

Molekylärgenetisk analys av dilaterad cardiomyopati hos hund

Anja Kanold

**Handledare: Göran Andersson
Inst. för husdjursgenetik
Biträdande handledare: Åke Hedhammar
Inst. för kirurgi och medicin, smådjur
Nicolette Salmon Hillbertz
Inst. för husdjursgenetik**

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

1. Abstract.....	4
2. Inledning.....	5
3. Material och metoder.....	8
3.1 Bioinformatik.....	8
3.2 DNA extraktion.....	10
3.3 Polymerase Chain Reaction (PCR).....	10
3.4 Agarosgelelektrofores.....	12
3.5 Gel-extraktion.....	13
3.6 Sekvensering.....	14
3.7 Urval av prover	14
4. Resultat och diskussion.....	15
5. Litteraturförteckning.....	17
6. Tack till.....	19

1. ABSTRACT

Canine dilated cardiomyopathy (DCM) is a disease with high morbidity and mortality and with a high prevalence in certain breeds. Predominantly large breeds are affected, such as Great Danes, Newfoundlands, Deerhounds and Dobermanns. One exception is Cocker spaniels, where both American and English Cocker spaniels are affected in a quite high frequency.

Cardiomyopathy is characterised as a disease that affects the myocardium and gives an impaired heart function. To diagnose DCM following criteria have to be observed:

1. Dilation of the left ventricle.
2. Reduced systolic heart function.
3. Increased sphericity of the left ventricle.

To be certain of the diagnosis, alternative reasons for the symptoms such as lung- and heart diseases with other etiologies have to be excluded

Two different types of DCM have been found upon histological examination. One type where the myocytes are thinner than normal and have a wavy appearance – attenuated wavy fibers. There has also been observed a space between the myocytes which indicates edematous fluid.

The alternative histological findings are infiltrates of fatty- and connective tissue.

Since this is a disease of great suffering both for the dog and for its owner it would be of great interest to find the altered genes that give an increased risk to develop this disease.

Our study was done in a family of Newfoundlands where certain individuals were diagnosed with DCM of the wavy fibers type. Blood samples from dogs representing a few generations were available to us. We started our study with a candidate gene approach, and the gene of our choice was *desmin*, since it has been documented to be the cause of DCM in certain studies of human families. The histological appearance also indicated that a protein in the cytoskeleton is involved in the disease.

The *desmin* gene was analysed in a few individuals by Polymerase Chain Reaction (PCR) and nucleotide sequencing of exon 8 in the *desmin* gene. When analysing our results we found a Single Nucleotide Polymorphism (SNP). The SNP was evaluated for genetic association to DCM. However, the SNP did not cause any change in amino acids and neither of the alleles showed association with DCM.

The identified SNP can be used in future association mapping studies in a larger Newfoundland population to conclusively exclude *desmin* as a disease gene for DCM.

2. INLEDNING

Dilaterad cardiomyopati (DCM) är en sjukdom med hög morbiditet och mortalitet hos hund. Sjukdomen har hög prevalens inom vissa raser. Företrädelsevis drabbas storväxta raser såsom Grand danois, Newfoundlandshund, Hjorthund och Dobermann. Undantaget är Cockerspaniel, där både Amerikansk och Engelsk cockerspaniel är drabbade i förhållandevis hög frekvens, trots att dessa raser kan betraktas som relativt småväxta. (Dukes Mc Ewan, J *et al.* 2003.) Vad gäller könsfördelning bland de sjuka individerna har en viss övervikt av handjur observerats vid en fallstudie på flera raser. (Tidholm, A., Jönsson, L., 1997; Tidholm, A. *et al.* 1997.) Denna skillnad kunde dock inte observeras vid en studie som inriktat sig enbart på Newfoundlandshundar. (Tidholm, A.; Jönsson, L. 1996.)

Cardiomyopati karaktäriseras som en grupp av sjukdomar som drabbar myocardiet och som ger en försämrad hjärtverksamhet. För diagnosen DCM krävs följande kliniska diagnoskriterier:

1. Dilatation av vänster kammare.
2. Reducerad funktion under systole.
3. Ökad sfäricitet hos vänster kammare.

Innan säker diagnos ställs måste alternativa orsaker till symptomen uteslutas, exempelvis annan hjärt- eller lungsjukdom. Själva insjuknandet sker ofta till synes akut med bl.a. hosta, andningsbesvär, anorexi, ascites och trötthet. Dock föregås detta av en lång preklinisk fas då sjukdomen normalt ej säkert kan diagnostiseras. (Dukes Mc Ewan, J *et al.* 2003 ; Tidholm, A. 2000.) Prognosen för överlevnadstid efter diagnos skiljer sig mellan olika raser där t.ex. Portugisisk vattenhund, som drabbas av en juvenil form av DCM, har den kortaste överlevnadstiden efter diagnos med endast 1-5 dagar, medan t.ex. Newfoundlandshund har en överlevnadstid på fem månader efter diagnos. (Stabej, P *et al.* 2006.) Den faktor som har störst inverkan på överlevnadstiden efter diagnos är ålder vid insjuknandet. Där finns ett klart samband mellan låg ålder vid insjuknandet och kort överlevnadstid. (Tidholm, A. *et al.* 1997; Tidholm, A. 2000.)

Kammartakykardi samt VPD (ventrikulär prematur depolarisering) diagnosticeras i hög frekvens hos Dobermann och i viss mån Boxer. Den vanligaste typen av hjärtarrytmi hos övriga raser är förmaksflimmer. (Tidholm, A., Jönsson, L. 1997; Tidholm, A. 2000.) Dessa olikheter i fenotyp och etiologi mellan de olika raserna tyder på att det rör sig om olika genetisk bakgrund hos olika raser. (Stabej, P *et al.* 2006.)

Histologiskt har två olika varianter av DCM definierats. Dels en variant där myocyterna är tunnare än normalt samt har ett vågigt utseende (s.k. attenuated wavy fibers). Det finns också en spalt mellan dem som tyder på ödemvätska. Denna fenotyp har observerats hos ett trettiotal raser däribland Newfoundlandshund och Engelsk cockerspaniel (Tidholm, A. *et al.* 1998; Tidholm, A. 2000.) Denna histopatologiska förändring kan ses innan några andra kliniska tecken eller EKG-förändringar som tyder på sjukdom infunnit sig. (Tidholm, A. *et al.* 2000.) Alternativt kan fett- och bindväv vara insprängt mellan myocyterna. Dessa är då i sin tur isärsprängda och vakuoliserade. Detta

histopatologiska utseende förekommer oftast hos Dobermann och Boxer, men dessa raser kan även drabbas av den andra varianten av DCM. (Tidholm, A. 2000.)

Tidigare studier av DCM har indikerat att sjukdomen har en genetisk predisposition. Sjukdomen drabbar preferentiellt vissa familjer inom de aktuella raserna. Detta indikerar starkt att det finns en genetisk bakgrund till sjukdomen. Liknande situation föreligger hos människa där ca 30 % av patienterna med diagnostiserad DCM har en familjär historik med DCM. Hos vissa hundraser samt hos människa misstänks en autosomal dominant nedärvning samt att många loci är inblandade. (Dukes-McEwan, J *et al.*, 2003; Tidholm, A, 2000; Bilińska, Z *et al.* 2003.) X-bunden nedärvning för DCM har föreslagits hos Grand danois medan hos Portugisisk vattenhund har en autosomal recessiv nedärvning rapporterats. (Meurs, K *et al.*, 2001; Dambach *et al.*, 1999.) Hos den senare rasen har låga plasmanivåer av taurin föreslagits kunna påverka sjukdomsförloppet negativt. (Alroy, J *et al.* 2000.) X- bunden nedärvning för DCM har rapporterats hos ett fåtal familjer hos människa. (Bilińska, Z *et al.* 2003.) Den höga DCM-incidensen i specifika hundraser samt likheten i sjukdomsfenotyp hos alla individer inom en specifik hundras indikerar starkt att det är samma sjukdomsmutation som föreligger hos alla DCM-positiva individer. Enligt denna hypotes inträffade den sjukdomsframkallande mutationen på en kromosom för ett okänt antal generationer sedan och har därefter ökat i frekvens inom rasen som en följd av den för rasen valda avelsstrategin. Inom genetiken anges detta förlopp som identisk genom nedärvning (Identity by descent).

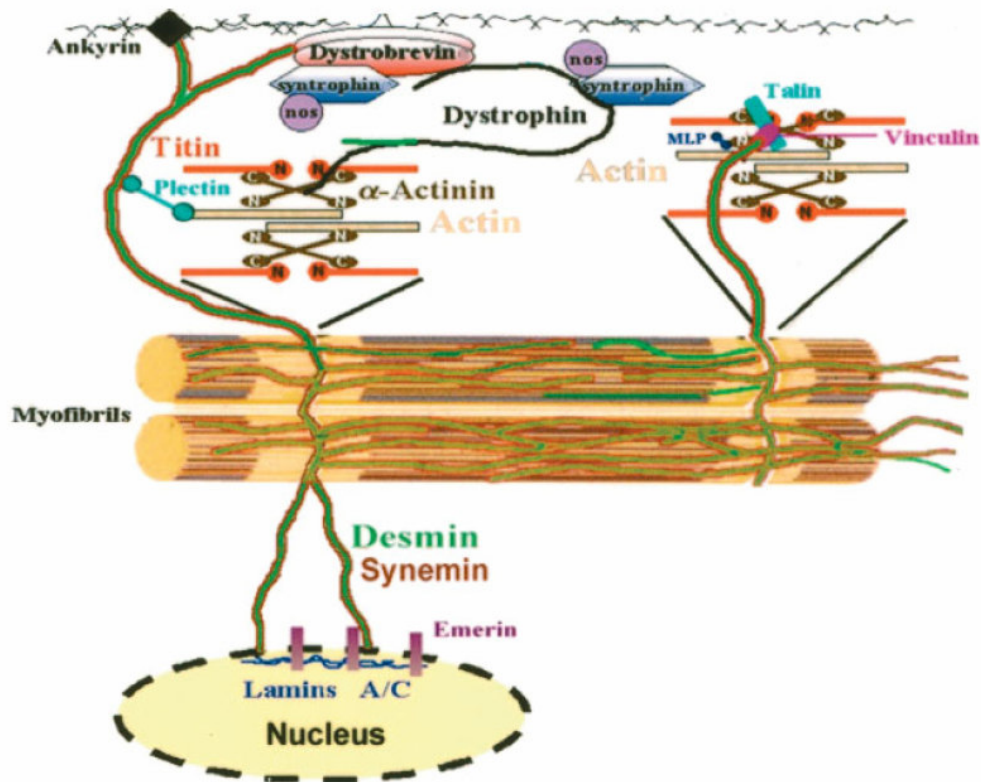
Eftersom DCM är en sjukdom som orsakar stort lidande för såväl individen som djurägaren vore det värdefullt om de genförändringar som ger ökad risk för denna sjukdom identifierades. Identifiering av sjukdomsgener kan användas för att utveckla genetiska tester som kan användas på potentiella avelsdjur med målsättningen att eliminera sjukdomen från rasen. Identifiering av sjukdomsgen kan dessutom leda till identifiering av den specifika mutationen som orsakar sjukdom. Detta kan användas för att öka kunskapen om hjärtats funktion och förståelsen av sjukdomsförlopp som nyttjas till utvecklandet av terapeutiska metoder för behandling av affekterade hundar. Dessutom är det en sjukdom som kan debutera när som helst i livet vilket innebär en ökad risk för spridning av sjukdomsgener, då bärare ofta kan ha hunnit användas i aveln innan de själva blivit sjuka, t.ex. Newfoundlandshundar har en medeldebütålder på fem år. (Tidholm, A. 2000.) (Stabej, P *et al.* 2006.)

Vår studie har inriktat sig på en familj av Newfoundlandshundar där vissa individer har haft kliniskt dokumenterade problem med DCM. Vi har haft tillgång till blodprover ett par generationer bakåt. Detta familjematerial ingår i en större fall-kontroll population som är väl lämpad för studier som syftar till att söka förutsättningslöst i hela arvsmassan för genetiska varianter som finns hos alla sjuka individer (s.k. Genome-wide association mapping). Då vår tid till projektet varit mycket begränsad har vi valt att screena materialet med avseende på en kandidatgen. Detta innebär att en gen som sannolikt kan vara muterad väljs ut för genetisk analys. Valet av kandidatgen beror på om motsvarande gen visat sig vara sjukdomsgen hos en annan art, t.ex. människa, eller om funktionen är känd för genen. När det gäller DCM av typen med attenuated wavy fibers finns det all

anledning, med tanke på den histopatologiska bilden och de kliniska symptomen, att misstänka brister i cytoskelettet som orsak till sjukdomen. (Dukes – McEwan, J *et al.* 2003.)

Litteraturstudier gjordes avseende samma sjukdom hos människa där ett flertal olika sjukdomsframkallande gener har identifierats, bl.a. en missense mutation hos cardiac β -myosin och en deletion hos cardiac troponin T (Kamisago, M *et al.* 2000.) och en X-länkad mutation hos dystrofingenen. (Bowles, N *et al.* 2000.) Andra studier har pekat ut desmin eller desminrelaterade proteiner (t.ex alpha-B-crystallin och synemin) som intressanta vid DCM. (Paulin, D *et al.* 2004.) Efter denna litteraturstudie utvaldes två intressanta kandidatgener: desmin (Li, D. *et al.* 1999.) och cardiac-actin. (Sinagra, G. *et al.* 2001.) Dessa två gener har hos människa i olika familjer orsakat den typ av DCM som överensstämmer bäst med den som drabbar Newfoundlandshundar. Det som gjorde dem ytterligare intressanta var att Dobermann undersökts genetiskt med avseende på just dessa två kandidatgener och då kunnat exkludera dessa gener i den rasen. (Stabej, P, *et al.* 2004) Anledningen till att det är intressant är att Dobermann, som tidigare nämnts, oftast drabbas av en annan typ av DCM, med ett annat histopatologiskt utseende, än Newfoundlandshundar. (Tidholm, A. 2000.) Primärt utvärderade vi desmin som kandidatgen.

Desmin är ett muskelspecifikt protein och en viktig del av intermediärfilamenten i hjärt-, skelett- och glattmuskulatur. Genen som kodar för desmin har nio exoner och åtta introner. Hos däggdjur finns det mer desmin i hjärtmuskelceller (2 % av totala proteinmängden) än i skelettmuskelceller (0.35%). Desmin finns framförallt i den perifera delen av Z-diskarna. Proteinet antas ha en viktig funktion för muskelvävnadens kontraktionsförmåga. Desmin förekommer också relativt rikligt i Purkinjefibrer. Det har visats att möss som manipulerats genetiskt att sakna desmingenen (sk. knock-out mice) utvecklar DCM, skelettmyopatier och defekter i glatt muskulatur. Hos människa utvecklas hjärtsjukdom ibland före skelettmyopatier. Vissa desminrelaterade myopatier beror på s.k. missense mutationer (mutationer som leder till aminosyrautbyten) och deletioner i desmingenen. Andra desminrelaterade myopatier där själva desmingenen inte är muterad kan bero på mutationer i de gener som kodar för de proteiner som interagerar med desmin, t.ex. alpha-B-crystallin, synemin, syncoilin eller plectin. (Paulin, D. & Li, Z. 2004.)



Figur 1. De olika strukturproteinernas interaktion med varandra och med muskelcellerna. (Paulin, D. et al 2004.)

Mutationer i desmingenens exon 8 har identifierats hos humana DCM-patienter. (Li, D. et. al, 1999) Vi har därför screenat vårt utvalda material med avseende på exon 8 i desmingenens hos hund.

3. MATERIAL OCH METODER

3.1 Bioinformatik

Första steget i vårt arbete var att identifiera en homolog sekvens i hundens arvsmassa (genom) till den humana desmingen som ligger på kromosom 2q35. Den humana desminsekvensen hämtades med hjälp av NCBI, Entrez (www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi). Hela den humana desmingen analyserades för att bl.a. kunna identifiera de sekvenser som tidigare använts för PCR-amplifiering (Li, D. et. al 1999). Analysen gav också storleken i baspar (bp) på exoner och introner. Efter detta sökte vi i hunddatabasen med den humana genens exon 8 som sond, efter motsvarande sekvens i hundgenomet. (www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/dog/).

Viktiga parametrar vid val av primers är % GC innehåll, det är viktigt att inte ha för högt innehåll av baserna GC eftersom det försvårar PCR-processen vid denatureringssteget där de båda DNA-strängarna ska separeras. GC binder med tre vätebindningar och basparet AT bara med två. Hundens desmin exon 8 har ett GC innehåll på 55 %. Det är också lämpligt att "forward"- och "reverse"-primern har balanserade smältpunkter, detta för att det lättare ska kunna gå att designa ett optimalt PCR-protokoll. Här hade båda primers samma smältpunkt, 59.4°C (Ideal smältpunkt 60°C).

3.2 DNA extraktion

För att rena genomiskt DNA från helblod har vi gjort en fenol/kloroform extraktion, enligt följande: Till blodprovet tillsätts Laird´s buffert (100 mM Tris HCl pH 8.5, 5mM EDTA, 0.2 % SDS, 200 mM NaCl, 100µg Proteinase K / ml)(Laird, P *et al.* 1991) och enzymet Proteinase K för att lysera cellerna. Cell-lysaten inkuberas sedan över natt i 37°C eller under två timmar i 55°C. När cellerna är lyserade blir blandningen viskös p.g.a. att genomiskt DNA har frilagts. Efter detta tillsätts fenol/kloroform för att extrahera bort proteiner och lipider från cellkärnan. Därefter centrifugeras provet och den övre H₂O-fasen som bör innehålla DNA överförs till ett nytt eppendorfrör. Därefter tillsätts kloroform för att ta bort eventuella fenolrester. Detta är viktigt då fenolrester inhiberar DNA-polymeraset (vid PCR). Sedan följer ytterligare en centrifugering och överföring av den övre fasen till ett nytt rör. Därefter fälls genomiskt DNA genom att tillsätta 1/10 volym 3 M NaAc och 2.5 volymer isopropanol. Efter att detta är gjort så precipiteras DNAt genom en etanolutfällning med 95 % etanol. Slutligen tvättas salt bort med 70 % etanol. När det precipiterade DNAt är tvättat borttages etanol och provet torkas i rumstemperatur. Slutligen löses DNAt i destillerat vatten med hjälp av försiktig pipettering.

DNA-koncentrationen bestäms genom absorptionsmätning vid 260 nm. Förhållandet mellan DNA och ev. kontaminerande proteiner mäts genom att bestämma ratio (OD 260/280nm) på DNA-preparatet. DNA-koncentrationen justeras vid behov för att erhålla en lämplig koncentration för PCR (ca.50 ng/mikroliter). (Ausubel, F.M. *et al.* 2001.)

3.3 Polymerase Chain Reaction (PCR)

PCR är en metod som producerar en stor mängd DNA för experimentellt syfte. För att göra detta tillsätts DNA till en lösning som innehåller två syntetiska oligonukleotider (s.k. primers), komplementära till respektive DNA-sträng, designad för just den regionen som skall mångfaldigas (amplifieras). För att utföra denna enzymatiska reaktion i ett cykliskt slutet system med upprepade temperaturhöjningar vid varje denatureringssteg krävs ett termostabilt DNA-polymeras samt enskilda nukleotider som inkorporeras i de nya DNA-molekylerna. Den lösning som används benämnes PCR-mastermix och innehåller följande komponenter som krävs för PCR:

- Vatten, för spädning.
- Buffert, för att erhålla korrekt pH i lösningen.
- Deoxynukleotider (dNTP), innehåller både energi och de nukleotider som används för syntes av DNA.
- $MgCl_2$, DNA-polymeraset behöver Mg^{2+} som en cofaktor för den enzymatiska funktionen.
- Primers.
- AmpliTaq, ett värmestabilt DNA-polymeras som använder deoxynukleotider vid syntes av nya DNA-molekyler. Den ursprungliga DNA-molekylen används som mall (templat) för syntesen. Att polymeraset är värmestabilt är en förutsättning för att reaktionen skall fungera trots de stora temperaturskiftningar som används i ett PCR-protokoll.
- Templat-DNA, de ursprungliga DNA-molekylerna som har isolerats från biologiskt material t.ex. blod. Detta är det DNA som kommer att amplifieras genom PCR-reaktionen.

För optimal PCR krävs utformning av ett protokoll som innehåller olika steg av denaturering (temperaturstegringar) och primer till templat hybridisering (annealing) (temperatursänkningar) och DNA-syntes s.k. "Extension" (temperaturökning). Ett exempel på ett protokoll kan vara som följer:

1. Denaturering vid 94° i 10 minuter för att göra genom-DNA-templet tillgängligt för och att aktivera enzymet AmpliTaq.

2. 94° i 45 sekunder. Denaturering av DNA där vätebindningarna mellan de två DNA-strängarna bryts.

3. 59° i 45 sekunder för annealing. Medan preparatet svalnar av binds (hybridiserar) primers till komplementära regioner på de båda separerade DNA-strängarna. DNA-polymeraset använder primers som startpunkter vid DNA-syntesen. Vanligen ligger tiden för annealing mellan 30-45 sekunder i en PCR-reaktion.

4. Syntes av DNA vid 72° i 1 min 45 s. Tiden i detta steg beror på längden i bp på fragmentet som skall amplifieras. En tumregel är $1 \text{ minut} + (2.5 \text{ sekunder}/100 \text{ baser}) = n$. Här sker syntes av DNA. Polymeraset arbetar sig ned längs DNA-strängen och inkorporerar en komplementär nukleotid för varje nukleotid på det ursprungliga DNA:t. Detta innebär att mängden amplifierade DNA-molekyler kommer att fördubblas för varje PCR-cykel, d.v.s. varje DNA-molekyl ger upphov till två nya. När lösningen upphettas på nytt kommer även den nya DNA-strängen att smälta och primrarna kan på nytt binda till rätt ställe och så börjar processen om igen. Amplifieringen blir på detta sätt exponentiell.

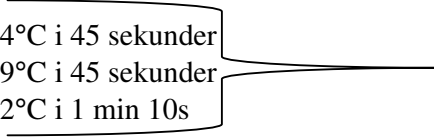
Steg 2-4 upprepas i ett förutbestämt antal cykler, vanligtvis någonstans mellan 30-40 stycken och för varje cykel fördubblas mängden DNA.

5. 72° i 6 minuter.

I vårt fall såg PCR-protokollet för DesEx8 ut som följer:

94°C i 10 minuter

94°C i 45 sekunder
59°C i 45 sekunder
72°C i 1 min 10s



35 cykler

72°C i 6 minuter

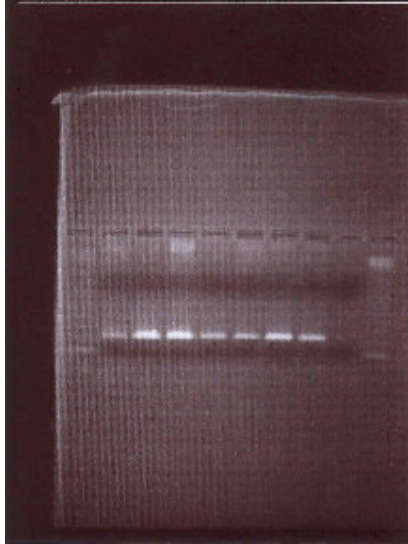
Fördelar med PCR är att det är en relativt enkel metod med en hög känslighet och specificitet. Den är också förhållandevis snabb och med PCR kan ett litet, väl definierat DNA-fragment amplifieras från genomiskt DNA.

Problem som kan uppstå är bl.a. kontamination av DNA-templet vilket i sin tur kan leda till felaktig PCR-produkt. Problem kan även uppstå om primers är fel-designade och binder till varandra eller har intern komplementaritet, vilket leder till en utebliven produkt. Ytterligare en komplikation är om primers ej är unika (specifika) för endast en del av genomet. Det är därför viktigt med noggrannhet vid designen av primers. Specificiteten vid PCR påverkas av DNA-sekvensen hos de utvalda primrarna, annealing temperaturen samt $MgCl_2$ koncentrationen. (Ausubel, F.M. *et al.* 2001.)

3.4 Agarosgelelektrofores

När DNAt har amplifierats skall produkten visualiseras för att utvärdera om reaktionen varit framgångsrik och specifik. Detta kan göras med flera metoder där agarosgelelektrofores är en enkel och effektiv metod. En delmängd av erhållen PCR-produkt av varje prov appliceras i en brunn på en agarosgel. I vårt fall en 1 % agarosgel bestående av 1 g Seakem agaros och 50 ml elektroforesbuffert (1xTBE pH 8, 89mM Tris/ 89mM borate/ 2 mM EDTA). Gelen läggs sedan i ett tråg med TBE i en elektroforesapparat. När detta är gjort appliceras ett elektriskt fält med en lämplig spänning (vi använde ca 80 V) för att separera DNA-fragmenten med avseende på storlek.

Eftersom alla DNA-molekyler är negativt laddade kommer de att röra sig mot den positivt laddade anoden. De olika långa DNA-fragmenten rör sig med olika hastighet i gelen, därigenom kan storleken på de erhållna DNA-fragmenten påvisas. Principen för agarosgelelektrofores är att korta DNA-fragment vandrar snabbare i ett elektriskt fält där alla molekyler har identisk laddning. Storleken på fragmenten jämförs med varandra och relativt en storleksmarkör som referens med DNA av kända storlekar (en s.k. stege) som har applicerats separat i en av brunnarna på gelen. För att kunna se fragmenten måste gelen färgas i ett bad innehållande etidiumbromid (EtBr) som interkalerar till DNA. Efter att detta är gjort tvättas överskottet av EtBr bort och gelen belyses med UV-ljus som visualiserar EtBr infärgat DNA. Gelen fotograferas i UV-ljus, på så sätt får man en bild av fragmenten som är möjlig att jämföra och relatera till den förväntade storleken av det amplifierade fragmentet.



Figur3. Agarosgel med sju av våra prover, längst till vänster och till höger ses en sk. stege och den andra brunnen från höger var blank (tom) för att kunna detektera en ev. kontamination.
(Egen bild)

3.5 Gel-extraktion

När DNA-fragment av rätt storlek har konstaterats kan fragmenten extraheras för vidare nukleotidsekvensbestämning.

Vid gelextraktionen av de amplifierade PCR-fragmenten använde vi oss av ett kommersiellt kit som heter QIAquick Gel Extraction Kit Protocol. Metoden för gelextraktion är utformad på följande sätt:

1. Skär ut DNA-fragmentet ur agarosgelen med en ren och vass skalpell. Mängden agarosgel minimeras för optimal extraktion av DNA-fragmentet.
2. Väg gelen. Tillsätt 3 volymer Buffer QG till 1 volym gel. (Detta gäller om gelen är under 2 %).
3. Inkubera i 50° C i 10 minuter, eller tills gelen är helt löst. För att hjälpa till att lösa gelen bör man vortexa röret med 2-3 minuters mellanrum under inkubationstiden. Under tiden förbereds vacuumsugen som tillhör kitet och de medföljande QIAquick kolonnerna (särskilda rör som appliceras på vacuumsugen).
4. När gelen har lösts upp fullständigt har lösningen erhållit en gul färg. Detta indikerar ett pH på ≤ 7.5 vilket är nödvändigt för att QIAquick membranen skall fungera effektivt.
5. Tillsätt en volym av isopropanol som motsvarar en gel volym till provet och blanda.
6. För att binda DNA, pipettera provet på QIAquick kolonnen och applicera vacuum. När provet har passerat igenom kolonnen bryts vacuumet.
7. Tillsätt 0.5 ml BufferQG till QIAquick kolonnen och applicera vacuum. Detta steg kommer att ta bort alla rester av agarosgelen. Detta steg är endast nödvändigt om DNAt skall användas till direkt sekvensering, *in vitro* transkription eller microinjektion.

8. För att tvätta tillsätt 0.75ml Buffer PE till QIAquick kolonnen och applicera vacuum. När provet skall användas till direkt sekvensering skall det stå i 2-5 minuter innan vacuum appliceras.
9. Flytta över QIAquick kolonnen till ett rent 1.5 ml microcentrifugrör eller till det medföljande 2ml röret. Centrifugera i 1 minut med 13 000 rpm. Denna centrifugering är nödvändig för att få bort kvarvarande etanol (Buffer PE).
10. Placera QIAquick kolonnen i ett rent 1.5 ml microcentrifugrör.
11. För att lösa ut DNA tillsätt 50µl Buffer EB eller H₂O till mitten av membranet och centrifugera kolonnen i 1minut vid 13 000 rpm. (Ausubel *et al.*2001.)

Du har nu ditt extraherade DNA i ditt provrör, färdigt för sekvensering!

3.6 Sekvensering

Sekvenseringen gjordes med hjälp av DYEnamic™ ET terminator kit (MegaBACE).

För att få fram en sekvens med hjälp av detta kit, kombineras DNA-templetet och dina sekvensprimers med en reaktiv premix. När detta gjorts sekvenseras preparatet i en värmecyklisk inkubator mellan 50°C-95°C i ett schema enligt följande:

95° C i 20 sekunder

50° C i 15 sekunder

60° C i 1 minut

Sedan körs detta i 20-30 cykler (vanligtvis tar detta cirka en timme).

Efter detta precipiteras reaktionsprodukterna med salt och etanol eller renas genom en gelfiltrering för att ta bort icke inkorporerade färgmärkta produkter. Reaktionsprodukterna löses i en formamid laddad buffert och separeras och detekteras sedan med hjälp av MegaBACE 1000 sekvenseringsinstrument. Data analyseras sedan med hjälp av Sequence Analyzer.

3.7 Urval av prover

Vi har i vårt arbete använt oss av en familj med Newfoundlandshundar, där DCM kliniskt har dokumenterats hos vissa individer vid en studie gjord av Anna Tidholm. Anledningen till att vi valt detta material är att det är ett omfattande material med många individer som är noggrant genomgången med både klinisk undersökning, ultraljud samt auskultation. I det fall hunden har avlidit har vi även haft tillgång till histopatologiska analyser som kunnat säga vilka individer som med 100 % säkerhet var friska och vilka som med 100 % säkerhet var sjuka. Här använder man sig av förekomsten av s.k. attenuated wavy fibers som diagnoskriterium. Vi har för vår studie valt ut ett fåtal lämpliga individer där bl.a. tre säkert affekterade och två säkert friska individer har ingått.

4. RESULTAT OCH DISKUSSION

För studien preparerades genomiskt DNA av hög kvalitet, extraherat från helblod från de utvalda individerna. Den sekvens vi fick fram överensstämde till 100 % med motsvarande sekvens i hunddatabasen, d.v.s. i denna del av genomet finns ingen rasspecifik variation mellan Newfoundlandshund och Boxer.

Fyndet som gjordes var en användbar genetisk markör i form av en Single Nucleotide Polymorphism, en så kallad SNP, vid desmin exon 8 kodon 431. Vid analys av desmin exon 8 från dessa Newfoundlandshundar visade det sig att denna polymorfism var lokaliserad till den tredje positionen i kodon 431 som kodar för prolin, vilken kan variera och motsvarar en tyst SNP, d.v.s. den leder inte till något aminosyrautbyte. Det är vanligt att just den tredje positionen i ett kodon varierar för samma aminosyra då den genetiska koden är degenererad.

Aminosyran prolin kodas av följande fyra kodon där den tredje positionen kan vara A, G, C eller T (CCA, CCG, CCC och CCT)

Tabell 1. Genotyper vid identifierad SNP samt respektive fenotyper

Individ	Genotyp	Heterozygot vs homozygot	Fenotyp
NF5	G/A	Het	Affekterad (80-90 %)
NF7	G/A	Het	Frisk*
NF10	G/A	Het	Frisk*
NF12	G/A	Het	Affekterad (95 %)
NF18	G/G	Hom	Frisk (100 %)
NF19	G/G	Hom	Frisk (100 %)
NF20	G/G	Hom	Frisk*
NF21	G/G	Hom	Frisk*
NF22	G/G	Hom	Frisk*
NF23	G/A	Het	Affekterad (100 %)
NF24	G/G	Hom	Frisk*
NF25	A/A	Hom	Affekterad (100 %)

Alla G/G homozygoter är sannolikt friska. NF18-19 är 100% friska, NF20-22 och NF24 är sannolikt friska.

Ingen G/G homozygot är säkert affekterad.

NF5, 7, 12, 23 är heterozygota G/A. NF25 är A/A homozygot.

* Dessa individer har ännu inte visat några tecken på sjukdom, men kan inte ses som säkert friska förrän man undersökt dem histopatologiskt. Alternativt om de visat tydliga kliniska tecken på sjukdom.

Baserat på tillgängliga resultat kan ej slutgiltigt konkluderas om desmingenen är en sjukdomsgen för DCM. De tillgängliga resultaten indikerar att desmin inte är en sjukdomsgen för DCM. Studien baseras dock i nuläget på för få individer för att erhålla statistiskt signifikanta och säkra resultat. De studier som utförts är dock värdefulla då de etablerat en metod som kan appliceras på ett större

populationsmaterial. Identifieringen av en ny SNP kommer i detta projekt att ha avgörande betydelse för utvärderingen av desmin som sjukdomsgen.

Fortsatta studier är av stort intresse och det förbereds just nu en genome-wide association mapping, där fler individer ur detta familjematerial ska ingå. En genome-wide association mapping innebär att man förutsättningslöst söker igenom hela genomet efter associationer mellan genotyp och fenotyp. Vid en sjukdom som DCM med autosomalt dominant nedärvning krävs cirka 50 affekterade och 50 friska individer för att erhålla statistiskt säkra resultat. Den kandidatgenapproach vi utförde inom ramen för detta examensarbete kunde dock utvärdera om genetisk association mellan desmin och DCM föreligger eller ej. Detta kan sedan konkluderas med ett större antal individer.

I dagsläget har man hittat s.k. microsatelliter lokaliserade kring desmingenen, vilket innebär möjlighet att titta på fler alleler (en SNP består oftast bara av två alleler).

DCM hos Newfoundlandshundar har autosomal dominant nedärvning. (Andersson, G. personligt meddelande, 2006.)

Att finna den/de gener som är sjukdomsframkallande i fallet med DCM vore av stort intresse då det är svårt att annars förhindra spridning av den sjukdomsframkallande genen, med tanke på den relativt höga debutåldern (fem år medeldebutålder hos Newfoundlandshund). Det är också en plågsam sjukdom för djuret och för djurägaren som förlorar sin hund i för tidig ålder.

Det vore även intressant ur den humanmedicinska aspekten då hund utgör en bra komparativ modell. Detta p.g.a. lång tradition att dokumentera ursprung med hjälp av stamtavlor vilket underlättar en genetisk analys. Man har också kortare generationsintervall hos hund jämfört med människa vilket ger möjlighet till snabbare resultat. Inom hundavel använder man sig relativt ofta av s.k. linjeavel (d.v.s. man avlar på individer som är nära besläktade med varandra) vilket kan ha bidragit till att vissa sjukdomsgener ökat i frekvens hos vissa familjer. Detta i sin tur kan leda till att det kan vara lättare att hitta tillräckligt många fall och kontroller som ger statistiskt signifikanta resultat.

Det har gjorts försök att preparera fram genomiskt DNA av hög kvalitet ur paraffinfixerad vävnad och resultaten verkar lovande! Om denna möjlighet öppnar sig så finns det stora mängder med material bevarat som vore intressant att titta på i framtiden, då inte bara gällande hjärtsjukdom utan även andra sjukdomar med misstänkt genetisk bakgrund. Utvecklingen på området går i en rasande takt och det finns all anledning att säga att molekylärgenetiken är framtiden och att genom den kanske vi kan få lösningen på några av medicinens gåtor, både på human- och veterinärsidan!

5. LITTERATURFÖRTECKNING

- Alroy, J., Rush, J.E., Freeman, L., Amarendhra Kumar, M.S., Karuri, A., Chase, K., Sarkar, S. Inherited Infantile Dilated Cardiomyopathy in Dogs: Genetic, Clinical, Biochemical, and Morphologic Findings. *American Journal of Medical Genetics* 95:57-66 (2000)
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (eds.): *Current Protocols in Molecular Biology*, ch. 2.1A-2.2, ch. 2.5A-2.7, John Wiley & Sons, New York, NY, 2001
- Bilińska, Z.T., Michalak, E., Piątosza, B., Grzybowski, J., Skwarek, M., Deptuch, T.W., Kuśmierczyk-Droszcz, B., Piotrowski, W., Rużyło, W. 2003. Familial dilated cardiomyopathy: evidence for clinical and immunogenetic heterogeneity. *Med Sci Monit*, 2003; 9(5): CR 219-226.
- Bowles, N.E., Bowles, K.R., Towbin, J.A., 2000. The “Final Common Pathway” Hypothesis and Inherited Cardiovascular Disease. *Herz* 25. Nr 3 168-175.
- Dambach, D.M., Lannon, A., Sleeper, M.M, Buchanan, B. Familial dilated cardiomyopathy of young Portuguese Water dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 1999 Jan-Feb; 13(1):65-71.
- Dukes-McEwan, J., Borgarelli, M., Tidholm, A., Vollmar, A.C., Häggström, J. Proposed Guidelines for the Diagnosis of Canine Idiopathic Dilated Cardiomyopathy. *Journal of Veterinary Cardiology*, Vol. 5, No.2, 7-18. November 2003.
- Kamisago, M., Sharma, S.D., DePalma, S.R., Solomon, S., Sharma, P., McDonough, B., Smoot, L., Mullen, M.P., Woolf, P.K., Wagle, E.D., Seidman, J.G., Seidman, C.E. Mutations in sarcomere protein genes as a cause of dilated cardiomyopathy. *The New England Journal of Medicine*. Vol.343, No. 23, 1688-1696. December 2000.
- Laird, P.W., Zijderveld, A., Linders, K., Rudnicki, M.A., Jaenisch, R., Berns, A. 1991. Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acid Research*, Vol. 19, No. 15. s.4293.
- Li, D., Tapscoft, T., Gonzales, O., Burch, P.E., Quiñones, M.A., Zoghbi, W.A., Hill, R., Bachinski, L.L., Mann, D.L., Roberts, R. Desmin Mutation Responsible for Idiopathic Dilated Cardiomyopathy. *Circulation*. 1999;100:461-464. <http://www.circulationaha.org>
- Meurs, K.M., Miller, M.W., Wright, N.A. Clinical features of dilated cardiomyopathy in Great Danes and results of a pedigree analysis: 17 cases (1990-2000). *Journal of the American Veterinary Medicine Association*. 2001 Mar 1;218(5):729-32.
- Paulin, D., Huet, A., Khanamyrian, L., Xue, Z. Desminopathies in muscle disease. *Journal of Pathology* 2004; 204: 418-427.
- Paulin, D. Li, Z. Desmin: a major intermediate filament protein essential for the structural integrity and function of muscle. *Experimental Cell Research* 301 (2004) 1-7.
- Sinagra, G., Di Lenarda, A., Brodsky, G.L., Taylor, M.R.G., Muntoni, F., Pinamonti, B., Carniel, E., Druissi, M., Britsow, M.R., Mestroni, L., and the Heart Muscle Disease Study Group. Current perspective. New insights into the molecular basis of familial dilated cardiomyopathy. *Italian Heart Journal* 2001; 2(4): 280-286.

Stabej, P., Imholz, S., Versteeg, S.A., Zijlstra, C., Stokhof, A.A., Domanjko-Petrič, A., Leegwater, P.A.J., van Oost, B.A.. Characterization of the canine desmin (*DES*) gene and evaluation as a candidate gene for dilated cardiomyopathy in the Dobermann. *Gene* 340 (2004) 241-249.

Stabej, P., Meurs, K.M., van Oost, B.A. Molecular Genetics of Dilated Cardiomyopathy. *The Dog and Its Genome* 2006. Gold Spring Harbor Laboratory Press 0- 87969-742-3. 365- 382.

Tidholm, A., Jönsson, L. Dilated Cardiomyopathy in the Newfoundland: A Study of 37 Cases (1983-1994). *Journal of the American Animal Hospital association* 1996;32:465-70.

Tidholm, A., Jönsson, L. A Retrospective Study of canine Dilated Cardiomyopathy (189 Cases) *Journal of the American Animal Hospital Association* 1997; 33:544-50.

Tidholm, A., Svensson, H., Sylvén, C. Survival and Prognostic Factors in 189 dogs with Dilated Cardiomyopathy. *Journal of the American Animal Hospital Association* 1997;33:364-8

Tidholm, A., Häggström, J., Jönsson, L. Prevalence of attenuated wavy fibers in myocardium of dogs with dilated cardiomyopathy. *JAVMA*, Vol. 212, no. 11, 1998. 1732-1734.

Tidholm, A., Häggström, J., Jönsson, L. Detection of attenuated wavy fibers in the myocardium of Newfoundlands without clinical or echocardiographic evidence of heart disease. *AJVR*, Vol. 61, No. 3, 2000. 238-241

Tidholm, A. Canine Idopathic Dilated Cardiomyopathy. Epidemiology, histopathology and pathophysiology. Doctoral thesis Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala 2000. 15-65.

www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/dog/

www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/CfaBlast.html

frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3_www.cgi

6. Tack till

Min handledare Göran Andersson för att du har stått ut i vått och torrt, och för all hjälp.

Åke Hedhammar för din hjälp och ditt engagemang.

Anna Tidholm för att jag fick förtroendet att använda ditt material, och för ditt stöd och intresse.

Jens Häggström som också har ställt upp och besvarat frågor, små som stora.

Nicolette Salmon- Hillbertz för din ovärderliga hjälp med labbarbetet.

Jag vill också tacka min mamma, Gun-Britt, utan hennes hjälp med barnen hade den här uppsatsen aldrig blivit skriven.

Självklart ett stort tack till Martin, Mira och Ruben för att ni finns och stöttar mig, alltid!

Stockholm, januari 2007

Anja Kanold