

Hunden som modell för ärftlig retinopati hos människa

- En litteraturstudie om hunden som modelldjur och dess betydelse för identifiering och behandling av ärftliga retinopatier

The canine as a model organism for hereditary retinopathy in humans

- A literary review on the dog and its applicability for identification and treatment of hereditary retinopathy



Susanna Berger

Institutionen för husdjursgenetik, 524

Examensarbete • 15 hp

Agronomprogrammet-Husdjur

Uppsala 2017

Hunden som modell för ärftlig retinopati hos människa – En litteraturstudie om hunden som modelldjur och dess betydelse för identifiering och behandling av ärftliga retinopatier

The canine as a model organism for hereditary retinopathy in humans – A literary review on the dog and its applicability for identification and treatment of hereditary retinopathy

Susanna Berger

Handledare: Tomas Bergström, Sveriges lantbruksuniversitet,
Institutionen för husdjursgenetik

Examinator: Göran Andersson, Sveriges lantbruksuniversitet,
Institutionen för husdjursgenetik

Omfattning: 15 hp

Nivå och fördjupning: Grundnivå, G2E

Kurstitel: Kandidatarbete i husdjursvetenskap

Kurskod: EX0553

Program/utbildning: Agronomprogrammet-Husdjur

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2017

Serie nr: Examensarbete / Institutionen för Husdjursgenetik, 524

Omslagsbild: Susanna Berger

Elektronisk publicering: <http://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: retinopati, Retinitis pigmentosa, Leber congenital amaurosis, hund, modelldjur, genterapi

Key words: retinopathy, Retinitis pigmentosa, Leber congenital amaurosis, canine, model organism, gene therapy

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för husdjursgenetik

Sammanfattning

Denna litteraturstudie utvärderar hunden som ett modelldjur inom forskning för sjukdomar på näthinnan s.k. retinopatier samt genterapi som potentiell behandlingsmetod för dessa sjukdomar. Minst 256 gener och 300 mutationer har hos människa associerats med ärftliga retinopatier. Hos hunden har hittills 28 gener identifierad koppling till olika retinopatier. Retinopatier har observerats ha autosomal recessiv, autosomal dominant, X-bunden och mitokondriell nedärvning. Förutom olika nedärvningsformer kan retinopatier även uppkomma vid olika tidpunkter i individens liv och med olika långt sjukdomsförlopp. Råttor och möss har länge använts som modelldjur inom forskning för ärftliga ögonsjukdomar. De är dock mindre lämpade att använda i viss forskning på grund av anatomiska olikheter med människans ögon. Två genetiska flaskhalsar bidrar bland annat till att hunden är ett lämpligt modelldjur. Hundens öga har många anatomiska likheter med människans. Genterapi är en möjlig behandlingsform för genetiska sjukdomar. Genterapistudier på hund har genomförts med goda resultat. Fas I och II försök på människa har också utförts även här med lovande resultat.

Nyckelord: retinopati, Retinitis pigmentosa, Leber congenital amaurosis, hund, modelldjur, genterapi

Abstract

This literature review aims to evaluate the dog as a model organism for research concerning retinopathy, as well as gene therapy as a potential treatment. At least 256 genes and 300 mutations associated with hereditary retinopathy in humans have been identified. In canines, 28 such genes have been identified. Retinopathy has been observed to exhibit autosomal recessive-, autosomal dominant-, x-bound- and mitochondrial inheritance pattern. Besides different forms of heredity, retinopathies can differ in severity, age of onset and speed of progression. Rats and mice have long histories as model organisms for research in hereditary retinopathy. However, they are unsuited to certain research due to anatomical differences between their eyes and the eyes of humans. Two genetic bottlenecks, among other reasons compound to make the canine an ideal model animal for this purpose. The eye of a canine has anatomical similarities with a human one. Gene therapy is a possible treatment for genetic diseases. Studies on gene therapy in canines have shown promising results. Phase I and II trials on humans have also been performed with promising results.

Keywords: retinopathy, Retinitis pigmentosa, Leber congenital amaurosis, canine, model organism, gene therapy

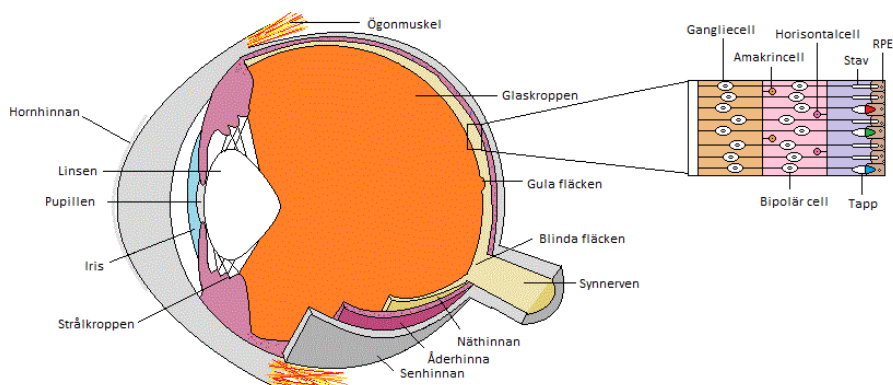
1 Inledning

Sjukdomar på näthinnan även kallat retinopatier finns i många former och kan delas upp i ett stort antal klassificeringar och kategorier. Minst 256 gener (RetNet, 2017) och 300 mutationer har hos människa associerats med ärftliga retinopatier (Alkharashi & Fulton, 2017). Då ärftliga sjukdomar som påverkar näthinnan varierar i allvarlighetsgrad, ålder vid uppkomst och vilka retinala celltyper som är inblandade har sjukdomarna delats upp i fenotypiska underklasser. Två viktiga sjukdomsklasser är Retinitis pigmentosa (RP) och Leber congenital amaurosis (LCA) (Miyadera et al., 2012). RP drabbar 1 av 4000 människor och över en miljon människor världen över lider av blindhet orsakad av denna sjukdomsklass. Usher's syndrom är en utav de vanligaste formerna av RP och står för 10-20% av alla sjukdomsfall. En annan sjukdom är Bardet-Biedl som står för 5-6% av alla RPs sjukdomsfall (Hartong et al., 2006). LCA är en sjukdomsklass som drabbar 1 av 33 000 nyfödda barn världen över (Alkharashi & Fulton, 2017). Möss och råttor har länge varit de modelldjur som använts inom forskning för retinopatier, men större modelldjur har visat sig ha många fördelar. Denna litteraturstudie syftar till att utvärdera hunden som ett modelldjur inom forskning för ärftliga sjukdomar på näthinnan, som orsakar blindhet, hos människa. Litteraturstudien kommer även ta upp genterapiförsök som genomförts och utvärdera resultaten av dessa.

2 Litteraturgenomgång

2.1 Näthinnan

Näthinnans struktur och uppbyggnad är hos hunden lik människans med liknande lager av specialiserade celler (Figur 1). Detta trots att hunden föds med en underutvecklad näthinna som sedan sakta utvecklas under de första veckorna av hundens liv. Dessa lager kallas; det yttersta lagret, det yttre kärnlagret, det inre kärnlagret och det innersta ganglioncellagret. Tapparna och stavarna, vilka är två fotoreceptorcelltyper, kan hittas i det yttersta lagret där varje fotoreceptorcell också har en yttre och inre sektion. Den yttre sektionen ansvarar för startandet av fototransduktionen och den inre för de biosyntetiska funktionerna. Tapparna och stavarna stimuleras av ljus och får sin näring från ett pigmenterat cellager som kallas det retinala pigmentepitelet (RPE). Fotoreceptorerna är både hos människa och hos hund utspridda över näthinnan och båda arterna har en större ansamling av stavar än tappar. Stavarna ansvarar för mörkerseendet och dimljusseendet och tapparna för färgseendet och dagseendet, det fotopiska seendet. I fotoreceptorernas yttre sektion finns ljusabsorberande kromoforer, ett derivat av vitamin A, som kallas för 11-*cis*-retinal, som binder in till en opsin. Fotoreceptorerna har olika opsiner med olika känslighet för våglängder av ljus (Miyadera et al., 2012).



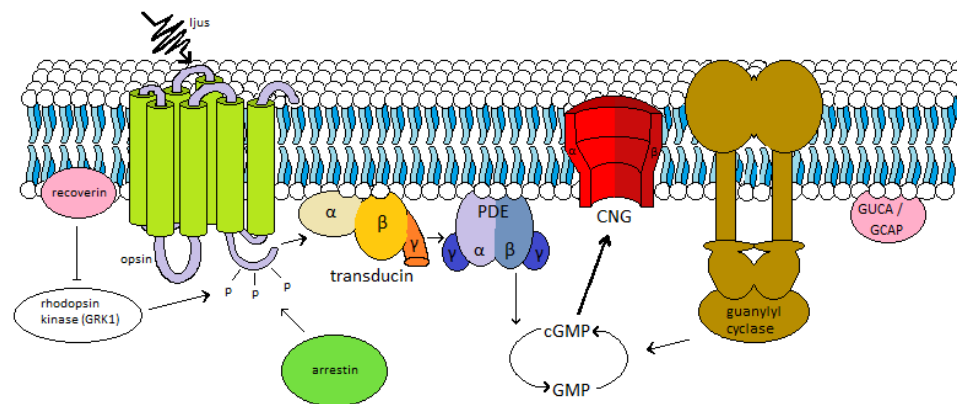
Figur 1. Schematisk bild av mänskligt öga med förstoring av näthinnan (Susanna Berger, 2017).

Ljus är elektromagnetisk strålning som har både partikelegenskaper och vågegenskaper. Ljus i partikelform kallas fotoner. Synligt ljus är de ljusvåglängder ögat kan uppfatta och tolka till olika synintryck. Spektrumet av synligt ljus är våglängder mellan cirka 380 nanometer (nm) och 800 nm. De olika tappcellerna reagerar på olika våglängder av ljus vilket gör att ögat kan uppfatta ljuset som olika färger. Våglängder på 380 nm ger upphov till violett följt av blått, cyan, grön, gul och orange för att till sist ge upphov till rött vid 800 nm.

Det finns två huvudsakliga signalvägar som är involverade i synförmågan, den ena är fototransduktionen och den andra är retinoida cykeln (Miyadera et al., 2012). Den process som omvandlar ljus till elektriska signaler i ögat kallas fototransduktionen. I fototransduktionen triggas absorptionen av fotoner fototransduktionskaskaden (Figur 2). Fotonerna absorberas av opsiner, som är G-protein kopplade receptorer. Den opsinbundna 11-*cis*-retinalen isomereras till all-trans-retinal av fotonerna. Detta leder till att opsinen aktiveras. Opsinen aktiverar i sin tur G-proteinet transducin som stimulerar aktiveringen av phosphodiesterase (PDE). I mörker är cGMP koncentrationen hög men när PDE är aktiv minskar nivåerna av cGMP på grund att den hydrolyseras till GMP. Utan cGMP kan inte cyclic nucleotide-gated (CNG) jonkanalen längre hållas öppen och cellen hyperpolariseras (Larhammar et al., 2009).

Då cellerna hyperpolariseras minskar den synaptiska utsöndringen av neurotransmitorn glutamat till bipolar- och horisontalcellerna. Detta resulterar i en neural signal som sedan tolkas av hjärnan. Signaleringen kommer sedan att minska för att tillslut helt avslutas. Detta görs genom fosforylering av opsinet med hjälp av G-protein kopplade receptor kinase (GRK) följt av bindning av arrestin som minskar signaleringen till G-proteinet. GC-aktiveringsprotein (GUCA eller GCAP) reglerar guanylyl cyclase (GC) som bildar ny cGMP för att återställa signalvägen. Recoverin minskar sedan GRK aktiviteten (Larhammar et al., 2009).

Den retinoida cykeln använder RPE för att omvandla all-*trans*-retinal till ny 11-*cis*-retinal samt att förse alla kromoforer med nya opsiner (Miyadera et al., 2012).



Figur 2. Schematisk bild av fototransduktionskaskaden i ryggradsdjur (Susanna Berger, 2017 inspirerad av (Larhammar et al., 2009)).

2.2 Retinopatier

Retinopati definieras som någon form av skada på näthinnan. Retinopati kan orsakas av till exempel högt blodtryck, strålning, infektioner och diabetes. Denna litteraturgenomgång kommer enbart behandla de ärftliga formerna av retinopati.

Den vanligaste nedärvningsformen för retinopatier är autosomal recessiv nedärvning. Det förekommer också autosomt dominanta och X-bundna former av retinopati (Mellersh, 2014; Miyadera et al., 2012). Ett exempel på en ärftlig retinopati hos hund som nedärvs autosomt recessivt orsakas av en mutation i genen CNGB1. Vid mutationer i CNGB1 genen förlorar fotoreceptorerna sin normala funktion och stavarna följs av tapparna tillbakabildas vilket resulterar i att individen förlorar synförmågan. Mutationer i CNGB1 genen har hittills hittats i hundraserna Papillon och Phaléne (Ahonen et al., 2013; Winkler et al., 2013). Mutationer i RHO genen är ett exempel på en autosomal dominant retinopati där den G-protein kopplade receptorn rodopsin inte fungerar korrekt. Detta leder till att stavarna tillbakabildas och den drabbade individen kommer till slut att bli blind. Hunden är den första kända arten förutom människan där en sjukdomsorsakande mutation i RHO genen har identifierats. Sjukdomsmutationen har hittills hittats i Bullmastiffen och den Engelska Mastiffen (Kijas et al., 2002). I Samoyed och Siberian Husky har det hittats en mutation på RPGR genen som har X-bunden nedärvning (Zhang et al., 2002).

Förutom olika nedärvningsformer kan retinopatier uppkomma vid olika tidpunkter i individens liv. Vissa kan uppkomma vid individens födsel medan

andra börjar uttrycka sig senare i individens liv. Tidigt uttryckta retinopatier är ofta associerade med mutationer i gener som ger felaktig utveckling av tapparna och stavarna vilket leder till att de tillbakabildas (Mellersh, 2014; Miyadera et al., 2012). Ett exempel på en tidigt uttryckt retinopati är en nonsensmutation i PDE6B genen som hos Irländska settrar visar sig redan när de är cirka 25 dagar gamla. Redan vid ett års ålder kan dessa hundars tappar och stavar vara helt tillbakabildade och hundarna är helt blinda (Suber et al., 1993). Retinopatier som uttrycker sig senare i individens liv är istället associerade med mutationer i gener som är nödvändiga för långtidsunderhållet av tapparna och stavarnas funktioner (Mellersh, 2014; Miyadera et al., 2012). Mutationer i PRC1 genen är ett exempel på en retinopati som uttrycks senare i hundens liv. Denna sjukdomsmutation har hittats i minst 22 olika raser (Downs et al., 2011) bland annat i Labrador retriever, Portugisisk vattenhund samt toy och miniatyr pudel (Zangerl et al., 2006).

Retinopatier kan även ha olika snabbt sjukdomsförlopp vilket varierar dels beroende på vilken gen och vilken typ av mutation och dels på vilken ras sjukdomen har uppkommit i (Miyadera et al., 2012). I Golden retrievers har en frameshift mutation i SLC4A3 genen identifierats som resulterar i en retinopati med relativt långsamt sjukdomsförlopp. Hundar med denna mutation diagnostiseras ofta vid sex till sju års ålder. Yngre individer på cirka fyra år har lyckats diagnostiseras vilket tyder på att sjukdomen börjar uttryckas vid en lägre ålder men upptäcks oftast inte förrän senare i hundens liv (Downs et al., 2011). Detta är till skillnad från den tidigare nämnda mutationen i PDE6B genen.

Hittills har 28 gener identifierats och associerats med någon form av retinopati hos hund (Tabell 1).

Tabell 1. Lista över de 28 gener hittills associerade med någon form av retinopati hos hund (Susanna Berger, 2017).

Gen	Ras/Raser	Referens
-----	-----------	----------

Gen	Ras/Raser	Referens
ADAM9	Glen of Imaal terrier	(Goldstein et al., 2010c)
ADAMTS10	Beagle	(Kuchtey et al., 2011)
ADAMTS17	Många raser	(Farias et al., 2010)
C2orf71	Gordon setter, Irländsk setter	(Downs et al., 2013)
CCDC66	Schapendoes	(Dekomien et al., 2010)
CNGA1	Shetland sheepdog	(Wiik et al., 2015)
CNGB1	Papillon	(Winkler et al., 2013)
CNGB3	Korthårig vorsteh	(Sidjanin et al., 2002)
COL9A2	Samoyed	(Goldstein et al., 2010a)
COL9A3	Labrador retriever	(Goldstein et al., 2010a)
HSF4	Många raser	(Mellersh et al., 2006b)
MERTK	Svensk vallhund	(Ahonen et al., 2014)
NHEJ1	Collie	(Parker et al., 2007)
NPHP4	Strävårig tax	(Wiik et al., 2008)
PDC	Miniatyr schnauser	(Zhang et al., 1998)
PDE6A	Cardigan welsh corgi	(Petersen-Jones et al., 1999)
PDE6B	Irländsk setter	(Suber et al., 1993)
PRCD	Många raser	(Zangerl et al., 2006)
RD3	Collie	(Kukekova et al., 2009)
RHO	Engelsk Mastiff	(Kijas et al., 2002)
RPE65	Briard	(Veske et al., 1999)
RPGR	Siberian Husky, Samoyed	(Zhang et al., 2002)
RPGRIP1	Långhårig miniatyrtax	(Mellersh et al., 2006a)
SAG	Basenji	(Goldstein et al., 2013)
SLC4A3	Golden retriever	(Downs et al., 2011)
STK38L	Norsk älghund	(Goldstein et al., 2010b)
TTC8	Golden retriever	(Downs et al., 2014)
VMD2/BEST1	Många raser	(Guziewicz et al., 2007)

2.2.1 Retinitis Pigmentosa

RP är en progressiv sjukdom som kan nedärvas bland annat autosomt recessivt, autosomt dominant och X-bundet. I 50-60% av sjukdomsfallen nedärvs RP autosomt recessivt. Autosomt dominant står för 30-40% av sjukdomsfallen och X-bunden nedärvning för 5-15%. I ett fåtal fall har även mitokondriella nedärvningsmönster observerats. RP har identifierad koppling till över 45 gener hos människan (Hartong et al., 2006). Sjukdomsklassen brukar delas upp efter åldersuppkomst och allvarlighetsgrad då vissa individer lidit av nattblindhet sedan barndom och andra inte får symptom förrän i vuxen ålder (Winkler et al., 2013). Hundens motsvarighet till denna sjukdomsklass kallas Progressiv retinal atrofi (PRA) och förekommer i över 100 raser (Miyadera et al., 2012). I vissa raser är

flera olika former av PRA förekommande (Ahonen et al., 2014). PRA kännetecknas av synnedsättning på grund av att fotoreceptorerna tillbakabildas, vilket över tid leder till total blindhet (Wiik et al., 2015). Hos både RP och PRA börjar först stavarna tillbakabildas vilket leder till förlust av mörkerseendet. Allt eftersom sjukdomen fortskrider tillbakabildas tapparna och dagseendet försvinner (Cooper et al., 2014). Även då sjukdomsmutationerna enbart påverkar stavarna kan sjukdomen resultera i att individen blir helt blind (Winkler et al., 2013).

2.2.2 Leber congenital amaurosis

Individer med LCA är antingen blinda vid födseln eller förlorar synförmågan tidigt i barndomen (Alkharashi & Fulton, 2017). Efter att en individ diagnostiserats vid en ung ålder sker väldigt liten eller ingen försämring av sjukdomstillståndet (Miyadera et al., 2012). Av de 23 gener som hittills hittats hos människa är det vanligast att LCA nedärvs autosomt recessivt men det har funnits fall av LCA då den nedärvt autosomt dominant. Dessa gener är viktiga för en normal utveckling av näthinnan. Vissa gener kodar för proteiner viktiga för fotoreceptorerna medan andra kodar för protein som är nödvändiga för RPE (Alkharashi & Fulton, 2017).

2.3 Hunden som modell

Två genetiska flaskhalsar bidrar till att hunden är ett intressant modelldjur. Dessa flaskhalsar uppkom i samband med när hunden domesticerades och därefter när hunden sedan avlades för specifika raser. I syfte att främja specifika egenskaper förekom avel av närbesläktade individer. Detta har gjort att ärftliga sjukdomar uppkommit med hög frekvens (Karlsson et al., 2007). Hunden har levt ibland människor i mellan 20 000 och 40 000 år (Botigué et al., 2017) men det är människans strävan efter specifika egenskaper de senaste århundradena som har lett till över 400 unika hundraser. Jakt- och vallinstinkt, men även särskilda utseenden och människolik mentalitet är exempel på egenskaper som vi människor har velat ha hos våra hundar, så att de kan hjälpa oss i vår vardag. Aveln har resulterat i att sjukdomar som också är vanliga hos människa som till exempel cancer, epilepsi och ärftliga ögonsjukdomar blivit vanligt förekommande hos våra hundar (Lindblad-Toh et al., 2005). Den genetiska variationen är liten inom en hundras och stor mellan olika hundraser vilket ytterligare visar på den intensiva avel som förekom då de moderna hundraserna började avlas fram (Karlsson et al., 2007).

Kopplingsojämvikt, eng: Linkage disequilibrium (LD) är omfattande inom en och samma hundras med långa haplotyper, definierade som en grupp av genetiska varianter s.k. single-nucleotide polymorphism (SNP) på en kromosom som alltid tenderar att nedärvas tillsammans. Mellan olika hundraser är LD mindre med tydliga tecken på haplotyp grupper från den ursprungliga domesticerade populationen. Om flera hundraser tenderar att drabbas av samma sjukdomar är det troligt att riskfaktorerna nedärvt från den ursprungliga populationen (Karlsson et al., 2007). Vissa sjukdomar är mer vanligt förekommande i vissa raser, vilket antyder att enbart ett fåtal loci är inblandade i sjukdomens uppkomst. Detta gör att det ofta är lättare att hitta gener som är associerade med en viss sjukdom hos hundar än vad det är hos människor (Lindblad-Toh et al., 2005). Ärftliga ögonsjukdomar hos hundar är väl dokumenterade. Detta är till stor del för att många länder implementerar ögonlysning för hundar som ska gå i avel, samt att ögat är lätt att undersöka utan att behöva göra större, riskfyllda ingrepp (Mellersh, 2014). Stora mängder data finns att tillgå då kennelklubbar världen över registrerar alla renrasiga hundar och deras sjukdomshistorik (Lindblad-Toh et al., 2005).

Hundens öga är på många sätt mer likt ett mänskligt än vad andra vanliga modelldjurs ögon är. Hunden har en region som kallas area centralis, där fotoreceptorerna sitter tätare. Råttor och möss som är vanliga modelldjur saknar detta då deras fotoreceptorer är jämnt utspridda över näthinnan (Winkler et al., 2013). Denna region kallas för *fovea centralis* hos primater och består av cirka 0,2% av näthinnans totala area. I *fovea centralis* finns en ännu mindre region som kallas foveola. Foveola består av en bukettliknande ansamling av tappor och denna region saknar stavar och retinala kapillärer (Beltran et al., 2014). Den Fovea-makulära regionen hos människan har länge ansetts vara allt för olik den motsvarande regionen hos hund för att studier på hund som modell ska vara relevanta. I en studie av Beltran et al., 2014 hittades en region i centrala delen av hundens area centralis med en hög koncentration av tappor med liknande bukettformation som människans foveola. Denna fovealiknande region hos hunden har visat viss anatomisk likhet med människans, samt visar liknande påtaglighet för genetisk skada. Denna upptäckt har uppmärksammat hunden som en potentiell modell för funktionella studier relaterade till foveala fotoreceptorer samt, hur olika genetiska ögonsjukdomar i dessa regioner uppkommer samt potentiella behandlingsformer (Beltran et al., 2014).

Möss och råttor har varit de modelldjur som använts för biologisk och patologisk forskning av den mänskliga näthinnan då välutvecklade molekylära tekniker finns för möss och råttor. Deras avsaknad av en fovealiknande region har gjort dem mindre lämpade att använda i viss forskning. Då *fovea centralis* finns hos alla primater vore apor bra modelldjur. De har dock få naturligt förekommande ärftliga retinopatier samt att det är komplicerat att få tillstånd till

att bedriva djurförsök på apor. Många etiska samt ekonomiska aspekter måste beaktas. Hunden är det modelldjur som hittills har flest naturligt förekommande ärftliga retinopatier (Beltran et al., 2014). Människors och hundars ögon är även mer lika i storlek i jämförelse med möss eller råttor vilket gör att medicinska ingrepp går att utföra på liknande sätt (Winkler et al., 2013).

2.4 Metoder för identifiering av gener associerade med ökad risk att utveckla retinopatier

2.4.1 Kandidatgen

Innan år 1997 fanns få genomiska verktyg utformade för hund. Den främsta metoden som användes för att identifiera genvarianter associerade med ökad risk att utveckla sjukdom var kandidatgen-metoden. Kandidatgener valdes utifrån tidigare kända gener som identifierats i andra arter, till exempel människor och möss. Kandidatgener kunde även väljas utefter deras koppling till kända signalvägar och genetiska defekter. Metoden har historiskt haft få framgångar för retinopati. Mutationer har enbart lyckats identifieras i 3,4% av studier på retinopatier även då man försökt identifiera kandidatgener som varit relaterade till generella funktioner i näthinnan (Miyadera et al., 2012).

2.4.2 Kopplingsanalys

Kopplingsanalys kräver utförliga och säkra stamtavlor och fenotypisk data från flera generationer av en familj hundar med både sjuka och friska avkommor. Genomet hos hundarna studeras för att hitta samnedärvning av genetiska markörer i detta fall mikrosatelliter, vilka är korta DNA sekvenser som repeterar sig. Detta är i syfte att identifiera rekombinationer i meiosen mellan sjukdomsfenotypen och de genetiska markörerna samt avgöra var på kromosomerna dessa rekombinationer har skett (Miyadera et al., 2012). Sannolikheten att två markörer samnedärvs är beroende av avståndet mellan dessa. Ett kortare avstånd mellan markörerna ökar sannolikheten att dessa samnedärvs (Terwilligerl & Ott, 2008). När man identifierat vilka delar av kromosomerna som samnedärvs med sjukdomsfenotypen, kartläggs denna region noggrant med flera markörer för att ytterligare begränsa området. Sedan används kandidatgen-metoden för att studera lämpliga kandidatgener inom det området som definierats av kopplingen mellan marköralleler och risk att utveckla sjukdom. De flesta hundar har utförliga stamtavlor, stora kullar och relativt kort livslängd vilket underlättar insamling av

data och gör hundar väl anpassade för genetiska studier. Detta kan vara komplicerat i praktiken på grund av att det kan vara svårt att få tillgång till och tillåtelse av hundägare att samla in DNA prover från deras hundar (Miyadera et al., 2012).

2.4.3 GWAS

Lindblad-Toh et al., 2005 sekvenserade en boxertiks genom, genom att använda helgenomsekvensering (WGS). Baserat på denna sekvens samt genomsekvenser från ett tiotal ytterligare raser kunde över 2,5 miljoner SNP identifieras i hundens genom (Lindblad-Toh et al., 2005). SNP, som genetiska markörer, är fler och utplacerade tätare och mer vidsträckt över genomet än mikrosatelliter. Med SNP array, vilket är en molekylärbioologisk metod för att genotypa SNP i ett genom, blir det dessutom lättare att hitta och analysera SNP. Detta möjliggör att utföra helgenom associationsstudier (GWAS) (Miyadera et al., 2012). Lindblad-Toh et al., 2005 beräknade att med GWAS skulle en region associerad med en autosomalt recessiv egenskap kunna identifieras med hjälp av cirka 15 000 SNP och 20 hundar, 10 individer med den eftersökta egenskapen och 10 individer som agerar kontroller. Detta kunde konfirmeras genom att den gen som är associerad med vit färg hos bland annat boxer identifierades med GWAS där 10 vita och 10 bruna boxrar användes (Karlsson et al., 2007).

De medverkande hundarna bör inte, till skillnad från kopplingsanalys, vara släkt med varandra. Viktigt att tänka på i en associationsstudie är att hundraser är väldigt olika och får inte medverka i samma studie. Inte heller bör de medverkande hundarna vara geografiskt åtskilda då studier har visat att till exempel Golden retrievers från Amerika jämfört med Europa är likvärdigt skilda från varandra som människopopulationer från Europa och Asien. Vid en noggrannare kartläggningen utnyttjas det faktum att linkage disequilibrium (LD) är väldigt omfattande inom raser och betydligt mindre mellan raser. Den framtagna associerade regionen, kan med hjälp av andra närbesläktade hundraser med samma fenotypvariation ytterligare begränsas (Karlsson et al., 2007). I fallet vit färg användes Bullterrier som ras nummer två (Baranowska Körberg et al., 2014). Då den andra flaskhalsen är relativt nyskapad och sekvenseringsstudier har visat att olika hundraser delar haplotyper från den ursprungliga domesticerade hunden är det troligt att många sjukdomsframkallande mutationer är gemensamma mellan olika hundraser. Sist letar man efter kandidatgener och mutationer inom det associerade området (Karlsson et al., 2007).

2.4.4 WGS

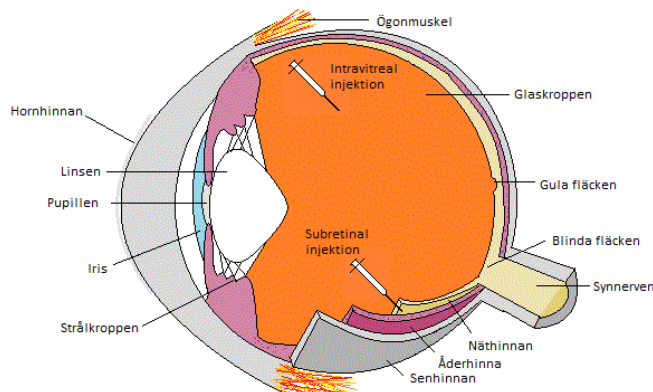
GWAS har vid studier visat sig vara en effektiv metod för att kartlägga en region av genomet som är associerad med en viss fenotyp. Detta om cirka 40 hundar, 10-20 individer med den sökta egenskapen och 10-20 individer som agerar kontroller finns att tillgå. Vid ovanliga sjukdomar kan det vara tidskrävande att hitta tillräckligt många individer för att kunna genomföra en GWAS (Sayyab et al., 2016). Metoder som använder massiv parallell sekvensering, ofta kända som next-generation sekvensering (NGS) har funnits ett tag men har varit för dyrt för att användas i många studier. Teknikutvecklingen av NGS har gått framåt och kostnaderna för att genomföra metoderna har sjunkit i pris. Helgenomsekvensering (WGS) och hel exom sekvensering (WES) är exempel på NGS-metoder (Viluma et al., 2015). NGS har inte enbart gjort det möjligt att sekvensera en individs hela genom till ett lägre pris, utan gör det också möjligt att spåra genetisk variation i en större utsträckning. I många studier har man kombinerat NGS med GWAS. GWAS används för att identifiera sjukdomsmutationer och ta fram en associerad region hos ett antal individer. Sedan kartläggs genomet hos en sjuk individ med sekvensering av den associerade regionen så kallad "targeted re-sequencing". På senare tid har direkt sekvensering med WGS utförts på en familjetrio bestående av två friska föräldrar och en sjuk avkomma. Den sjuka individens genomsekvens jämförs sedan med de båda friska föräldrarnas genomsekvenser för att hitta kandidatmutationer (Sayyab et al., 2016).

2.5 Behandlingsmetoder

Idag finns ingen behandling för ärftlig retinopati. Försök på potentiella behandlingsmetoder pågår, bland annat näthinnetransplantation, stamcellsterapier och olika genterapier (Beltran, 2009). I denna litteraturgenomgång kommer enbart genterapi att beskrivas.

Innan en ny behandlingsmetod kan testas görs utvärderingar för att fastställa dess effektivitet. Ett modelldjur väljs ut och tidsspannet då metoden bör ha effekt. Potentiella negativa effekter av en behandling utvärderas samt hur applicering av hur behandlingen ska utföras. Viktig information för framtagandet av en effektiv behandlingsmetod inkluderar, hur sjukdomen nedärvs, vilken typ av mutation och på vilken gen, samt vilka av näthinns celler som sjukdomen påverkar. Behandlingsmetoden måste specificeras så att den enbart behandlar de defekter sjukdomen orsakar. Ögats anatomi tillåter applicering av substanser som inte är gångbara vid systemisk applikation. Detta kan effektivisera behandlingsmetoder då applikationsmetod påverkar resultaten. För att tillräckligt höga koncentrationer

av behandlingen ska nå näthinnan kan subretinala eller intravitreala injektioner behövas (Figur 3) (Beltran, 2009).



Figur 3. Schematisk bild av mänskligt öga med intravitreala och subretinala injektionsmarkörer (Susanna Berger, 2017).

2.5.1 Genterapi

Då en gen, vid genterapi, behöver nå en specifik celltyp samt tillräckligt många celler för att uppnå en terapeutisk effekt är det idag vanligt att använda virala vektorer för detta. Recombinant adeno-associated virus (rAAV), som en viral vektor, har i studier visats vara ofarliga med en långtidsvarande effekt av transgenen. Detta har gjort att rAAV är bland de mest använda vektorerna när det kommer till genterapier på näthinnan. Stora gener kan än så länge inte användas då rAAV vektorn inte har möjlighet att inkorporera dessa. Vid användandet av stora gener får man använda vektorer baserade på till exempel adenovirus eller lentivirus. På grund av sin celltropism kan lentivirus vid genterapier på näthinnan endast användas vid behandling på RPE. Adenovirus kan användas vid stora gener men har en kortvarande effekt och ger ofta en stark immunologisk reaktion (Beltran, 2009).

Hos råttor och möss har man med genterapi lyckats bromsa sjukdomsförloppet för olika ärftliga retinopatier genom att få nedbrytningen av fotoreceptorerna att avta (Acland et al., 2001). Acland et al., 2001 genomförde den första genterapin med hund som modell för en sjukdomsmutation i RPE65 genen. Den orsakar en form av LCA hos människa och en motsvarande sjukdom hos hund (Acland et al., 2001). Vid mutationer i RPE65 genen slutar den retinoida cykeln fungera korrekt.

En positiv aspekt av mutationer i RPE65 är att de retinala cellerna degenererar över en längre tidsperiod. Detta möjliggör genterapi tidigt i individens liv för att byta ut den skadade RPE65 genen med en fungerande (Alkharashi & Fulton, 2017). I studien av Acland et al., 2001 användes rAAV vektorer. Tre sjuka hundar, cirka fyra månader gamla, användes i studien vars ögon antingen blev injicerade subretinalt eller intravitrealt. En fjärde sjuk hund som inte behandlades användes som kontroll (Acland et al., 2001).

Elektroretinogram (ERG), som mäter den elektriska responsen näthinnans celler genererar vid ljusstimuli, användes som diagnostiskt test för att se hur hundarnas ögon svarade på ljusstimuli efter behandlingen. Ögon som injicerats subretinalt visade förbättringar men det gjorde inte ögon som injicerats intravitrealt. Olika syntester visade också att hundarna vid dagsljus kunde se som en ”normal” hund. Hundarna kunde undvika objekt som var på deras högra sida, sidan med det subretinalt injicerade ögat, men inte objekt på deras vänstra sida, vid tester under svagt rött ljus. Hunden som användes som kontroll kunde inte undvika några objekt. Detta var den första studie som visat att genterapi av en retinopati på en större djurmodell är möjligt och den första studien som visat att genterapi kan återställa synen hos behandlade individer och inte enbart bromsa sjukdomsförloppet (Acland et al., 2001).

Då flera genterapistudier av RPE65 mutationen, många med hunden som modell, utförts med goda resultat har fas I och II försök på människor utförts. Tre studier av tre olika grupper utfördes samtidigt. I varje studie fick tre patienter subretinala injektioner av vildtyp RPE65 i patientens minst fungerande öga. Alla studierna använde rAAV vektorer. Injektionsdos, kirurgiska metoder samt analysmetoder varierade mellan studierna. Ingen av grupperna noterade några negativa effekter av behandlingen så som kraftig immunologisk respons. Även de kirurgiska ingreppen ansågs gå bra (Alkharashi & Fulton, 2017).

Resultaten av studierna publicerades 2009 och visar att patienternas syn blev förbättrad men att graden av förbättring troligtvis är åldersrelaterad då yngre patienter visade större förbättringar. Den mest lyckade studien av de tre, utökade sin fas I och II och tog med nio nya patienter som fick genomgå samma behandling men med vissa förändringar i till exempel dosering och kirurgiska ingrepp. Inte heller denna gång noterades några negativa effekter av behandlingen och alla patienterna fick förbättrad syn, speciellt de yngre patienterna (Alkharashi & Fulton, 2017). Behandlingen har visats nå sin topp inom ett halvår och förbättringarna i synen har varit stabila under cirka tre års tid då effekten av behandlingen sedan börjar avta. Alkharashi & Fulton, 2017 spekulerar att större injektionsdoser möjligen kan öka effekten. Studier har utförts för att se om några negativa effekter uppkommer om en patient får en andra dos av genterapin. Tre patienter från fas I och II studierna fick sitt andra öga injicerat. Efter en

sexmånaderskontroll fastställdes att inga negativa effekter, såsom en stark immunologisk respons, uppkom. Dessa upptäckter har gjort att fas III försök har startat och resultaten planeras publiceras år 2029 då uppföljning av studien pågått i 15 år (Alkharashi & Fulton, 2017).

Mutationer på RPE65 genen påverkar i första hand den retinoida cykeln och nedbrytningen av fotoreceptorerna kommer som en sekundäreffekt. Detta resulterar i att dessa sjukdomsmutationer inte är representativa för de vanligare formerna av retinopati. För dessa krävs en genterapi som klarar av att behandla skadade fotoreceptorceller så att de återfår sin normala funktion samt klarar av att behålla denna (Komaromy et al., 2010). Komaromy et al., 2010 utförde en studie där hunden användes som modell för genterapi av medfödd Achromatopsia, vilket är en retinopati där tapparna degenereras och orsakar bland annat total färgblindhet hos den sjuka individen. Att den först och främst påverkar tapparna gör denna sjukdom till en bra modellsjukdom för utvecklingen av en funktionell genterapi för mutationer som påverkar fotoreceptorerna. Achromatopsia har hittills associerats med fyra gener hos människa (Komaromy et al., 2010).

Komaromy et al., 2010 valde att studera två mutationer på CNGB3 genen varav en utav dessa mutationer även är känd hos hunden. Vektorn som användes i studien var rAAV, bärandes på en mänsklig CNGB3 transgen. Dessa rAAV vektorer injicerades subretinalt in i hundarnas ögon. Förbättrad funktion av tapparna studerades sedan med hjälp av ERG. Studien visade att det går att återställa funktionen av skadade tappar med hjälp av genterapi hos hundar med en sjukdom motsvarande människans Achromatopsia. Behandlingen visade sig vara oberoende av vilken mutation som påverkade CNGB3 genen då båda mutationerna svarade likadant på behandlingen. Behandlingens effektivitet påverkades av hundens ålder. Normalt för båda mutationerna är att hundarna blir blinda i starkt ljus vid cirka åtta veckors ålder. I hundar som var yngre än 28 veckor återställdes funktionen av tapparna i elva av fjorton ögon. Bara ett av tre ögon på hundar äldre än 54 veckor fick tillbaka funktionen i tapparna (Komaromy et al., 2010).

Vid långtidsuppföljning har behandlingen visat sig stabil även efter två och ett halvt år. Om genterapin utförs vid rätt åldersspann kan denna studie spela stor roll för framtida försök, både på mänskliga patienter som lider av medfödd Achromatopsia orsakad av mutationer i CNGB3 genen men även andra retinopatier där huvudsakligen tapparna påverkas (Komaromy et al., 2010).

3 Diskussion

Över 45 genvarianter har hittills visats vara associerade med RP hos människa (Hartong et al., 2006) och 23 med LCA (Alkharashi & Fulton, 2017) vilka är enbart två av många sjukdomsgrupper som klassificeras som retinopatier. Detsamma gäller för hunden där hittills 28 olika genvarianter har visats vara associerade till ökad risk att utveckla ärftliga retinopatier. Hundens motsvarighet till RP, PRA, förekommer i över 100 hundraser där flera olika former av PRA kan drabba samma hundras. Retinopatiernas många olika nedärvningsmönster, olika ålder då sjukdomarna uppkommer och tidsvarierande sjukdomsförlopp bidrar också till att det enligt Mellersh, 2014 och Miyadera et al., 2012, är svårt att identifiera och klassificera sjukdomarna.

Hunden har på grund av de två genetiska flaskhalsarna en mycket liten genetisk variation inom varje hundras men stor variation mellan de olika raserna (Karlsson et al., 2007). Att en sjukdom förekommer med högre frekvens inom en viss hundras kan tyda på att det är ett fåtal loci inblandade i sjukdomens uppkomst. Detta gör att det enligt Lindblad-Toh et al., 2005, är lättare att identifiera sjukdomsgenerna hos hund jämfört med människa. Möss och råttor har varit de modelldjur som använts vid forskning av den mänskliga näthinnan men deras ögonstorlek gör det svårt att utföra vissa medicinska ingrepp. De saknar också en fovealiknande region. I jämförelse har hundens ögon enligt Beltran et al., 2014 fler anatomiska likheter med människans. Deras ögon är ungefär lika stora och hunden har, vilket nyligen upptäckts av Beltran et al., 2014, en fovealiknande region som har liknande påtaglighet för genetisk skada som människans foveola.

Primater har en *fovea centralis* vilket gör att apor vore bra modelldjur. Nackdelarna är dock fler än fördelarna. Apor har väldigt få naturligt förekommande ärftliga ögonsjukdomar. Detta gör att det enligt Beltran et al., 2014, är mycket svårt att få tillstånd att bedriva forskning på apor då många etiska och ekonomiska aspekter måste beaktas. Många skulle nog anse att inducera ögonsjukdomar i friska individer för att bedriva forskning som oetiskt. Det sätt vi avlat hundar på har bidragit till att ärftliga sjukdomar som även förekommer hos

människa har uppkommit i högre frekvens hos hunden (Karlsson et al., 2007). Detta gör att hunden är det modelldjur med flest naturligt förekommande ärftliga ögonsjukdomar (Beltran et al., 2014). De flesta hundar som går i avel blir enligt Mellersh, 2014, ögonlysta vilket gör att hundars ögonsjukdomar är väldokumenterade.

Att hundens ögon har anatomiska likheter med människans innebär att hundar är bra modeller för genterapiforskning. Förutom att identifiera sjukdomsgenen, mutationen samt vilka celler dessa påverkar måste man också ta hänsyn till tidsspannet då en behandling har effekt. Både Alkharashi & Fulton, 2017 och Komaromy et al., 2010 tar upp att yngre individer svarar bättre och med större effekt på behandlingarna. Detta är dock inte så konstigt då många retinopatier är degenerativa sjukdomar som förvärras med tiden. Hittas och behandlas sjukdomen tidigt har sjukdomen inte hunnit framskrida så långt vilket gör att mindre skada behöver repareras. Hur behandlingen ska appliceras är ytterligare en aspekt som behöver beaktas. Acland et al., 2001 testade att injicera hundarnas ögon både subretinalt och intravitrealt. De ögon som injicerats subretinalt visade vid utvärderingen av behandlingen stora förbättringar. De intravitreala injektionerna gav inga förbättringar. Resultatet av denna studie kan ha påverkat efterkommande studier då både studierna Alkharashi & Fulton, 2017 tar upp, samt studien av Komaromy et al., 2010 använde sig av subretinala injektioner.

Val av vektor, så att transgenen når rätt celler utan att orsaka stora immunologiska reaktioner, är också av vikt. rAAV har, som vektor enligt Beltran, 2009, visat sig vara ofarlig, med ingen eller liten immunologisk reaktion samt en långtidsvarande effekt av transgenen. Negativt med rAAV vektorer är att de bara kan inkorporera små gener vilket gör att de inte går att använda vid genterapi av stora gener. Trots detta är rAAV vektorn enligt Beltran, 2009 den mest använda inom genterapiforskning. Alla de genterapistudier som tagits upp i denna litteraturgenomgång har använt rAAV vektorer med goda resultat utan att ha givit kraftiga immunologiska responser. Detta tyder på att de är säkra att använda.

RPE-genterapi har efter lyckade studier, först med hund som modell och sedan fas I och II försök på människa, nått fas III försök som pågår för närvarande. RPE-genterapi är dock inte representativt för de vanligare formerna av retinopati då mutationen är unik och påverkar fotoreceptorerna sekundärt efter RPE-cellerna. Studien av Komaromy et al., 2010 visar att även fotoreceptorernas funktion går att återställa då denna studie lyckades återställa funktionen av tapparna hos hundarna. Detta bådär gott för framtida fas I och II försök hos människa med medfödd Achromatopsia samt andra genterapier med syfte att återställa skadade tappar till följd av andra retinopatier. RPE-genterapiförsöken som Alkharashi & Fulton, 2017 tar upp visar att behandlingen når sin topp vid sex månader och är därefter stabil i minst tre års tid innan effekten börjar avta. Komaromy et al., 2010 fick ett

liknande resultat där deras behandling var stabil i minst två och ett halvt år. Positivt är att det har visat sig vara ofarligt att ge patienter flera doseringar då varken den första dosen eller den andra givit någon stark immunorespons.

Då denna litteraturgenomgång enbart berör genterapi, som en möjlig behandlingsmetod för ärftliga retinopatier, går det inte att göra jämförelser mellan genterapi och andra behandlingsmetoder och därför inte heller om det ena är bättre än det andra. Resultaten av de genterapistudier som behandlats i denna litteraturgenomgång visar att genterapi är en lovande behandlingsmetod. Med mer forskning kan det vara möjligt att effektivisera metoden och i och med detta, förlänga och förstärka dess effekter. Utvärderingen av hunden som ett modelldjur för retinopatiforskning kan besvaras med större säkerhet. Hundars utförliga stamtavlor, genetiska fördelar samt de många anatomiska likheter deras ögon har med människans, gör att hunden är ett mycket bra modelldjur som är väl anpassad för forskning på ärftliga ögonsjukdomar förekommande hos människan och hunden.

Referenslista

- Ahonen, S. J., Arumilli, M. & Lohi, H. (2013). A CNGB1 Frameshift Mutation in Papillon and Phalène Dogs with Progressive Retinal Atrophy. (Krahe, R., Ed) *PLoS ONE*, 8(8), p e72122.
- Ahonen, S. J., Arumilli, M., Seppälä, E., Hakosalo, O., Kaukonen, M. K., Komáromy, A. M. & Lohi, H. (2014). Increased Expression of MERTK is Associated with a Unique Form of Canine Retinopathy. (Booth, D. R., Ed) *PLoS ONE*, 9(12), p e114552.
- Alkharashi, M. & Fulton, A. B. (2017). Available Evidence on Leber Congenital Amaurosis and Gene Therapy. *Seminars in Ophthalmology*, 32(1), pp 14–21.
- Baranowska Körberg, I., Sundström, E., Meadows, J. R. S., Rosengren Pielberg, G., Gustafson, U., Hedhammar, Å., Karlsson, E. K., Seddon, J., Söderberg, A., Vilà, C., Zhang, X., Åkesson, M., Lindblad-Toh, K., Andersson, G. & Andersson, L. (2014). A Simple Repeat Polymorphism in the MITF-M Promoter Is a Key Regulator of White Spotting in Dogs. (Murphy, W. J., Ed) *PLoS ONE*, 9(8), p e104363.
- Beltran, W. A. (2009). The use of canine models of inherited retinal degeneration to test novel therapeutic approaches. *Veterinary Ophthalmology*, 12(3), pp 192–204.
- Beltran, W. A., Cideciyan, A. V., Guzewicz, K. E., Iwabe, S., Swider, M., Scott, E. M., Savina, S. V., Ruthel, G., Stefano, F., Zhang, L., Zorger, R., Sumaroka, A., Jacobson, S. G. & Aguirre, G. D. (2014). Canine Retina Has a Primate Fovea-Like Bouquet of Cone Photoreceptors Which Is Affected by Inherited Macular Degenerations. (Swaroop, A., Ed) *PLoS ONE*, 9(3), p e90390.
- Botigué, L. R., Song, S., Scheu, A., Gopalan, S., Pendleton, A. L., Oetjens, M., Taravella, A. M., Seregély, T., Zeeb-Lanz, A., Arbogast, R.-M., Bobo, D., Daly, K., Unterländer, M., Burger, J., Kidd, J. M. & Veeramah, K. R. (2017). Ancient European dog genomes reveal continuity since the Early Neolithic. *Nature Communications*, 8, p 16082.
- Cooper, A. E., Ahonen, S., Rowlan, J. S., Duncan, A., Seppälä, E. H., Vanhapelto, P., Lohi, H. & Komáromy, A. M. (2014). A Novel Form of Progressive Retinal Atrophy in Swedish Vallhund Dogs. (Stieger, K., Ed) *PLoS ONE*, 9(9), p e106610.
- Dekomien, G., Vollrath, C., Petrasch-Parwez, E., Boevé, M. H., Akkad, D. A., Gerding, W. M. & Epplen, J. T. (2010). Progressive retinal atrophy in Schapendoes dogs: mutation of the newly identified CCDC66 gene. *neurogenetics*, 11(2), pp 163–174.
- Downs, L. M., Bell, J. S., Freeman, J., Hartley, C., Hayward, L. J. & Mellersh, C. S. (2013). Late-onset progressive retinal atrophy in the Gordon and Irish Setter breeds is associated with a frameshift mutation in *C2orf71*. *Animal Genetics*, 44(2), pp 169–177.
- Downs, L. M., Wallin-Håkansson, B., Bergström, T. & Mellersh, C. S. (2014). A novel mutation in *TTC8* is associated with progressive retinal atrophy in the golden retriever. *Canine genetics and epidemiology*, 1(1), p 4.

- Downs, L. M., Wallin-Håkansson, B., Bournsnel, M., Marklund, S., Hedhammar, Å., Truvé, K., Hübnette, L., Lindblad-Toh, K., Bergström, T. & Mellersh, C. S. (2011). A Frameshift Mutation in Golden Retriever Dogs with Progressive Retinal Atrophy Endorses SLC4A3 as a Candidate Gene for Human Retinal Degenerations. (Toland, A. E., Ed) *PLoS ONE*, 6(6), p e21452.
- Farias, F. H. G., Johnson, G. S., Taylor, J. F., Giuliano, E., Katz, M. L., Sanders, D. N., Schnabel, R. D., McKay, S. D., Khan, S., Gharahkhani, P., O'Leary, C. A., Pettitt, L., Forman, O. P., Bournsnel, M., McLaughlin, B., Ahonen, S., Lohi, H., Hernandez-Merino, E., Gould, D. J., Sargan, D. R. & Mellersh, C. (2010). An *ADAMTS17* Splice Donor Site Mutation in Dogs with Primary Lens Luxation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 51(9), p 4716.
- Goldstein, O., Guyon, R., Kukekova, A., Kuznetsova, T. N., Pearce-Kelling, S. E., Johnson, J., Aguirre, G. D. & Acland, G. M. (2010a). COL9A2 and COL9A3 mutations in canine autosomal recessive oculoskeletal dysplasia. *Mammalian Genome*, 21(7–8), pp 398–408.
- Goldstein, O., Jordan, J. A., Aguirre, G. D. & Acland, G. M. (2013). A non-stop S-antigen gene mutation is associated with late onset hereditary retinal degeneration in dogs. *Molecular vision*, 18, p 1871.
- Goldstein, O., Kukekova, A. V., Aguirre, G. D. & Acland, G. M. (2010b). Exonic SINE insertion in STK38L causes canine early retinal degeneration (erd). *Genomics*, 96(6), pp 362–368.
- Goldstein, O., Mezey, J. G., Boyko, A. R., Gao, C., Wang, W., Bustamante, C. D., Anguish, L. J., Jordan, J. A., Pearce-Kelling, S. E., Aguirre, G. D. & others (2010c). An ADAM9 mutation in canine cone-rod dystrophy 3 establishes homology with human cone-rod dystrophy 9. *Molecular vision*, 16, p 1549.
- Guziewicz, K. E., Zangerl, B., Lindauer, S. J., Mullins, R. F., Sandmeyer, L. S., Grahn, B. H., Stone, E. M., Acland, G. M. & Aguirre, G. D. (2007). Bestrophin Gene Mutations Cause Canine Multifocal Retinopathy: A Novel Animal Model for Best Disease. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 48(5), p 1959.
- Hartong, D. T., Berson, E. L. & Dryja, T. P. (2006). Retinitis pigmentosa. *The Lancet*, 368(9549), pp 1795–1809.
- Karlsson, E. K., Baranowska, I., Wade, C. M., Salmon Hillbertz, N. H. C., Zody, M. C., Anderson, N., Biagi, T. M., Patterson, N., Pielberg, G. R., Kulbokas, E. J., Comstock, K. E., Keller, E. T., Mesirov, J. P., von Euler, H., Kämpe, O., Hedhammar, Å., Lander, E. S., Andersson, G., Andersson, L. & Lindblad-Toh, K. (2007). Efficient mapping of mendelian traits in dogs through genome-wide association. *Nature Genetics*, 39(11), pp 1321–1328.
- Kijas, J. W., Cideciyan, A. V., Aleman, T. S., Pianta, M. J., Pearce-Kelling, S. E., Miller, B. J., Jacobson, S. G., Aguirre, G. D. & Acland, G. M. (2002). Naturally occurring rhodopsin mutation in the dog causes retinal dysfunction and degeneration mimicking human dominant retinitis pigmentosa. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(9), pp 6328–6333.
- Komaromy, A. M., Alexander, J. J., Rowlan, J. S., Garcia, M. M., Chiodo, V. A., Kaya, A., Tanaka, J. C., Acland, G. M., Hauswirth, W. W. & Aguirre, G. D. (2010). Gene therapy rescues cone function in congenital achromatopsia. *Human Molecular Genetics*, 19(13), pp 2581–2593.
- Kuchtey, J., Olson, L. M., Rinkoski, T., MacKay, E. O., Iverson, T. M., Gelatt, K. N., Haines, J. L. & Kuchtey, R. W. (2011). Mapping of the Disease Locus and Identification of ADAMTS10 As a Candidate Gene in a Canine Model of Primary Open Angle Glaucoma. (Barsh, G. S., Ed) *PLoS Genetics*, 7(2), p e1001306.
- Kukekova, A. V., Goldstein, O., Johnson, J. L., Richardson, M. A., Pearce-Kelling, S. E., Swaroop, A., Friedman, J. S., Aguirre, G. D. & Acland, G. M. (2009). Canine RD3 mutation establishes rod-cone dysplasia type 2 (rcd2) as ortholog of human and murine rd3. *Mammalian Genome*, 20(2), pp 109–123.

- Larhammar, D., Nordstrom, K. & Larsson, T. A. (2009). Evolution of vertebrate rod and cone phototransduction genes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1531), pp 2867–2880.
- Lindblad-Toh, K., Wade, C. M., Mikkelsen, T. S., Karlsson, E. K., Jaffe, D. B., Kamal, M., Clamp, M., Chang, J. L., Kulbokas, E. J., Zody, M. C., Mauceli, E., Xie, X., Breen, M., Wayne, R. K., Ostrander, E. A., Ponting, C. P., Galibert, F., Smith, D. R., deJong, P. J., Kirkness, E., Alvarez, P., Biagi, T., Brockman, W., Butler, J., Chin, C.-W., Cook, A., Cuff, J., Daly, M. J., DeCaprio, D., Gnerre, S., Grabherr, M., Kellis, M., Kleber, M., Bardeleben, C., Goodstadt, L., Heger, A., Hitte, C., Kim, L., Koepfli, K.-P., Parker, H. G., Pollinger, J. P., Searle, S. M. J., Sutter, N. B., Thomas, R., Webber, C., Baldwin, J., Abebe, A., Abouelleil, A., Aftuck, L., Ait-zahra, M., Aldredge, T., Allen, N., An, P., Anderson, S., Antoine, C., Arachchi, H., Aslam, A., Ayotte, L., Bachantsang, P., Barry, A., Bayul, T., Benamara, M., Berlin, A., Bessette, D., Blitshteyn, B., Bloom, T., Blye, J., Boguslavskiy, L., Bonnet, C., Boukhgalter, B., Brown, A., Cahill, P., Calixte, N., Camarata, J., Cheshatsang, Y., Chu, J., Citroen, M., Collymore, A., Cooke, P., Dawoe, T., Daza, R., Decktor, K., DeGray, S., Dhargay, N., Dooley, K., Dooley, K., Dorje, P., Dorjee, K., Dorris, L., Duffey, N., Dupes, A., Egbiremolen, O., Elong, R., Falk, J., Farina, A., Faro, S., Ferguson, D., Ferreira, P., Fisher, S., FitzGerald, M., Foley, K., Foley, C., Franke, A., Friedrich, D., Gage, D., Garber, M., Gearin, G., Giannoukos, G., Goode, T., Goyette, A., Graham, J., Grandbois, E., Gyaltzen, K., Hafez, N., Hagopian, D., Hagos, B., Hall, J., Healy, C., Hegarty, R., Honan, T., Horn, A., Houde, N., Hughes, L., Hunnicutt, L., Husby, M., Jester, B., Jones, C., Kamat, A., Kanga, B., Kells, C., Khazanovich, D., Kieu, A. C., Kisner, P., Kumar, M., Lance, K., Landers, T., Lara, M., Lee, W., Leger, J.-P., Lennon, N., Leuper, L., LeVine, S., Liu, J., Liu, X., Lokyitsang, Y., Lokyitsang, T., Lui, A., Macdonald, J., Major, J., Marabella, R., Maru, K., Matthews, C., McDonough, S., Mehta, T., Meldrim, J., Melnikov, A., Meneus, L., Mihalev, A., Mihova, T., Miller, K., Mittelman, R., Mlenga, V., Mulrain, L., Munson, G., Navidi, A., Naylor, J., Nguyen, T., Nguyen, N., Nguyen, C., Nguyen, T., Nicol, R., Norbu, N., Norbu, C., Novod, N., Nyima, T., Olandt, P., O'Neill, B., O'Neill, K., Osman, S., Oyono, L., Patti, C., Perrin, D., Phunkhang, P., Pierre, F., Priest, M., Rachupka, A., Raghuraman, S., Rameau, R., Ray, V., Raymond, C., Rege, F., Rise, C., Rogers, J., Rogov, P., Sahalie, J., Settipalli, S., Sharpe, T., Shea, T., Sheehan, M., Sherpa, N., Shi, J., Shih, D., Sloan, J., Smith, C., Sparrow, T., Stalker, J., Stange-Thomann, N., Stavropoulos, S., Stone, C., Stone, S., Sykes, S., Tchuinga, P., Tenzing, P., Tesfaye, S., Thoulutsang, D., Thoulutsang, Y., Topham, K., Topping, I., Tsamla, T., Vassiliev, H., Venkataraman, V., Vo, A., Wangchuk, T., Wangdi, T., Weiland, M., Wilkinson, J., Wilson, A., Yadav, S., Yang, S., Yang, X., Young, G., Yu, Q., Zainoun, J., Zembek, L., Zimmer, A. & Lander, E. S. (2005). Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature*, 438(7069), pp 803–819.
- Mellersh, C. S., Bournsnel, M. E. G., Pettitt, L., Ryder, E. J., Holmes, N. G., Grafham, D., Forman, O. P., Sampson, J., Barnett, K. C., Blanton, S., Binns, M. M. & Vaudin, M. (2006a). Canine RPGRIP1 mutation establishes cone-rod dystrophy in miniature longhaired dachshunds as a homologue of human Leber congenital amaurosis. *Genomics*, 88(3), pp 293–301.
- Mellersh, C. S., Pettitt, L., Forman, O. P., Vaudin, M. & Barnett, K. C. (2006b). Identification of mutations in HSF4 in dogs of three different breeds with hereditary cataracts. *Veterinary ophthalmology*, 9(5), pp 369–378.
- Mellersh, S.C. (2014) The genetics of eye disorders in the dog. *Canine Genetics and Epidemiology* 1:3
- Miyadera, K., Acland, G. M. & Aguirre, G. D. (2012). Genetic and phenotypic variations of inherited retinal diseases in dogs: the power of within- and across-breed studies. *Mammalian Genome*, 23(1–2), pp 40–61.

- Parker, H. G., Kukekova, A. V., Akey, D. T., Goldstein, O., Kirkness, E. F., Baysac, K. C., Mosher, D. S., Aguirre, G. D., Acland, G. M. & Ostrander, E. A. (2007). Breed relationships facilitate fine-mapping studies: A 7.8-kb deletion cosegregates with Collie eye anomaly across multiple dog breeds. *Genome Research*, 17(11), pp 1562–1571.
- Petersen–Jones, S. M., Entz, D. D. & Sargan, D. R. (1999). cGMP phosphodiesterase- α mutation causes progressive retinal atrophy in the Cardigan Welsh corgi dog. *Investigative ophthalmology & visual science*, 40(8), pp 1637–1644.
- RetNet (2017). Number of Genes and Loci by Disease Category. <https://sph.uth.edu/retnet/sum-dis.htm#A-genes>. Hämtad: 2017-08
- Sayyab, S., Viluma, A., Bergvall, K., Brunberg, E., Jagannathan, V., Leeb, T., Andersson, G. & Bergström, T. F. (2016). Whole-Genome Sequencing of a Canine Family Trio Reveals a *FAM83G* Variant Associated with Hereditary Footpad Hyperkeratosis. *G3&#58; Genes|Genomes|Genetics*, 6(3), pp 521–527.
- Sidjanin, D. J., Lowe, J. K., McElwee, J. L., Milne, B. S., Phippen, T. M., Sargan, D. R., Aguirre, G. D., Acland, G. M. & Ostrander, E. A. (2002). Canine CNGB3 mutations establish cone degeneration as orthologous to the human achromatopsia locus ACHM3. *Human molecular genetics*, 11(16), pp 1823–1833.
- Suber, M. L., Pittler, S. J., Qin, N., Wright, G. C., Holcombe, V., Lee, R. H., Craft, C. M., Lolley, R. N., Baehr, W. & Hurwitz, R. L. (1993). Irish setter dogs affected with rod/cone dysplasia contain a nonsense mutation in the rod cGMP phosphodiesterase beta-subunit gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(9), pp 3968–3972.
- Terwilliger, J. D. & Ott, J. (2008). Handbook of human genetic linkage. New York: Rockefeller University. E-book
- Veske, A., Nilsson, S. G., Narfström, K., Gal, A. (1999). Retinal dystrophy of swedish Briard/Briard-Beagle dogs is due to a 4-bp deletion in RPE65. *Genomics*, 57, pp 57-61.
- Viluma, A., Sayyab, S., Mikko, S., Andersson, G. & Bergström, T. F. (2015). Evaluation of whole-genome sequencing of four Chinese crested dogs for variant detection using the ion proton system. *Canine Genetics and Epidemiology* [online], 2(1). Available from: <http://cgjournal.biomedcentral.com/articles/>. [Accessed 2017-04-27].
- Wiik, A. C., Ropstad, E. O., Ekesten, B., Karlstam, L., Wade, C. M. & Lingaas, F. (2015). Progressive retinal atrophy in Shetland sheepdog is associated with a mutation in the *CNGA1* gene. *Animal Genetics*, 46(5), pp 515–521.
- Wiik, A. C., Wade, C., Biagi, T., Ropstad, E.-O., Bjerkas, E., Lindblad-Toh, K. & Lingaas, F. (2008). A deletion in nephronophthisis 4 (NPHP4) is associated with recessive cone-rod dystrophy in standard wire-haired dachshund. *Genome Research*, 18(9), pp 1415–1421.
- Winkler, P. A., Ekenstedt, K. J., Occelli, L. M., Frattaroli, A. V., Bartoe, J. T., Venta, P. J. & Petersen-Jones, S. M. (2013). A Large Animal Model for CNGB1 Autosomal Recessive Retinitis Pigmentosa. (Hollander, A. I. den., Ed) *PLoS ONE*, 8(8), p e72229.
- Zangerl, B., Goldstein, O., Philp, A. R., Lindauer, S. J. P., Pearce-Kelling, S. E., Mullins, R. F., Graphodatsky, A. S., Ripoll, D., Felix, J. S., Stone, E. M., Acland, G. M. & Aguirre, G. D. (2006). Identical mutation in a novel retinal gene causes progressive rod–cone degeneration in dogs and retinitis pigmentosa in humans. *Genomics*, 88(5), pp 551–563.
- Zangerl, B., Wickström, K., Slavik, J., Lindauer, S. J., Ahonen, S., Schelling, C., Lohi, H., Guziewicz, K. E. & Aguirre, G. D. (2010). Assessment of canine BEST1 variations identifies new mutations and establishes an independent bestrophinopathy model (cmr3). *Molecular vision*, 16, p 2791.

- Zhang, Q., Acland, G. M., Parshall, C. J., Haskell, J., Ray, K. & Aguirre, G. D. (1998). Characterization of canine photoreceptor phosphodiesterase cDNA and identification of a sequence variant in dogs with photoreceptor dysplasia. *Gene*, 215(2), pp 231–239.
- Zhang, Q., Acland, G. M., Wu, W. X., Johnson, J. L., Pearce-Kelling, S., Tulloch, B., Vervoort, R., Wright, A. F. & Aguirre, G. D. (2002). Different RPGR exon ORF15 mutations in Canids provide insights into photoreceptor cell degeneration. *Human Molecular Genetics*, 11(9), pp 993–1003.