59**(4): 826-30.
- HUGO (2004). "Finishing the euchromatic sequence of the human genome." Nature **431**(7011): 931-45.
- Inoue-Murayama, M., N. Matsuura, m. fl. (2002). "Sequence comparison of the dopamine receptor D4 exon III repetitive region in several species of the order Carnivora." J Vet Med Sci **64**(8): 747-9.
- Ito, H., H. Nara, m. fl. (2004). "Allele frequency distribution of the canine dopamine receptor D4 gene exon III and I in 23 breeds." J Vet Med Sci **66**(7): 815-20.

- Itoh-Satoh, M., T. Hayashi, m. fl. (2002). "Titin mutations as the molecular basis for dilated cardiomyopathy." Biochem Biophys Res Commun **291**(2): 385-93.
- Jackson, I. J. (1988). "A cDNA encoding tyrosinase-related protein maps to the brown locus in mouse." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(12): 4392-6.
- Javerzat, S. og I. J. Jackson (1998). "White-based brown (Typr1B-w) is a dominant mutation causing reduced hair pigmentation owing to a chromosomal inversion." Mamm Genome **9**(6): 469-71.
- Jonasdottir, T. J., C. S. Mellers, m. fl. (2000). "Genetic mapping of a naturally occurring hereditary renal cancer syndrome in dogs." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(8): 4132-7.
- Kamisago, M., J. P. Schmitt, m. fl. (2006). "Sarcomere protein gene mutations and inherited heart disease: a beta-cardiac myosin heavy chain mutation causing endocardial fibroelastosis and heart failure." Novartis Found Symp **274**: 176-89; discussion 189-95, 272-6.
- Kamisago, M., S. D. Sharma, m. fl. (2000). "Mutations in sarcomere protein genes as a cause of dilated cardiomyopathy." N Engl J Med **343**(23): 1688-96.
- Kandel, E. R. (2001). "The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses." Science **294**(5544): 1030-8.
- Karlsson, E. K., I. Baranowska, m. fl. (2007). "Efficient mapping of mendelian traits in dogs through genome-wide association." Nat Genet **39**(11): 1321-8.
- Kerns, J. A. og T. G. Berryere (2005). "The Aaron B. Lerner Lecture: genetic of melanocortin signalling: barking up a new tree." Pigment Cell Research **18**((Suppl.1),2).
- Kerns, J. A., E. J. Cargill, m. fl. (2007). "Linkage and segregation analysis of black and brindle coat color in domestic dogs." Genetics **176**(3): 1679-89.
- Kerns, J. A., J. Newton, m. fl. (2004). "Characterization of the dog Agouti gene and a nonagouti mutation in German Shepherd Dogs." Mamm Genome **15**(10): 798-808.
- Khanna, C., K. Lindblad-Toh, m. fl. (2006). "The dog as a cancer model." Nat Biotechnol **24**(9): 1065-6.
- Kim, J. H., K. I. Kang, m. fl. (2005). "Color-dilution alopecia in dogs." J Vet Sci **6**(3): 259-61.
- Kim, M. Y., H. Vankayalapati, m. fl. (2002). "Telomestatin, a potent telomerase inhibitor that interacts quite specifically with the human telomeric intramolecular g-quadruplex." J Am Chem Soc **124**(10): 2098-9.
- Kim, N. W., M. A. Piatyszek, m. fl. (1994). "Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer." Science **266**(5193): 2011-5.
- Klinterberg, B., S. E. Levander, m. fl. (1987). "Neuropsychological correlates of platelet monoamine oxidase (MAO) activity in female and male subjects." Biol Psychol **24**(3): 237-52.
- Kosciolek, B. A., K. Kalantidis, m. fl. (2003). "Inhibition of telomerase activity in human cancer cells by RNA interference." Mol Cancer Ther **2**(3): 209-16.
- Kow, K., S. M. Bailey, m. fl. (2006). "Telomerase activity in canine osteosarcoma." J Vet Intern Med **22**(6): 1366-72.
- Kow, K., D. H. Thamm, m. fl. (2008). "Impact of telomerase status on canine osteosarcoma patients." J Vet Intern Med **22**(6): 1366-72.
- Kranzler, H. R., C. A. Hernandez-Avila, m. fl. (2002). "Polymorphism of the 5-HT1B receptor gene (HTR1B): strong within-locus linkage disequilibrium without association to antisocial substance dependence." Neuropsychopharmacology **26**(1): 115-22.
- Krotewicz, M. og A. Romaniuk (1995). "Social interactions in cats: regional brain monoamine distribution in dominant and submissive cats." Acta Neurobiol Exp (Wars) **55**(4): 271-9.

- Ku, W. C., A. J. Cheng, m. fl. (1997). "Inhibition of telomerase activity by PKC inhibitors in human nasopharyngeal cancer cells in culture." Biochem Biophys Res Commun **241**(3): 730-6.
- Kuramoto, M., K. Ohsumi, m. fl. (2001). "Identification and analyses of the *Xenopus* TERT gene that encodes the catalytic subunit of telomerase." Gene **277**(1-2): 101-10.
- Kyo, S. og M. Inoue (2002). "Complex regulatory mechanisms of telomerase activity in normal and cancer cells: how can we apply them for cancer therapy?" Oncogene **21**(4): 688-97.
- Kyo, S., M. Takakura, m. fl. (2000). "Sp1 cooperates with c-Myc to activate transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT)." Nucleic Acids Res **28**(3): 669-77.
- LaHoste, G. J., J. M. Swanson, m. fl. (1996). "Dopamine D4 receptor gene polymorphism is associated with attention deficit hyperactivity disorder." Mol Psychiatry **1**(2): 121-4.
- Lai, C. K., J. R. Mitchell, m. fl. (2001). "RNA binding domain of telomerase reverse transcriptase." Mol Cell Biol **21**(4): 990-1000.
- Langford, C. F., P. E. Fischer, m. fl. (1996). "Chromosome-specific paints from a high-resolution flow karyotype of the dog." Chromosome Res **4**(2): 115-23.
- Lappalainen, J., J. C. Long, m. fl. (1998). "Linkage of antisocial alcoholism to the serotonin 5-HT1B receptor gene in 2 populations." Arch Gen Psychiatry **55**(11): 989-94.
- Lee, C., C. Kim, m. fl. (2008). "The Dopamine D4 Receptor Polymorphism Affects the Canine Fearfulness." animal cells and system **12**: 77-83.
- Leonard, J. A., R. K. Wayne, m. fl. (2002). "Ancient DNA evidence for Old World origin of New World dogs." Science **298**(5598): 1613-6.
- Li, D., T. Tapscoft, m. fl. (1999). "Desmin mutation responsible for idiopathic dilated cardiomyopathy." Circulation **100**(5): 461-4.
- Li, S., H. Li, m. fl. (2007). "Expression of TGFbeta1 in pulmonary vein stenosis after radiofrequency ablation in chronic atrial fibrillation of dogs." Mol Biol Rep **36**(2): 221-5.
- Li, S., J. E. Rosenberg, m. fl. (2004). "Rapid inhibition of cancer cell growth induced by lentiviral delivery and expression of mutant-template telomerase RNA and anti-telomerase short-interfering RNA." Cancer Res **64**(14): 4833-40.
- Lindblad-Toh, K., C. M. Wade, m. fl. (2005). "Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog." Nature **438**(7069): 803-19.
- Lingner, J., T. R. Cech, m. fl. (1997). "Three Ever Shorter Telomere (EST) genes are dispensable for in vitro yeast telomerase activity." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(21): 11190-5.
- Little, C. C. (1957). The inheritance of coat color in dogs. Ithaca, N.Y., Comstock.
- Long, S. og D. J. Argyle (2007). "Inhibition of telomerase in canine cancer cells following telomestatin treatment." Veterinary and Comparative Oncology **5**(2): 99-107.
- Long, S., D. J. Argyle, m. fl. (2005). "The canine telomerase catalytic subunit (dogTERT): characterisation of the gene promoter and identification of proximal core sequences necessary for specific transcriptional activity in canine telomerase positive cell lines." Gene **358**: 111-20.
- Lund, J. R., M. Paoloni, m. fl. (2008). "Inhibition of canine telomerase in vitro and in vivo using RNAi: further development of a natural canine model for telomerase-based cancer therapies." Vet J **177**(2): 192-7.
- Løvås, G. G. (1999). "Statistikk for universiteter og høyskoler." **2. opplag 2005**.
- MacLennan, D. H. og E. G. Kranias (2003). "Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(7): 566-77.



- Manuck, S. B., J. D. Flory, m. fl. (1999). "Aggression and anger-related traits associated with a polymorphism of the tryptophan hydroxylase gene." Biol Psychiatry **45**(5): 603-14.
- Masuda, K., C. Hashizume, m. fl. (2004). "Breed differences in genotype and allele frequency of catechol O-methyltransferase gene polymorphic regions in dogs." J Vet Med Sci **66**(2): 183-7.
- McNair, W. P., L. Ku, m. fl. (2004). "SCN5A mutation associated with dilated cardiomyopathy, conduction disorder, and arrhythmia." Circulation **110**(15): 2163-7.
- Mellersh, C. (2008). "Give a dog a genome." Vet J **178**(1): 46-52.
- Metallinos, D. og J. Rine (2000). "Exclusion of EDNRB and KIT as the basis for white spotting in Border Collies." Genome Biol **1**(2): RESEARCH0004.
- Meurs, K. M., M. M. Ederer, m. fl. (2007). "Desmosomal gene evaluation in Boxers with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy." Am J Vet Res **68**(12): 1338-41.
- Meurs, K. M., K. P. Hendrix, m. fl. (2008). "Molecular evaluation of five cardiac genes in Doberman Pinschers with dilated cardiomyopathy." Am J Vet Res **69**(8): 1050-3.
- Meurs, K. M., A. L. Magnon, m. fl. (2001). "Evaluation of the cardiac actin gene in Doberman Pinschers with dilated cardiomyopathy." Am J Vet Res **62**(1): 33-6.
- Meurs, K. M., M. W. Miller, m. fl. (2001). "Clinical features of dilated cardiomyopathy in Great Danes and results of a pedigree analysis: 17 cases (1990-2000)." J Am Vet Med Assoc **218**(5): 729-32.
- Meurs, K. M., A. W. Spier, m. fl. (1999). "Familial ventricular arrhythmias in boxers." J Vet Intern Med **13**(5): 437-9.
- Meyerson, M., C. M. Counter, m. fl. (1997). "hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization." Cell **90**(4): 785-95.
- Miller, R., J. R. Wickens, m. fl. (1990). "Dopamine D-1 and D-2 receptors in relation to reward and performance: a case for the D-1 receptor as a primary site of therapeutic action of neuroleptic drugs." Prog Neurobiol **34**(2): 143-83.
- Miller, S. A., D. D. Dykes, m. fl. (1988). "A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells." Nucleic Acids Res **16**(3): 1215.
- Mogensen, J., R. T. Murphy, m. fl. (2004). "Severe disease expression of cardiac troponin C and T mutations in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy." J Am Coll Cardiol **44**(10): 2033-40.
- Moyzis, R. K., J. M. Buckingham, m. fl. (1988). "A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)<sub>n</sub>, present at the telomeres of human chromosomes." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(18): 6622-6.
- Murphy, R. T., J. Mogensen, m. fl. (2004). "Novel mutation in cardiac troponin I in recessive idiopathic dilated cardiomyopathy." Lancet **363**(9406): 371-2.
- Nakamura, T. M., G. B. Morin, m. fl. (1997). "Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human." Science **277**(5328): 955-9.
- Nasir, L. (2008). "Telomeres and telomerase: Biological and clinical importance in dogs." Vet J **175**(2): 155-63.
- Nasir, L., P. Devlin, m. fl. (2001). "Telomere lengths and telomerase activity in dog tissues: a potential model system to study human telomere and telomerase biology." Neoplasia **3**(4): 351-9.
- Nasir, L., E. Gault, m. fl. (2004). "Isolation and expression of the reverse transcriptase component of the Canis familiaris telomerase ribonucleoprotein (dogTERT)." Gene **336**(1): 105-13.
- Newton, J. M., A. L. Wilkie, m. fl. (2000). "Melanocortin 1 receptor variation in the domestic dog." Mamm Genome **11**(1): 24-30.

- Nigro, V., Y. Okazaki, m. fl. (1997). "Identification of the Syrian hamster cardiomyopathy gene." Hum Mol Genet **6**(4): 601-7.
- Niimi, Y., M. Inoue-Murayama, m. fl. (2001). "Breed differences in allele frequency of the dopamine receptor D4 gene in dogs." J Hered **92**(5): 433-6.
- Niimi, Y., M. Inoue-Murayama, m. fl. (1999). "Allelic variation of the D4 dopamine receptor polymorphic region in two dog breeds, Golden retriever and Shiba." J Vet Med Sci **61**(12): 1281-6.
- Noble, E. P., T. Z. Ozkaragoz, m. fl. (1998). "D2 and D4 dopamine receptor polymorphisms and personality." Am J Med Genet **81**(3): 257-67.
- Ogata, N., C. Hashizume, m. fl. (2006). "Polymorphisms in the canine glutamate transporter-1 gene: identification and variation among five dog breeds." J Vet Med Sci **68**(2): 157-9.
- Okumura, N., N. Ishiguro, m. fl. (1996). "Intra- and interbreed genetic variations of mitochondrial DNA major non-coding regions in Japanese native dog breeds (Canis familiaris)." Anim Genet **27**(6): 397-405.
- Olivier, M. og G. Lust (1998). "Two DNA sequences specific for the canine Y chromosome." Anim Genet **29**(2): 146-9.
- Olson, T. M., S. Illenberger, m. fl. (2002). "Metavinculin mutations alter actin interaction in dilated cardiomyopathy." Circulation **105**(4): 431-7.
- Olson, T. M., V. V. Michels, m. fl. (1998). "Actin mutations in dilated cardiomyopathy, a heritable form of heart failure." Science **280**(5364): 750-2.
- Oreland, L. og J. Hallman (1995). "The correlation between platelet MAO activity and personality: short review of findings and a discussion on possible mechanisms." Prog Brain Res **106**: 77-84.
- Ostrander, E. A., U. Giger, m. fl. (2005). The dog and its genome. New York ; Bloxham, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Oyama, M. A., S. Reiken, m. fl. (2008). "Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy in Boxer dogs is associated with calstabin2 deficiency." J Vet Cardiol **10**(1): 1-10.
- Pape, H. (1990). "The inheritance of the piebald spotting pattern and its variation in Holstein-Friesian cattle and in Landseer-Newfoundland dogs." Genetica **80**(2): 115-28.
- Park, A. M., C. C. Chou, m. fl. (2004). "Thoracic vein ablation terminates chronic atrial fibrillation in dogs." Am J Physiol Heart Circ Physiol **286**(6): H2072-7.
- Parker, H. G., L. V. Kim, m. fl. (2004). "Genetic structure of the purebred domestic dog." Science **304**(5674): 1160-4.
- Parker, H. G., K. M. Meurs, m. fl. (2006). "Finding cardiovascular disease genes in the dog." J Vet Cardiol **8**(2): 115-27.
- Parker, H. G. S., N. B. Ostrander, E. A. (2006). "Understanding Genetic Relationships among Purebred Dogs: The PhyDo Project." COLD SPRING HARBOR MONOGRAPH SERIES **44**: 141-158.
- Pessiglione, M., B. Seymour, m. fl. (2006). "Dopamine-dependent prediction errors underpin reward-seeking behaviour in humans." Nature **442**(7106): 1042-5.
- Philipp, U., C. Broschk, m. fl. (2007). "Evaluation of tafazzin as candidate for dilated cardiomyopathy in Irish wolfhounds." J Hered **98**(5): 506-9.
- Philipp, U., H. Hamann, m. fl. (2005). "Polymorphisms within the canine MLPH gene are associated with dilute coat color in dogs." BMC Genet **6**: 34.
- Philipp, U., A. Vollmar, m. fl. (2008). "Evaluation of six candidate genes for dilated cardiomyopathy in Irish wolfhounds." Anim Genet **39**(1): 88-9.
- Philipp, U., A. Vollmar, m. fl. (2008). "Evaluation of the titin-cap gene (TCAP) as candidate for dilated cardiomyopathy in Irish wolfhounds." Anim Biotechnol **19**(4): 231-6.
- Plasterk, R. H. og R. F. Ketting (2000). "The silence of the genes." Curr Opin Genet Dev **10**(5): 562-7.

- Poole, J. C., L. G. Andrews, m. fl. (2001). "Activity, function, and gene regulation of the catalytic subunit of telomerase (hTERT)." Gene **269**(1-2): 1-12.
- Price, T. D. og A. B. Gebauer (1995). Last hunters, first farmers : new perspectives on the prehistoric transition to agriculture : Seminar : Papers. Santa Fe, N.M., School of American Research Press.
- Rampazzo, A., A. Nava, m. fl. (2002). "Mutation in human desmoplakin domain binding to plakoglobin causes a dominant form of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy." Am J Hum Genet **71**(5): 1200-6.
- Reddel, R. R., T. M. Bryan, m. fl. (2001). "Alternative lengthening of telomeres in human cells." Radiat Res **155**(1 Pt 2): 194-200.
- Reisner, I. R., J. J. Mann, m. fl. (1996). "Comparison of cerebrospinal fluid monoamine metabolite levels in dominant-aggressive and non-aggressive dogs." Brain Res **714**(1-2): 57-64.
- Renaud, S., F. T. Bosman, m. fl. (2003). "Implication of the exon region in the regulation of the human telomerase reverse transcriptase gene promoter." Biochem Biophys Res Commun **300**(1): 47-54.
- Renwick, A. D. J. (2006). "Telomerase activity and telomerase reverse transcriptase catalytic subunit expression in canine lymphoma: correlation with Ki67 immunoreactivity." Veterinary Comparative Oncology **4**: 141-150.
- Richman, M., C. S. Mellersh, m. fl. (2001). "Characterization of a minimal screening set of 172 microsatellite markers for genome-wide screens of the canine genome." J Biochem Biophys Methods **47**(1-2): 137-49.
- Rieder, S., S. Taourit, m. fl. (2001). "Mutations in the agouti (ASIP), the extension (MC1R), and the brown (TYRP1) loci and their association to coat color phenotypes in horses (*Equus caballus*)." Mamm Genome **12**(6): 450-5.
- Rodier, F., S. H. Kim, m. fl. (2005). "Cancer and aging: the importance of telomeres in genome maintenance." Int J Biochem Cell Biol **37**(5): 977-90.
- Rothschild, M. F., P. S. Van Cleave, m. fl. (2006). "Association of MITF with white spotting in Beagle crosses and Newfoundland dogs." Anim Genet **37**(6): 606-7.
- Saetre, P., J. Lindberg, m. fl. (2004). "From wild wolf to domestic dog: gene expression changes in the brain." Brain Res Mol Brain Res **126**(2): 198-206.
- Safra, N., R. H. Schaible, m. fl. (2006). "Linkage analysis with an interbreed backcross maps Dalmatian hyperuricosuria to CFA03." Mamm Genome **17**(4): 340-5.
- Sallander, M. H., A. Hedhammar, m. fl. (2001). "Repeatability and validity of a combined mail and telephone questionnaire on demographics, diet, exercise and health status in an insured-dog population." Prev Vet Med **50**(1-2): 35-51.
- Sanders, R. P., R. Drissi, m. fl. (2004). "Telomerase expression predicts unfavorable outcome in osteosarcoma." J Clin Oncol **22**(18): 3790-7.
- Schmutz, S. M. og T. G. Berryere (2007). "Genes affecting coat colour and pattern in domestic dogs: a review." Anim Genet **38**(6): 539-49.
- Schmutz, S. M. og T. G. Berryere (2007). "The genetics of cream coat color in dogs." J Hered **98**(5): 544-8.
- Schmutz, S. M., T. G. Berryere, m. fl. (2007). "Agouti sequence polymorphisms in coyotes, wolves and dogs suggest hybridization." J Hered **98**(4): 351-5.
- Schmutz, S. M., T. G. Berryere, m. fl. (2003). "MC1R studies in dogs with melanistic mask or brindle patterns." J Hered **94**(1): 69-73.
- Schmutz, S. M., T. G. Berryere, m. fl. (2002). "TYRP1 and MC1R genotypes and their effects on coat color in dogs." Mamm Genome **13**(7): 380-7.
- Seal, U. S., N. I. Phillips, m. fl. (1970). "Carnivora systematics: immunological relationships of bear serum albumins." Comp Biochem Physiol **32**(1): 33-48.

- Seitz, J. J., S. M. Schmutz, m. fl. (1999). "A missense mutation in the bovine MGF gene is associated with the roan phenotype in Belgian Blue and Shorthorn cattle." Mamm Genome **10**(7): 710-2.
- Sharma, D. K., J. E. Maldonado, m. fl. (2004). "Ancient wolf lineages in India." Proc Biol Sci **271 Suppl 3**: S1-4.
- Shay, J. W. og S. Bacchetti (1997). "A survey of telomerase activity in human cancer." Eur J Cancer **33**(5): 787-91.
- Shih, J. C., K. Chen, m. fl. (1999). "Monoamine oxidase: from genes to behavior." Annu Rev Neurosci **22**: 197-217.
- Sponenberg, D. P. (1985). "Inheritance of the harlequin color in Great Dane dogs." J Hered **76**(3): 224-5.
- Stabej, P. (2005). "Molecular Genetics of Dilated Cardiomyopathy in the Dobermann Dog." In PhD thesis University of Utrecht, Faculty of Veterinary Medicine, Dept of Clinical Sciences of Companion Animal.
- Stabej, P., S. Imholz, m. fl. (2004). "Characterization of the canine desmin (DES) gene and evaluation as a candidate gene for dilated cardiomyopathy in the Dobermann." Gene **340**(2): 241-9.
- Stabej, P., P. A. Leegwater, m. fl. (2005). "The canine sarcoglycan delta gene: BAC clone contig assembly, chromosome assignment and interrogation as a candidate gene for dilated cardiomyopathy in Dobermann dogs." Cytogenet Genome Res **111**(2): 140-6.
- Stabej, P., P. A. Leegwater, m. fl. (2005). "Evaluation of the phospholamban gene in purebred large-breed dogs with dilated cardiomyopathy." Am J Vet Res **66**(3): 432-6.
- Steinberg, J. S. (2004). "Atrial fibrillation: an emerging epidemic?" Heart **90**(3): 239-40.
- Sui, G., C. Soohoo, m. fl. (2002). "A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(8): 5515-20.
- Suomalainen, A., A. Paetau, m. fl. (1992). "Inherited idiopathic dilated cardiomyopathy with multiple deletions of mitochondrial DNA." Lancet **340**(8831): 1319-20.
- Syrris, P., D. Ward, m. fl. (2006). "Arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy associated with mutations in the desmosomal gene desmocollin-2." Am J Hum Genet **79**(5): 978-84.
- Takakura, M., S. Kyo, m. fl. (1999). "Cloning of human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene promoter and identification of proximal core promoter sequences essential for transcriptional activation in immortalized and cancer cells." Cancer Res **59**(3): 551-7.
- Takakura, M., S. Kyo, m. fl. (2001). "Telomerase activation by histone deacetylase inhibitor in normal cells." Nucleic Acids Res **29**(14): 3006-11.
- Tan, E. C., S. A. Chong, m. fl. (2001). "Susceptibility to neuroleptic-induced tardive dyskinesia and the T102C polymorphism in the serotonin type 2A receptor." Biol Psychiatry **50**(2): 144-7.
- Tauchi, T., K. Shin-Ya, m. fl. (2003). "Activity of a novel G-quadruplex-interactive telomerase inhibitor, telomestatin (SOT-095), against human leukemia cells: involvement of ATM-dependent DNA damage response pathways." Oncogene **22**(34): 5338-47.
- Templeton (1977). "Coat colour genetics in the Labradrador retriever." Journal of Heredity **68**: 134-6.
- Tidholm, A. (1997). "Retrospective study of congenital heart defects in 151 dogs." J Small Anim Pract **38**(3): 94-8.
- Tidholm, A., J. Haggstrom, m. fl. (2000). "Detection of attenuated wavy fibers in the myocardium of Newfoundlands without clinical or echocardiographic evidence of heart disease." Am J Vet Res **61**(3): 238-41.

- Tidholm, A. og L. Jonsson (1996). "Dilated cardiomyopathy in the Newfoundland: a study of 37 cases (1983-1994)." J Am Anim Hosp Assoc **32**(6): 465-70.
- Tiso, N., D. A. Stephan, m. fl. (2001). "Identification of mutations in the cardiac ryanodine receptor gene in families affected with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 2 (ARVD2)." Hum Mol Genet **10**(3): 189-94.
- Topal, J., A. Miklosi, m. fl. (1998). "Attachment behavior in dogs (*Canis familiaris*): a new application of Ainsworth's (1969) Strange Situation Test." J Comp Psychol **112**(3): 219-29.
- Tsai, K. L., L. A. Clark, m. fl. (2007). "Understanding hereditary diseases using the dog and human as companion model systems." Mamm Genome **18**(6-7): 444-51.
- Udono, T., K. Yasumoto, m. fl. (2000). "Structural organization of the human microphthalmia-associated transcription factor gene containing four alternative promoters." Biochim Biophys Acta **1491**(1-3): 205-19.
- Ulaner, G. A. og L. C. Giudice (1997). "Developmental regulation of telomerase activity in human fetal tissues during gestation." Mol Hum Reprod **3**(9): 769-73.
- Ulaner, G. A., H. Y. Huang, m. fl. (2003). "Absence of a telomere maintenance mechanism as a favorable prognostic factor in patients with osteosarcoma." Cancer Res **63**(8): 1759-63.
- Utdanningsdirektoratet (2006). "Læreplaner."
- Vage, J. og F. Lingaas (2008). "Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in coding regions of canine dopamine- and serotonin-related genes." BMC Genet **9**: 10.
- van den Berg, L., S. Imholz, m. fl. (2004). "Isolation and characterization of the canine serotonin receptor 1B gene (*htr1B*)." Gene **326**: 131-9.
- van den Berg, L., L. Kwant, m. fl. (2005). "Structure and variation of three canine genes involved in serotonin binding and transport: the serotonin receptor 1A gene (*htr1A*), serotonin receptor 2A gene (*htr2A*), and serotonin transporter gene (*slc6A4*)." J Hered **96**(7): 786-96.
- van den Berg, L., S. A. Versteeg, m. fl. (2003). "Isolation and characterization of the canine serotonin receptor 1A gene (*htr1A*)." J Hered **94**(1): 49-56.
- van den Berg, L., M. Vos-Loohuis, m. fl. (2008). "Evaluation of the serotonergic genes *htr1A*, *htr1B*, *htr2A*, and *slc6A4* in aggressive behavior of golden retriever dogs." Behav Genet **38**(1): 55-66.
- van Hagen, M. A., J. van der Kolk, m. fl. (2004). "Analysis of the inheritance of white spotting and the evaluation of *KIT* and *EDNRB* as spotting loci in Dutch boxer dogs." J Hered **95**(6): 526-31.
- Van Tol, H. H., J. R. Bunzow, m. fl. (1991). "Cloning of the gene for a human dopamine D4 receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine." Nature **350**(6319): 610-4.
- Vandenbergh, D. J., A. B. Zonderman, m. fl. (1997). "No association between novelty seeking and dopamine D4 receptor (*D4DR*) exon III seven repeat alleles in Baltimore Longitudinal Study of Aging participants." Mol Psychiatry **2**(5): 417-9.
- Vas, T. J., m. fl. (2007). "Measuring attention deficit and activity in dogs: A new application and validation of a human ADHD questionnaire." Applied Animal Behavior Science **103**: 105-17.
- Vila, C., I. R. Amorim, m. fl. (1999). "Mitochondrial DNA phylogeography and population history of the grey wolf *Canis lupus*." Mol Ecol **8**(12): 2089-103.
- Vila, C., P. Savolainen, m. fl. (1997). "Multiple and ancient origins of the domestic dog." Science **276**(5319): 1687-9.
- Vila, C., A. K. Sundqvist, m. fl. (2003). "Rescue of a severely bottlenecked wolf (*Canis lupus*) population by a single immigrant." Proc Biol Sci **270**(1510): 91-7.

- Vollmar, A. C. (2000). "The prevalence of cardiomyopathy in the Irish wolfhound: a clinical study of 500 dogs." J Am Anim Hosp Assoc **36**(2): 125-32.
- von Bomhard, W., E. A. Mauldin, m. fl. (2006). "Black hair follicular dysplasia in Large Munsterlander dogs: clinical, histological and ultrastructural features." Vet Dermatol **17**(3): 182-8.
- Vrieling, H., D. M. Duhl, m. fl. (1994). "Differences in dorsal and ventral pigmentation result from regional expression of the mouse agouti gene." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(12): 5667-71.
- Watson, J. D. (1972). "Origin of concatemeric T7 DNA." Nat New Biol **239**(94): 197-201.
- Wayne, R. K. (1986). "Limb morphology of domestic and wild canids: the influence of development on morphologic change." J Morphol **187**(3): 301-19.
- Wayne, R. K. og E. A. Ostrander (2007). "Lessons learned from the dog genome." Trends Genet **23**(11): 557-67.
- Wehrens, X. H. og A. R. Marks (2003). "Altered function and regulation of cardiac ryanodine receptors in cardiac disease." Trends Biochem Sci **28**(12): 671-8.
- Weinrich, S. L., R. Pruzan, m. fl. (1997). "Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTRT." Nat Genet **17**(4): 498-502.
- Werner, P., M. G. Raducha, m. fl. (2008). "A novel locus for dilated cardiomyopathy maps to canine chromosome 8." Genomics **91**(6): 517-21.
- Wheater, C. P. og P. A. Cook (2000). Using statistics to understand the environment. London, Routledge.
- Wick, M., D. Zubov, m. fl. (1999). "Genomic organization and promoter characterization of the gene encoding the human telomerase reverse transcriptase (hTERT)." Gene **232**(1): 97-106.
- Wiersma, A. C., P. A. Leegwater, m. fl. (2007). "Canine candidate genes for dilated cardiomyopathy: annotation of and polymorphic markers for 14 genes." BMC Vet Res **3**: 28.
- Wiersma, A. C., P. Stabej, m. fl. (2008). "Evaluation of 15 candidate genes for dilated cardiomyopathy in the Newfoundland dog." J Hered **99**(1): 73-80.
- Wright, W. E., M. A. Piatyszek, m. fl. (1996). "Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells." Dev Genet **18**(2): 173-9.
- Xia, J., Y. Peng, m. fl. (2000). "Identification of functionally important domains in the N-terminal region of telomerase reverse transcriptase." Mol Cell Biol **20**(14): 5196-207.
- Xu, D., N. Popov, m. fl. (2001). "Switch from Myc/Max to Mad1/Max binding and decrease in histone acetylation at the telomerase reverse transcriptase promoter during differentiation of HL60 cells." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(7): 3826-31.
- Yazawa, M., M. Okuda, m. fl. (2001). "Telomere length and telomerase activity in canine mammary gland tumors." Am J Vet Res **62**(10): 1539-43.
- Zdarsky, E., J. Favor, m. fl. (1990). "The molecular basis of brown, an old mouse mutation, and of an induced revertant to wild type." Genetics **126**(2): 443-9.
- Zhao, Y. Y., Y. Liu, m. fl. (2002). "Defects in caveolin-1 cause dilated cardiomyopathy and pulmonary hypertension in knockout mice." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(17): 11375-80.

## 7 Appendiks

### **7.1 Appendiks A Innsamling og klargjøring av Whatman Indicating FTA® Micro kort**

Prosedyre for innsamling av munnhulselleprøver ved hjelp av Whatman Indicating FTA® Micro kort og klargjøring av Whatman FTA-disk til PCR

#### Innsamling av munnhulsceller ved hjelp av Whatman Indicating FTA® Micro kort

1. Ta på et par engangshansker
2. Plasser Whatman Indicating FTA® Micro kortet på en ren, tørr og flat overflate.
3. Ta ut en svaber fra pakken.
4. Hold på håndtaket på svaberen og før den fram og tilbake med den ene siden av svaberne på innsiden av det ene kinnet
5. Gjenta punkt 4. på det andre kinnet med den andre siden av svaberen.
6. Trykk en av sidene på svaberen ned på Whatman Indicating FTA® Micro kortet fram og tilbake 3 ganger uten å løfte den opp og ned, snu så svaberen og trykk den andre siden ned 3 ganger uten å løfte den opp og ned.
7. La Whatman Indicating FTA® Micro kortet tørke 1 time ved romtemperatur.
8. Oppbevar lappen på et tørt og mørkt sted.

#### Klargjøring av Whatman Indicating FTA® Micro kort til DNA-analyse

1. Stamp ut en disk ( $d = 2.0$  mm) fra den tørre Whatman Indicating FTA® Micro kortet med munnhulsceller.
2. Putt disken opp i eppendorfrør
3. Tilsett 200  $\mu$ l med FTA rensevæske til røret
4. La det stå i 5 minutter ved romtemperatur
5. Fjern all væsken ved hjelp av en pipette
6. Gjenta steg 3-5 to ganger til, totalt 3 vask med rensevæske
7. Tilsett 200  $\mu$ l med (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 8.0)
8. La stå i 5 minutter ved romtemperatur

9. Fjern all væsken ved hjelp av en pipette
10. Gjenta steg 7-9 en gang til, totalt to ganger med TE<sup>-1</sup>buffer.
11. Tørk Whatman FTA-disken 1t i romtemperatur, evt. 10 min ved 56 °C
12. Whatman FTA-disken er klar for PCR-miks på totalt 50 µl



## 7.2 Appendiks B – Informasjon om oppgaven og spørreskjema om hundenes adferd som ble gitt til hundeeierne



Bø, 6/9-2008

### Kartlegging av adferdsgen hos ulike raser hund (*Canis lupus familiaris*)

Hei, mitt navn er Eirik Hvaara og jeg skriver en masteroppgave ved Institutt for natur, helse og miljø ved Høgskolen i Telemark. Oppgavens problemstilling omhandler ulike adferdsgen hos hund.

For å kunne kartlegge ulike gen trenger jeg hudceller fra munnen til hunden. Disse samles inn ved hjelp av en svaber som strykes mot hundens munnhule. **OBS! Hunden må ikke ha matrester i munnen.**

Itillegg fylles et kort spørreskjema ut som omhandler hundens adferd og evt. opplæring.

Håper på positivt svar

---

Eirik Hvaara

Har du stamtavle til hunden? Hvis mulig, send den på mail til [935008@student.hit.no](mailto:935008@student.hit.no)

## Kartlegging av adferd hos hund (*canis lupus familiaris*)

Navn på eier: \_\_\_\_\_  
 Navn på hund: \_\_\_\_\_ Kjønn: \_\_\_\_\_ Rase: \_\_\_\_\_  
 Fødselsdato og fødselsår på hund: \_\_\_\_\_  
 Er det en familiehund eller en kennelhund? \_\_\_\_\_

Spørsmål	Aldri ofte	Noen ganger	Ofte	Svært
1. Din hund har vanskeligheter med å lære, fordi den lett blir distraheret	0	1	2	3
2. Det er lett å få din hunds oppmerksomhet, men den mister interessen fort	0	1	2	3
3. Den har vanskeligheter med å konsentrere seg på en oppgave eller å leke	0	1	2	3
4. Den forlater sin plass når den ikke får lov	0	1	2	3
5. Den kan ikke være stille, den er vanskelig å roe	0	1	2	3
6. Den bjeffer hele tiden	0	1	2	3
7. Det virker som om den ikke hører etter selv om den vet at noen snakker til den	0	1	2	3
8. Den er voldsom, vanskelig å kontrollere og ved anfall er den vanskelig å kontrollere	0	1	2	3
9. Den løser enkle oppgaver lett, men har ofte vanskeligheter med kompliserte oppgaver, selv om han kjenner oppgavene og har trent på dem ofte	0	1	2	3
10. Den reagerer forhastet og det er derfor den mislykkes med oppgaver	0	1	2	3
11. Dens oppmerksomhet kan lett bli distraheret	0	1	2	3
12. Den kan ikke vente, det er som om den ikke har selvkontroll	0	1	2	3

Kvalifikasjonstrening som hunden har hatt

(vennligst marker med **D** for deltatt eller **B** for bestått):

Lydighetstrening: \_\_\_\_\_ Beskyttelsestrening (Shutzhund): \_\_\_\_\_

Agility: \_\_\_\_\_ Jakttrening: \_\_\_\_\_

Trening hjemme: \_\_\_\_\_ Ikke noen form for trening: \_\_\_\_\_

Noe annet,

som: \_\_\_\_\_

### 7.3 Appendiks C Kjemikalier

Tris-HCl pH 8.0	80 ml H <sub>2</sub> O 12.1 g Tris pH justert til 8.0 ved hjelp av HCl Fyll opp til 100 ml med H <sub>2</sub> O
EDTA (0.5 M) pH 8.0 50 ml	9.3 g EDTA løses i 30 ml dH <sub>2</sub> O ved hjelp av magnetrør pH justeres til 8.0 ved hjelp av 5 M NaOH Fyll opp til 50 ml med H <sub>2</sub> O
TE <sup>-1</sup> -buffer (10 mM Tris, 0.1 mM EDTA) pH 8.0 500ml	5.0 1 M Tris pH 8.0 100 µl 0.5 M EDTA pH 8.0 dH <sub>2</sub> O til et sluttvolum på 500 ml
Akrylamid/Bis 6 % bruksløsning (100 ml)	83 ml H <sub>2</sub> O 15 ml Acrylamid/bis løsning, 40 % (ratio 29:1) 2 ml 50xTAE-buffer
TEMED	Ferdig løsning fra Bio-Rad
10 % APS (ammonium persulfat)	1 gram APS løses i 10 ml dH <sub>2</sub> O
Polyakrylamidgel	7-7.5 ml Acrylamid/Bis 6 % bruksløsning 10 .0 µl TEMED 80.0 µl 10 % APS
Stige	Ferdig løsning fra ABgene © blandet med loadingdye 1:5
Loading dye 6x	Ferdig løsning fra ABgene ©
Etidiumbromid 0.5 µg/ml (200ml)	En dråpe Etidiumbromid (10mg/ml) i 200 ml dH <sub>2</sub> O