

Norges miljø- og biovitenskapelige universitet
Fakultet for veterinærmedisin og biovitenskap
Institutt for basalfag og akvamedisin
Seksjon for genetikk

Fordypningsoppgave 2015, 40 stp
Prosjektretning

Lydangst, gener og genetisk variasjon hos storpuddel

- En studie med hovedfokus på atferdsgener

Noise anxiety, genes and genetic variation in Standard
Poodles

- A study with focus on behaviour related genes

Karin Handegård Westereng
Kull 2009

Veileder Prof. Frode Lingaas

Innhold

Forord	5
Sammendrag	6
Definisjoner	7
Innledning	8
Bakgrunn	8
Hovedmål	11
Delmål	11
Materiale og metoder	11
Materiale	11
Utvelgelse av individer	12
Prøvetagning	12
Gener	13
CRH – Corticotropin-releasing hormone	13
RGS2 - Regulator of G-protein signaling 2	14
PSAP – Prosaposin	15
ATF2 – Activating transkripsjon factor 2	17
Primere	18
CRH	18
RGS2:	18
PSAP:	19
NE / ATF2:	20
Prosedyrer	20
Fortynning av primere 5%	20
DNA-isolering (kokemetode)	20

DNA-isolering fra svaber	20
PCR	21
Sekvensering BigDye	21
Mikrosatellitter	22
Genetiske analyser av gener med mulig assosiasjon til angst	23
CRH.....	23
RGS2	24
PSAP	25
NE / ATF2	26
Resultater.....	26
Helseundersøkelse	26
Sekvensering	30
CRH.....	30
RGS2	30
PSAP	31
Genetisk variasjon	32
NE / ATF2	34
Diskusjon.....	38
Lydangst	38
Genetisk variasjon	39
Nedarving av Neonatal Encephalopathy	44
Begrensninger.....	47
Konklusjon	48
Lydangst	48
Neonatal Encephalopathy	49

Takk til bidragsytere.....	51
Summary	51
Referanser.....	53
Vedlegg	60
Brev til dyreeier.....	60
Database	62

Forord

Allerede tidlig i tenårene fattet jeg en interesse for genetikk. Den gang var det hermelinkanin og fargegenetikk som var i fokus, med kryssavl for å teste hypoteser og kartlegge gener hos de ulike avlsdyrene. Sammen med mine venninner hadde jeg en god avlsstamme, med landets første hermelin rex i beige.

Da den siste kaninen døde i 2010 oppgraderte jeg og kjøpte meg storpuddelvalp, men tok med meg genetikkinteressen, og leste meg opp på gentester hos puddelrasene. Det var derfor en stor glede å oppdage at veterinærstudiet hadde en andel genetikk i flere fag. Under allmenn sykdomslære i 2011 kom jeg i snakk med Frode Lingaas, på grunn av spørsmål rundt gentesting for Neonatal Encephalopathy, en recessiv lidelse hos storpuddel som min egen hund kunne være bærer av. Frode foreslo den gang at vi kunne teste deler av den norske puddelpopulasjonen som en del av min fremtidige fordypningsoppgave.

Etter hvert har oppgaven vokst til å bli en studie i atferdsgenetikk, i tillegg til en studie av linjeavl og spredningen av NE i populasjonen. I tillegg åpnet det for å gjennomføre en større helseundersøkelse hos alle puddelrasene, til min store glede. Helsestatusen til "mine" raser er et engasjerende tema jeg legger mye tid i. Deler av statistikken fra helseundersøkelsen er blitt nyttig materiale i fordypningsoppgaven, resten vil være svært nyttig for klubben og puddeloppdrettere i fremtiden.

Sammendrag

Tittel: Lydangst, gener og genetisk variasjon hos storpuddel,
- et studie med hovedfokus på atferdsgener

Forfattere: Karin Handegård Westereng

Veileder: Prof. Frode Lingaas, BasAm, Seksjon for genetikk

Det er gjennomført en helseundersøkelse på norske storpuddler som viser at lydangst er utbredt i storpuddelpopulasjonen, og at sterk eller meget sterk frykt for fyrverkeri forekommer hos nesten 1 av 5 hunder. Studier viser at atferd er arvelig, og at det finnes en rekke gener som hos andre arter er assosiert med forekomst av angst.

Det er tatt DNA-prøve av 28 storpuddler med sterk eller meget sterk frykt for fyrverkeri, og 30 hunder uten frykt for fyrverkeri. Tre kandidatgener; som tidligere har vist seg å være assosiert med fryktatferd/angst/avvikende atferd; CRH, RGS2 og PSAP, ble sekvensert for å finne genetisk variasjon og vurdere om variasjon i disse genene kan assosieres med forekomsten av lydangst hos storpuddel. Resultatene viste at genene hadde liten variasjon hos puddel og det var ikke noen indikasjoner på at disse genene var assosiert med lydangst på denne rasen.

Undersøkelse av genetisk variasjon på 29 ubeslektede hunder ved hjelp av genetiske markører, viser en gjennomsnittlig heterozygotisiet på 0,62. Dette tyder ikke på at det er en urovekkende lav generell genetisk variasjon i rasen. Den lave genetiske variasjonen i de tre undersøkte atferdsrelaterte genene tyder derfor på at disse er konserverte i rasen, og at de ikke er assosiert med variasjon i risiko for angst hos storpuddel.

For å få et utvidet bakgrunnsmateriale for genetisk bakgrunn hos storpudde ble det også gjort en studie av linjeavl, ved å ta utgangspunkt i spredningen av genet for Neonatal Encephalopathy. DNA-prøver fra til sammen 70 storpudde er sekvensert på exon 5 i genet ATF2 for å kartlegge forekomsten av bærere av den recessive lidelsen NE. 10% av de undersøkte hundene er funnet å være bærere. Studier av stamtavler viste en hund som ligger bak all stamtavler med bærere og derfor kan være et sannsynligvis er opphav til genets spredning i populasjonen.

Definisjoner

SP - Storpudde

NKK – Norsk Kennel klub

NPK – Norsk Puddeklubb

NE(wS) – Neonatal Encephalopathy (with Seizures)

PCR – Polymerase chain reaction

RGS2 – Regulator of G-protein signaling 2

CRH – Corticotropin-releasing Hormone

PSAP – Prosaposin

UTR – Untranslated region

SNP – Single Nucleotide Polymorphism

OFA – Orthopedic Foundation for Animals

PHR – Poodle health registry

Innledning

Bakgrunn

Allerede på 50- og 60-tallet viste forskere at atferd (temperament) har høy arvegrad (Brace, 1962; Scott & Fuller, 1965), og i et studie av schæferhunder at temperament kan ha nært dobbelt så høy arvegrad som hoftelddysplasi, henholdsvis 0,51 og 0,26 (Mackenzie, Oltenacu, & Leighton, 1985). Senere har forskning vist sammenheng mellom arv og en rekke atferdsegenskaper, slik som lekelyst, jaktlyst og evne til å av reagere, men at grad av sammenheng varierer med rase (Saetre et al., 2006; Schmutz & Schmutz, 1998). Annen forskning viser høy grad av arvelighet i hunders sosiale evner i menneske-hund-interaksjoner (Persson, Roth, Johnsson, Wright, & Jensen, 2015). Som et bidrag i avlsarbeidet har en rekke hundeklubber, og organisasjoner som avler hunder til spesifikke formål (politi, forsvar, førerhundskoler etc.), begynt å bruke standardiserte atferdstester. Disse tester hundens lekelyst, jaktlyst, aggresjon, sosiale evner, evne til avreaksjon med mer, eksempelvis som Mentaltest Hund (MH). Norsk Puddelklubb anbefaler at avlshunder gjennomgår MH-test.

Frykt, både instinktiv og tillært, er naturlig atferd hos både dyr og mennesker, og er nødvendig for overlevelse. Frykt, flukt og evne til å reagere hurtig i gitte situasjoner gjør individet i stand til å unngå fare, og er spesialisert gjennom evolusjon (Marks, 1986a; Marks, 1986b; Ohl, 2005). Frykt manifesterer seg i fysiologiske responser, med tachykardi, økt spyttsekresjon, urinering/defekasjon, i tillegg til atferdsmessige reaksjoner som flukt, unngåelse eller forsvar (Sherman & Mills, 2008). Det er når fryktreaksjonen blir irrasjonell at

den er et problem. Når hunden viser uttalt frykt i normale situasjoner eller for ufarlige objekter kan frykten bli en dominerende del av livet for både hund og eier.

Angst er definert som ” en følelse av uro, anspenhet og forventning om at noe farlig kan hende, eller en overdreven fryktreaksjon på en hendelse.” (Store norske leksikon). Hos hund er det den overdrevne fryktreaksjonen som omtales som angst. Enkelte hunder er så redde for å være alene (separasjonsangst) at de både skader seg selv og ødelegger inventar hvis eieren går fra dem, også i en kort periode. Andre hunder er så redde for skarpe lyder (lydangst) at de for eksempel ikke kan være med på jakt, gå tur langs bilveien eller luftes i tordenvær. Det er sett sammenheng mellom lydangst og separasjonsangst (Overall, Dunham, & Frank, 2001; Sherman & Mills, 2008). Det er også sett at enkelte raser oftere er representert i studier på angstatferd, som både antyder at angst er arvelig, og at man ved avl på enkelte fysiske trekk også har avlet på angstpreget gemytt (Ohl, Arndt, & van der Staay, 2008).

Angst hos hund er en potensiell stor utfordring for hundeeieren i dagliglivet eller ved spesielle anledninger, og kan føre til vanskelige situasjoner for hund og eier (Ballamwar, Bonde, Mangle, & Vyavahare, 2008). Et amerikansk studie viste for eksempel at 40% av eiere som leverer hunden sin til omplassering oppgir at den har minst ett atferdsproblem (Salman et al., 1998). Hunder som er så redde at de ikke fungerer i hjemmet, viser aggresjon eller på annen måte er uhåndterlige for eieren vil måtte omplasseres, eller i verste fall avlives.

Etologiske studier av både dyr og mennesker viser at frykt er en varierende atferdsegenskap. Frykt for lyd er målbar i form av observasjoner. En hund vil enten vise frykt eller ikke vise frykt, når den utsettes for lyd. Enkelte individer viser klart sterkere frykt enn andre, når de utsettes for et felles stimuli. Flere vitenskapelige publikasjoner indikerer at det finnes en rekke

genetiske markører som kan kobles til angst hos dyr eller mennesker (Lacerda-Pinheiro et al., 2014; Marks, 1986b). Hunder har svært varierende atferdsegenskaper, spesialisert hos enkeltrasene gjennom avl, og er gode modeller for studier av atferdsgener. Men selv om en rekke studier beviser at atferd er arvelig, så har det vært få studier som har kunnet peke på enkeltgener hos hund (Spady & Ostrander, 2008).

Oppgaven vil fokusere på enkelte kandidatgener, og undersøke om det kan finnes genetiske markører som kan knyttes til lydangst i en spesifikk rase, med den hensikt at et slikt resultat kan brukes i avlsprogram for å unngå avl på engstelige dyr. Kandidatgenene er valgt på bakgrunn av andre studier, som viser at de har en assosiasjon til atferdsegenskaper hos dyr og/eller mennesker.

Det er gjort danske atferdsstudier på hund, som viser at puddelrasene har høyere risiko for generell angstatferd (Lund, Agger, & Vestergaard, 1996), og høyere risiko for skuddangst (Rugbjerg, Proschowsky, Ersboll, & Lund, 2003), enn andre rasehunder i de samme studiene. Denne prosjektoppgaven undersøker forekomst av angst hos storpuddler i Norge, og vil fokusere på eventuelle genetiske forskjeller mellom hunder med og hunder uten lydangst. For å snevre inn oppgaven til en enkelt målbar frykt, brukes angst mot høye lyder, og i denne forbindelse angst for lyden av fyrverkeri. Andre atferdsegenskaper vil belyses der det er relevant. Gjennom oppgaven vil det også være fokus på genetisk variasjon hos norske storpuddler.

Prosjektets hovedfokus vil være på genetik, og relevant laboratoriearbeid. Forståelse for og praktisk bruk av genforskning er fordypningsprosjektets hovedfokus.

Hovedmål

Undersøke forekomst av angstrelaterte atferdsegenskaper og genetisk assosiasjon av kandidatgener til lydangst hos storpuddel.

Delmål

1. Gjennomføre helseundersøkelse, og undersøke frekvensen av lydangst hos storpuddel.
2. Hente DNA fra blodprøver og svaberprøver.
3. Gjennomføre gensekvensering av kandidatgener.
4. Undersøke forekomst av heterozygoti i genet for NE hos storpuddel i Norge.
5. Undersøke genetisk variasjon på storpuddel ved stamtavlestudier og genetiske markører.

Materiale og metoder

Materiale

Norsk Puddelklubb ønsket å samle inn blodprøver fra norske storpuddler (med eiere som var medlem i Norsk Puddelklubb) med og uten angst for høye lyder. Totalt ble det samlet inn 70 blodprøver. Av disse hadde 58 hunder informasjon om lydangst; 28 «caser» og 30 kontroller. Hundene ble klassifisert som case eller kontroll basert på eiers utfylling av et spørreskjema der hver hunds følsomhet for lyd ble klassifisert etter en 5-punkt skala fra 1-5 (1: ikke redd for lyd; 2:mild frykt 3: middels frykt, 4:sterk frykt, 5: meget sterk). NKK-registrerte storpuddler over 1 års alder klassifisert som 4 eller 5 ble definert som caser. Hunder over 2 år

som hadde opplevd nyttårsaften to ganger og ble klassifisert som «1: ikke redd for lyd» ble inkludert som kontroller.

Utvelgelse av individer

Norsk Puddelklubb har annonsert etter hunder som er svært redde for fyrverkeri, via sin side på Facebook. Eiere har tatt kontakt, og prøver er samlet inn fra hele landet. Klubben har vært svært positive til undersøkelsen, og bidratt med god hjelp.

En database er laget med informasjon om hundene i studiepopulasjonen og kontrollgruppa (vedlegg).

Det er noen grad av slektskap mellom flere av hundene, både mellom uredde og redde, men også på tvers av disse gruppene. Ved sekvensering av gener er det valgt ulike hunder med mest mulig spredning på farge, kjønn og linje både fra studiepopulasjonen og kontrollgruppa.

Prøvetagning

6 prøver er hentet fra genbanken til NVH, som frosset EDTA-blod.

12 prøver er ferske EDTA-blodprøver, DNA er isolert før frysing / lagring.

De øvrige 52 prøvene er svaberprøver.

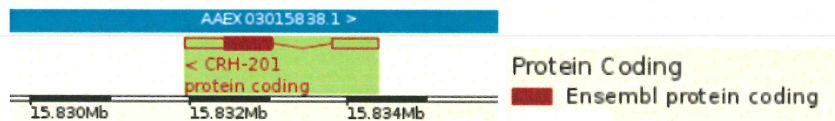
Gener

CRH – Corticotropin-releasing hormone

Corticotropin releasing hormone (factor), CRH, er et peptid bestående av 41 aminosyrer, avledet fra et preprohormon bestående av 196 aminosyrer. CRH sekreseres fra det paraventriculære nukleus (PVN) i hypothalamus, som en respons på økt stress. CRH syntetiseres også i perifere vev, for eksempel i T-lymfocytter, og uttrykkes i placenta i forbindelse med fødsel. CRH transporteres til hypofysen, hvor det stimulerer til produksjon av blant annet stresshormonene ACTH og beta-endorfin. Utskillelsen av CRH kan dermed påvirke mekanismer som sultfølelse, fryktrespons, og stressreaksjoner.

Det har vært publisert en rekke arbeider som indikerer at CRH kan være assosiert til angst. Et arbeid viste økt konsentrasjon av CRH i hjernen hos selvmordsofre (Arato, Banki, Bissette, & Nemeroff, 1989). Senere er det publisert en rekke artikler som viser korrelasjon mellom CRH-variabler og psykiske lidelser hos mennesker, inkludert angst, depresjon og selvmordstanker hos menneske (Bakshi & Kalin, 2000; Holsboer, 1999; Holsboer & Ising, 2008; Smoller et al., 2005) og angstlignende atferd hos gnagere (Deussing & Wurst, 2005; Merali, Khan, Michaud, Shippy, & Anisman, 2004; Sotnikov et al., 2014; van Gaalen, Stenzel-Poore, Holsboer, & Steckler, 2002). Dette er bakgrunnen for valget av genet som kandidatgen.

Genet er lokalisert på hundens kromosom 29 (CFA29:15.831.944-15.834.384). Den kodende delen av genet består av 1687 basepar fordelt på to exons, og transkriberes til 196 aminosyrer. Hele exon 1, og halve exon 2 er UTR.



Figur 1: Gen CRH. Figuren viser beliggenhet av exon på kromosom 29. Fylte røde bokser viser proteinkodende del, mens åpne røde bokser viser UTR.

RGS2 - Regulator of G-protein signaling 2

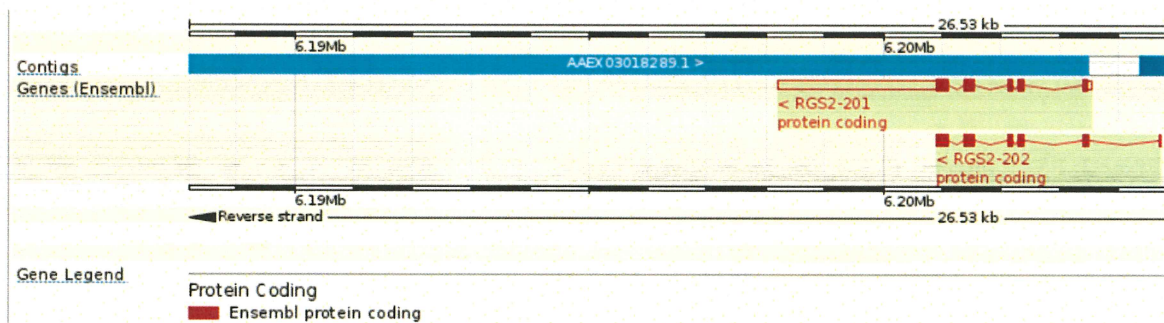
RGS2 er bare ett av mange proteiner i en større gruppe proteiner som regulerer G-proteinkoblede reseptorer. Det medierer blant annet enkelte neurotransmitter-reseptorer, de samme reseptorene som påvirkes av enkelte antidepressiva og antipsykotiske legemidler.

I 1998 ble det vist at RGS2 var involvert i reguleringen av angst og aggresjon hos mus (Ingi et al., 1998; Oliveira-Dos-Santos et al., 2000) og det ble vist at RGS2 regulerer flere sider av G-protein-signalkjeden (Kehrl & Sinnarajah, 2002). Hos menneske er det påvist assosiasjon mellom variasjoner i RGS2 og ulike psykiske lidelser, inkludert selvmord (Amstadter et al., 2009; Cui et al., 2008; Koenen et al., 2009).

I 2004 fant forskere ved hjelp av QLT-kartlegging en recessiv mutasjon på RGS2, som viste at RGS2-genet er med på å modulere angst hos mus. Knock-out av RGS2 på mus resulterte i økt angst, sammenlignet med villtype (Yalcin et al., 2004). Senere er en rekke publikasjoner med på å underbygge dette funnet. Det er vist at RGS2-genet er assosiert med personlighetstrekk og temperament (Smoller et al., 2008), og at RGS2 ekspresjonsgrad er assosiert med angst/depresjon hos mus (Lifschytz et al., 2012). Det har også vært påvist assosiasjon mellom RGS2 og panikkangst hos mennesker, (Leygraf et al., 2006; Mouri et al.,

2010), men et større studie i USA i 2013 kunne ikke verifisere den samme assosiasjonen (Hetteema, Sun, Chen, & Kendler, 2013). RGS2-genets assosiasjon til panikkangst gjør det til et aktuelt kandidatgen for forskning på angst hos mennesker (Hohoff et al., 2015), og potensielt også hos hund.

Genet er lokalisert på kromosom 38 (CFA38: 6.198.192-6.204.715). Den kodende delen av genet består av 3385bp fordelt på 5 exons, som til sammen koder for 196 aminosyrer. Exon 1 består av en del UTR, og starter med en lang N-kjede (sekvensen her er ukjent, og kan ikke leses av). Intron mellom exon 2 og exon 3 er på bare 103 bp. Store deler av exon 5 består av UTR.



Figur 2: Gen RGS2. Figuren viser beliggenhet av exons (fylte røde bokser) på kromosom 38.

PSAP – Prosaposin

PSAP-genet koder for glykoproteinet prosaposin, som er forløper for fire spaltningsprodukter; saposin A-D. Hver del av prosaposinet består av ca 80 aminosyrer. Saposin A-D finnes først og fremst i det lysosomale rommet, der de lette nedbrytningen av glykosfingolipider med korte oligogrupeer. Forløperprotein (PSAP) eksisterer både som et sekretorisk protein og som et integrert membranprotein, og har neurotrofiske egenskaper.

Grad av ekspresjon av blant annet PSAP er vist å korrelere med grad av angstferd hos mus (Hovatta & Barlow, 2008), og panikkangst hos menneske (Donner et al., 2008).

Tidligere undersøkelser ved seksjon for genetik, har vist at det finnes en insersjon / delesjon i intron 1, rett utenfor exonet, og en insersjon /delesjon i intron 8, i tillegg til flere spredte SNP (personlig kommunikasjon, upubliserte resultater).

```

CCTGCAGACTGTGTTGGAACAAGCCGACGGTGGT:::.....:AAGTGCCACTGGTGCCGTCTCCATCTCTTCATATTGGCTGT.
CCTGCAGACTGTGTTGGAACAAGCCGACGGTGGT:::.....:AAGTGCCACTGGTGCCGTCTCCATCTCTTCATATTGGCTGT.
CCTGCAGACTGTGTTGGAACAAGCCGACGGTGGTAAAGTGCCACTGGTGCCAAGTGCCACTGGTGCCGTCTCCATCTCTTCATATTGGCTGT.
CCTGCAGACTGTGTTGGAACAAGCCGACGGTGGT:::.....:AAGTGCCACTGGTGCCGTCTCCATCTCTTCATATTGGCTGT.
CCTGCAGACTGTGTTGGAACAAGCCGACGGTGGTAAAGTGCCACTGGTGCCAAGTGCCACTGGTGCCGTCTCCATCTCTTCATATTGGCTGT.
CCTGCAGACTGTGTTGGAACAAGCCGACGGTGGTAAAGTGCCACTGGTGCCAAGTGCCACTGGTGCCGTCTCCATCTCTTCAT
CCTGCAGACTGTGTTGGAACAAGCCGACGGTGGTAAAGTGCCACTGGTGCCAAGTGCCACTGGTGCCGTCTCCATCTCTTC
CCTGCAGACTGTGTTGGAACAAGCCGACGGTGGT

```

```

|5150| |5160| |5170| |5180| |5190| |5200| |5210| |5220| |5230|
CCTGCAGACTGTGTTGGAACAAGCCGACGGTGGTAAAGTGCCACTGGTGCCAAGTGCCACTGGTGCCGTCTCCATCTCTTCATATTGGCTGT.
+

```

Figur 3: PSAP intron 1 (Ellen Arnet, upubliserte data)

```

:AGAACGTCATCCCTGCTTTGGAACTGGTGGAGCCC:::.....:ATTAAGGTACCTGGTGTCAATCGTGTCTGTG(
:AGAACGTCATCCCTGCTTTGGAACTGGTGGAGCCC:::.....:ATTAAGGTACCTGGTGTCAATCGTGTCTGTG(
:AGAACGTCATCCCTGCTTTGGAACTGGTGGAGCCC:::.....:ATTAAGGTACCTGGTGTCAATCGTGTCTGTG(
:AGAACGTCATCCCTGCTTTGGAACTGGTGGAGCCC:::.....:ATTAAGGTACCTGGTGTCAATCGTGTCTGTG(
:AGAACGTCATCCCTGCTTTGGAACTGGTGGAGCCCATTAAAGGTATTAAGGTACCTGGTGTCAATCGTGTCTGTG(
:AGAACGTCATCCCTGCTTTGGAACTGGTGGAGCCCATTAAAGGTATTAAGGTACCTGGTGTCAATCGTGTCTGTG(
:AGAACGTCATCCCTGCTTTGGAACTGGTGGAGCCCATTAAAGGTATTAAGGTACCTGGTGTCAATCGTGTCTGTG(
:AGAACGTCATCCCTGCTTTGGAACTGGTGGAGCCCATTAAAG:::.....:
:AGAACGTCATCCCTGCTTTGGAACTGGTGGAGCC
:AGAACGTCATCCCTGCTTTGGAACTGGTGGAGC
:AGAACGTCATCCCTGCTTTGGAACTGGTGGAGC
:AGAACGTCATCCCTGCTTTGGAACTGGTGGAGC
:AGAACGTCATCCCTGCTTTGGAACTGGTGGAGC
:AGAACGTCATCCCTGCTTTGGAACTGGTGGAG
:AGAACGTCATCCCTGCTTTGGAACTGGTGGAG

```

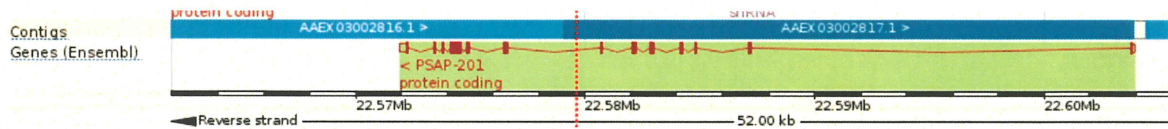
```

|12170| |12180| |12190| |12200| |12210| |12220| |12230| |12240|
:AGAACGTCATCCCTGCTTTGGAACTGGTGGAGCCCATTAAAG:::ATTAAGGTACCTGGTGTCAATCGTGTCTGTG(
.....
exon 8 exon 8

```

Figur 4: PSAP intron/exon 8 (Ellen Arnet, upubliserte data)

Genet er plassert på kromosom 4 (CRF4: 22.571.938-22.603.939), består av 14 exons. Den kodende delen av genet består av 2010 basepar og koder for totalt 526 aminosyrer.

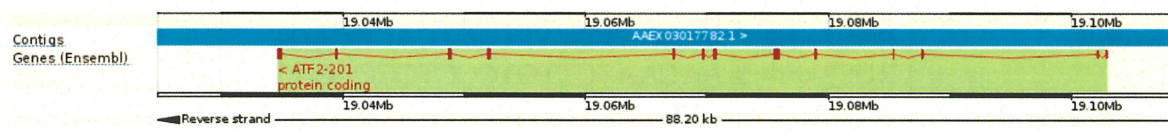


Figur 5: Gen PSAP. Figuren viser beliggenhet av exons (fylte røde bokser) på kromosom 4.

ATF2 – Activating transkripsjon factor 2

Neonatal Encephalopathy (with seizures) ble beskrevet første gang i 2007, som en autosomal recessiv lidelse hos storpuddel (Chen et al., 2008). Det er en T>G mutasjon, som fører til en metionin til arginin-mutasjon (missense) i aminosyrerekkefølgen. Affiserte valper er svakfødte, og dør i løpet av de første leveukene. Ingen valper overlever til 7 ukers alder. Lidelsen er også beskrevet hos blandingsraser av storpuddel (labradoodle og andre).

Genet er plassert på kromosom 36 (CRF36: 19.034.714-19.102.910), og består av 14 exons. Mutasjonen som fører til NE er lokalisert på exon 5.



Figur 6: Gen ATF2. Figuren viser beliggenhet av exons (fylte røde bokser) på kromosom 36.

5 [ENSCAFE00000146034](#) 19,079,003 19,078,907 0 1 97 [CGTTTACCAACGAGGATCAITGGCTGCCATAAACATAAACATGAGATGACACTGAAA](#)
[TTTGGTCCAGCACGTAATGACAGTGTCAITGTGGCTG](#)

Figuren 7: ATF2 Exon 5

Primere

Valg av primere er gjort ved hjelp av Primer3Plus.

CRH

Tabell 1 – Primere brukt for å amplifisere CRH-genet

Exon 1 Del 1	CRH2_ex1-1_F CTGAGGTGTTGCCAGAGACA CRH2_ex1-1_R CGGACTTGGGCTCTGAGTTT
Exon 1 Del 2	CRH2_ex1-2_F TCGTTGACGTCACCAAGGAG CRH2_ex1-2_R TGAGGCACAGTCAGCAAACA
Exon 2 Del 1 *	CHR2-exon2-1_F TGAGCTGAACTCTGACCAACTC CHR2-exon2-1_R ACGCACCGTTTTATTTCCCA CRH_ex2_1_NY_F CTGGTTCGAGAGCTTCAGCA CRH_ex2_1_NY_R AACGCGCGGAAAAAGTTGG
Exon 2 Del 2	CRH_ex2_2_NY_F GATTTCTTCCAGCTGCCGC CRH_ex2_2_NY_R TGGATACTTTGTGCATGCT
Exon 2 Del 3	CRH_ex2_3_NY_F GGTGCGTTTGGCCAAAAGA CRH_ex2_3_NY_R TCTGTGTAAGCCACTTGCAT

* Ingen bånd på gel

RGS2:

Tabell 2 – Primere brukt for å amplifisere RGS2-genet

Exon 1 Del 1 *	RGS2-ex1-1_F CAACCAAGGATTTCCGGAGAA RGS2-ex1-1_R TCCTCATCCTCCTCATCACC
Exon 1 Del 2	RGS2-ex1-2_F GCTGGGACTTCTCTGTCCTG RGS2-ex1-2_R GAGCTGTTGCTCGAGCTCTT
Exon 2 og 3 (lite intron i mellom)	RGS2-ex2o3_F TGTTGCTACTGGGTGGCTTT RGS2-ex2o3_R CTGCCCCTACAATTTGGGCT
Exon 4	RGS2-ex4_F AGGCATTAATTGGTCACCCAGT RGS2-ex4_R AACCAATCTTGTCCCTCCCC
Exon 5 Del 1	RGS2-ex5-1_F TTGCTGCTTGTTCACACGA RGS2-ex5-1_R CCAGCTAGCTAAGGCCACAT
Exon 5 Del 2	RGS2-5-2NY_F AGGTGGTCCAAATGTGGTGT RGS2-5-2NY_R CCCCATGTCTGAACCGAAT
Exon 5 Del 3	RGS2-5-3NY_F TCCCTAATTCAGTCCATTACCACA RGS2-5-3NY_R TCTGATCCCAGGGTGGTTCT
Exon 5 Del 4	RGS2-5-4NY_F GTACACCAGGTGATGTGCCT RGS2-5-4NY_R GCCAGAGGAAGCAGGAGAAT
Exon 5 Del 5	RGS2-ex5-5_F AGCCTTCATCTCAGATTTGCA RGS2-ex5-5_R CGGGGTGGCTACAGAAAGTA
Exon 5 Del 6	RGS2-ex5-6_F TCTGAAGGGTTATTGAAAGAGACA

	RGS2-ex5-6_R CCTGGGGAAGTGACAATTGC
Exon 5 Del 7	RGS2-ex5-7_F GCATGGCTTGACTCCTCCTT RGS2-ex5-7_R TGGGCCTTTTAAAACCTTGTACT

* Ingen bånd på gel

PSAP:

Tabell 3: Primere PSAP*

Exon 1 (2)**	PSAPE1_F AGTGGTGCTGTGGTTTGTGT PSAPE1_R GAGAAGCAAACGAAGCAAGG
Exon 2 (3)	PSAPE2_F AGATAGGACAGAGGCCAAGG PSAPE2_R CACAGAGCGATCTCTGAAGG
Exon 3 (4)	PSAPE3_F TTCCCTGAGGCTGCTGTC PSAPE3_R CAAAGCCATCTCAGAGGTCAG
Exon 4 (5)	PSAPE4_F TTTGAGATGCCTGTGAGTCG PSAPE4_R ACACACACTATGCCCTCTC
Exon 5 (6)**	PSAPE5_F TTGGGAAATTGAAGCCTCTG PSAPE5_R CAAAGCCCTGAGATTGGAAC
Exon 6 (7)	PSAPE6_F GGGACCTTTTGGGACATTTT PSAPE6_R TGGTCAGAAGGGTTCATTTTG
Exon 7**	PSAPE7_F GACTGCAAGTTTTCCCCTGA PSAPE7_R AGAGGGGAGAAAGGCAGAAG
Exon 8	PSAPE8_F CGACCTTTGTGTGTGGAGAG PSAPE8_R GCATGTGCCTCATAACAGCAT
Exon 9**	PSAPE9_F GGCCACAGGGTATCCCTTC PSAPE9_R ATGTCCCATGAAGGCAAGG
Exon 10**	PSAPE10_F TTTCTGGGGAGGAAGTAGCA PSAPE10_R GCACACAGGAGCACAGACTC
Exon 11**	PSAPE11_F GCTCCATCTGTGCTCCTCTC PSAPE11_R TCCCTGGAAACCTCAATCAG
Exon 12**	PSAPE12_F CAGTGGCCGGAATTCTTATG PSAPE12_R CCAGAGACTGCCAGAACCTC
Exon 13	PSAPE13_F TTGGAAGTGGCATGTCAGAG PSAPE13_R CTCCTCCTCACGCAGGAT
Exon 14	PSAPE14_F TTGCCATAGGAGTCCCTGAC PSAPE14_R CAGCGATGCTACAATCGAGA
Exon 15	PSAPE15_F GACCCCCATTTTCGTTTGAC PSAPE15_R GAACCACTCAGGCTCAGGTC

* Annoteringen av genet har endret seg noe siden første publikasjon av genomet. Genet har nå 14 exons.

** Ingen bånd på gel

NE / ATF2:

Tabell 4: Primere NE (ATF2)

Exon 5	NE_ATF2_e5F TGGTGGTTTTACATGTTGTGGA NE_ATF2_e5R TGTGCACATTCCAGGTGAAA
--------	--

Prosedyrer

Fortynning av primere 5%

- 1) Eppendorfrør, merkes i lokket.
- 2) 5ul primer fra originalt rør (200pmol/ul)
- 3) 195ul sterilt vann
- 4) Vortex / sentrifuge
- 5) Fryses til senere.

DNA-isolering (kokemetode)

1. Tin 1ml PCR-buffer og tilsett 10ul Proteinase-K. La stå.
2. 100ul EDTA-blod i eppendorfrør.
3. Tilsett 1ml lysisbuffer
4. Vortex
5. Sentrifuge 13000 opm i 1min.
6. Hell av supernatanten
7. Gjenta pkt 2-5 én gang til.
8. Tilsett 1ml TE (??)
9. Sentrifuge 13000 opm i 2min.
10. Hell av supernatanten
11. Resuspender pelletten i 100ml PCR-buffer m/ProtK.
12. Termomixer med risting 56grader i 2 timer
13. Innaktiver proteinase K ved 95grader i 10 minutter.

DNA-isolering fra svaber

Svabere fra Performagene TM fra PG-100 collection kit.

1. Vortex prøven noen sekunder
2. Inkuberes i termomixer på 50 grader celsius i minst en time.
3. Lokket fjernes, bomullssvaberen presses mot glasset for å ekstrahere så mye av prøven som mulig.

4. Svaberen kastes
5. 500 µL av prøven overføres til Eppendorfrør.
6. 20 µL PG-L2P purifier tilsettes prøven. Vortex.
7. Prøven inkuberes på is i 10 minutter.
8. Sentrifugeres på 15000 x g i 5 minutter
9. Supernatant overføres forsiktig til nytt Eppendorfrør. Pelletten og det gamle røret kastes.
10. 25 µL 5 M NaCl-løsning tilsettes prøven
11. 600 µL romtemperert 100% etanol tilsettes prøven
12. Prøven vendes forsiktig 10 ganger
13. Inkuberes i romtemperatur i 10 minutter
14. Røret plasseres i sentrifuge med kjent retning, og sentrifugeres i 2 minutter på 15000 x g
15. Supernatanten fjernes forsiktig med en pipette, uten å forstyrre DNA-pelleten.
16. DNA vaskes ved å tilsette 250 µL 70% etanol
17. Etanolen fjernes etter 1 minutt
18. Røret sentrifugeres raskt for å samle eventuell gjenværende etanol slik at denne kan fjernes.
19. DNA-pelleten resuspenderes i 100 µL TE-buffer, deretter vortexes prøven.
20. Prøven inkuberes i romtemperatur over natten.

Alle DNA-prøver lagres ved -20 celsius.

PCR

Gjøres på is.

PCR-brett med 1ul DNA i brønnen(e)

Tilsett 14ul PCR-mix:

- 1) Destillert vann 10,65 ul
- 2) 10x PCR-buffer 1,5 ul
- 3) dNTP-mix (2,5mM) 0,5 ul
- 4) F-primer (5pmol/ul = 1/20 løsning) 0,5 ul
- 5) R-primer (5pmol/ul = 1/20 løsning) 0,5 ul
- 6) Taq DNA polymerase 0,05 ul
- 7) Q-løsning 0,3 ul

Sentrifugeres kort.

Sekvensering BigDye

- 1) 5xBigDye buffer 2 ul
- 2) BigDye terminator mix 1,5 ul
- 3) F- eller R-primer 0,32 ul
- 4) Destillert vann 5,2 ul

PCR-produkt 1 ul

BigDye sekvensprogram:

95°C	1min	
96°C	15sek	\
50°C	10sek	29x
60°C	2min	/
4 grader	∞	

Felling:

- Spinn ned etter sekvensreaksjon
- Pipetter over i en mikrotitrer plate for ABI 3100
- Tilsett 1µl 7,5M Ammoniumacetat pr brønn
- Tilsett 30 µl 96% etanol til hver brønn
(NB Absolutt EtOH absorberer vann fra lufta, vær sikker på at sluttkonsentrasjon i prøvene er 67-71% for å få en god felling).
- Mix ved pipettering
- Inkuber 15 min ved romtemperatur
- Spinn ved 4000 rpm i 30 min
- Vend platen og rist ut EtOH raskt en gang, sett brettet opp ned på et stykke absorberende papir og sentrifuger ved 350 rpm i 1 min, med det samme!
- Tilsett 60 µl 70 % ethanol til hver prøve
- Sentrifuger ved 4000 rpm i 10 min.
- Vend platen og ryst ut EtOH raskt en gang, sett brettet opp ned på et stykke absorberende papir og sentrifuger ved 350 rpm i 1 min, med det samme!
- Resuspender i 10-15 µl sterilt dH₂O. Bland ved pipettering. Spinn ned.

Mikrosatellitter

DNA ekstrahert fra 29 blod- og svaberprøver.

PCR oppsett, 19 mikrosatellitter ble amplifisert. Hvert primerpar består av en umerket

primer samt en fluorescein-merket primer, slik at PCR-produktet kan detekteres på en

kapillær-elektroforesmaskin.

1,5ul DNA + 20ul PCR mix i hver brønn i PCR brett.

PCR Betingelser: 95°C 3min. –

30 sykler: 95°C 30 sek. – 60°C 40 sek. – 72°C 50 sek.

72°C 4 min.

Fragmentanalyse på Applied Biosystem, 3500XL Genetic analyser. :

2,5ul av PCR produktet blandet med 9ul mix av formamid og LIZ standard.

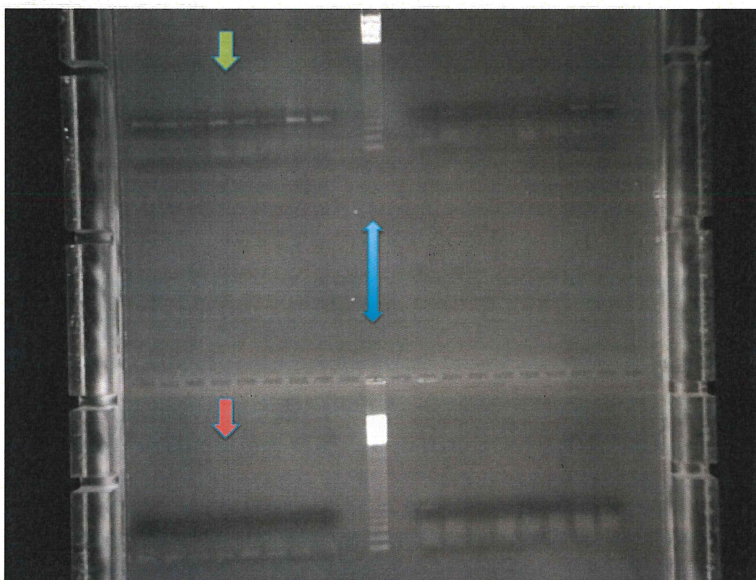
Resultatene analysert i programmet GeneMapper Versjon 5.0 .

Genetiske analyser av gener med mulig assosiasjon til angst

CRH

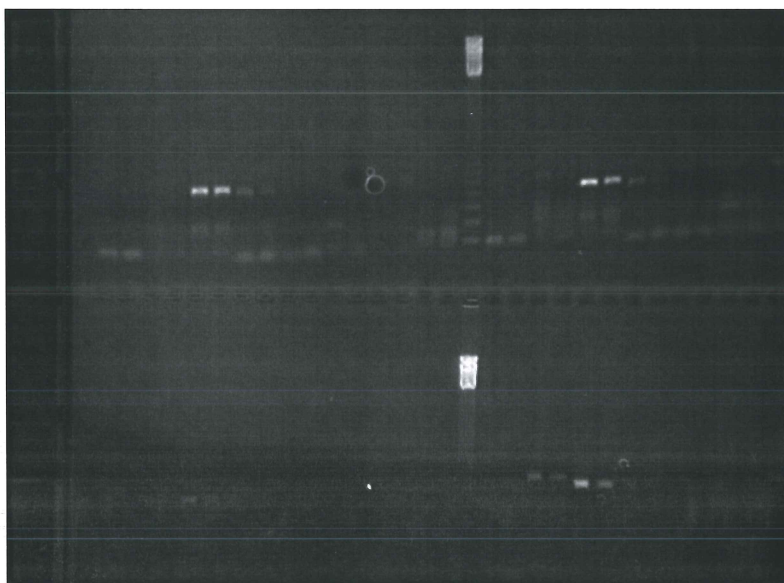
Først testet vi alle fire primerpar, med fire ulike DNA-prøver. DNA-prøvene ble på forhånd testet med standardprimere, og ga gode bånd med dem.

Det første primersettet ga gode bånd på exon 1, men svake / ingen bånd på exon 2. Det ble forsøkt sekvensering av alle primerne.



Figur 8: 8 brønner per exon, CRH1-1, 1-2, 2-1, 2-2. Eksempel på gode bånd på de to øverste (grønn pil), og manglende bånd på de to nederste (rød pil). Den blå pila peker på en standardgradient.

Sekvensering på exon 2 ga ingen resultater, da ble det bestilt nye primere for exon 2. Deretter ble det forsøkt å kjøre en temperaturtest med både nye og gamle primere, og kryssing av primere fra første og andre primersett, for å forsøke å få ut gode bånd på exon 2. Ved temperaturgradient blir samme prøve kjørt på ulike temperaturer for å finne optimal temperatur.



Figur 9: CRH Temperaturtest, eksempel på temperaturgradient. De samme to DNA-prøvene er kjørt på 6 ulike temperaturer for å finne optimal PCR-temperatur. Her 54, 56, 58, 60, 62 og 64 grader.

Gode bånd finnes på exon 1, og siste halvdel av exon 2, men ikke på kodende (første) del av exon 2. Alle er forsøkt sekvensert.

RGS2

Først ble alle 11 primerparene testet, med 3 ulike DNA-prøver. DNA-prøvene ble testet på forhånd med standardprimer og ga gode bånd med dem.

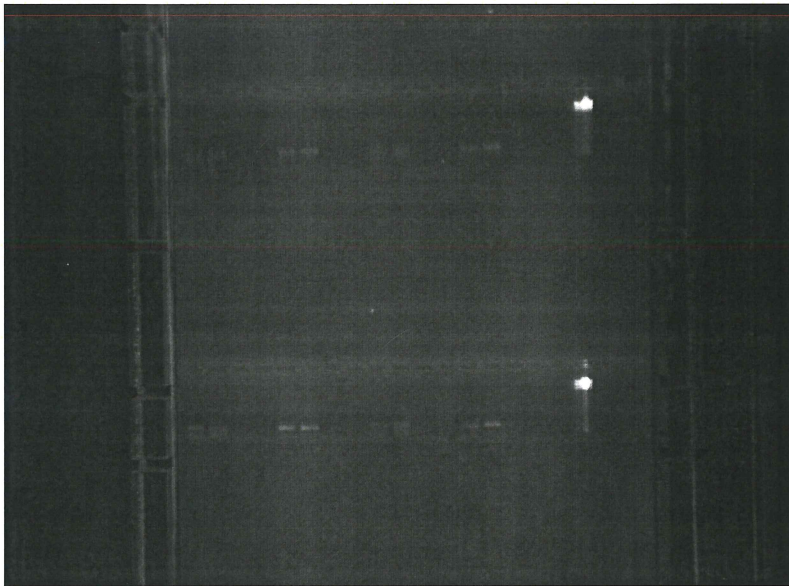
Det ble gode bånd på exon 2, 3, 4 og kodende (første) del av exon 5, og hele intron mellom exon 2 og 3. Også siste halvdel av exon 5 har gode bånd. Det ble bestilt nye primere på exon 1, men disse ga ikke bånd på gel.

PSAP

Først ble alle 11 primerpar testet med 4 ulike DNA-prøver. DNA-prøvene ble testet på forhånd med standardprimer og ga gode bånd med dem.

Det ble gode bånd på exon 2, 3, 4, 6, 13, 14 og 15, og svake bånd på exon 7.

Primere til exon 1 og 8 ble fortynnet på nytt, og det ble satt opp en temperaturtest for å finne optimal temperatur, fra 52C til 62C.



Figur 10: Exon 1 og 8, temperaturtest, med ny fortynning av primer og gammel fortynning av primer. Det er ses gode bånd på alle temperaturer med ny primerfortynning, og ingen bånd på de gamle fortynningene.

De øvrige primerne, exon 1, 5, 7, 9, 10, 11 og 12, på PSAP amplifiserte ikke.

NE / ATF2

For ATF2 er det bare ett primerpar, som ble testet med 4 ulike DNA-prøver. DNA-prøvene ble testet på forhånd med standardprimer og ga gode bånd med dem. Det ble gode bånd på gel for ATF2-primerne.

Resultater

Helseundersøkelse

Det er tatt utgangspunkt i tallene som forelå 18.februar 2015.

Undersøkelsen omfatter 402 storpudler, hvorav 45% hannhunder og 55% tisper.

Totalt 23% av hundene er kastret. 22% av tispene og 25% av hannene er kastret.

22% av de kastrerte hundene er kastret på grunn av uønsket atferd. Atferd er årsak til kastrasjon for 4% av de kastrerte tispene og 41% av de kastrerte hannene.

I den delen av undersøkelsen som omhandler lydangst oppgir 19% av eierne at hunden viser sterk eller meget sterk frykt for fyrverkeri. 14% oppgir at hunden viser sterk eller meget sterk frykt for skudd.

83% av hundene som defineres med meget sterk frykt for fyrverkeri viser også sterk eller meget sterk frykt for skudd.

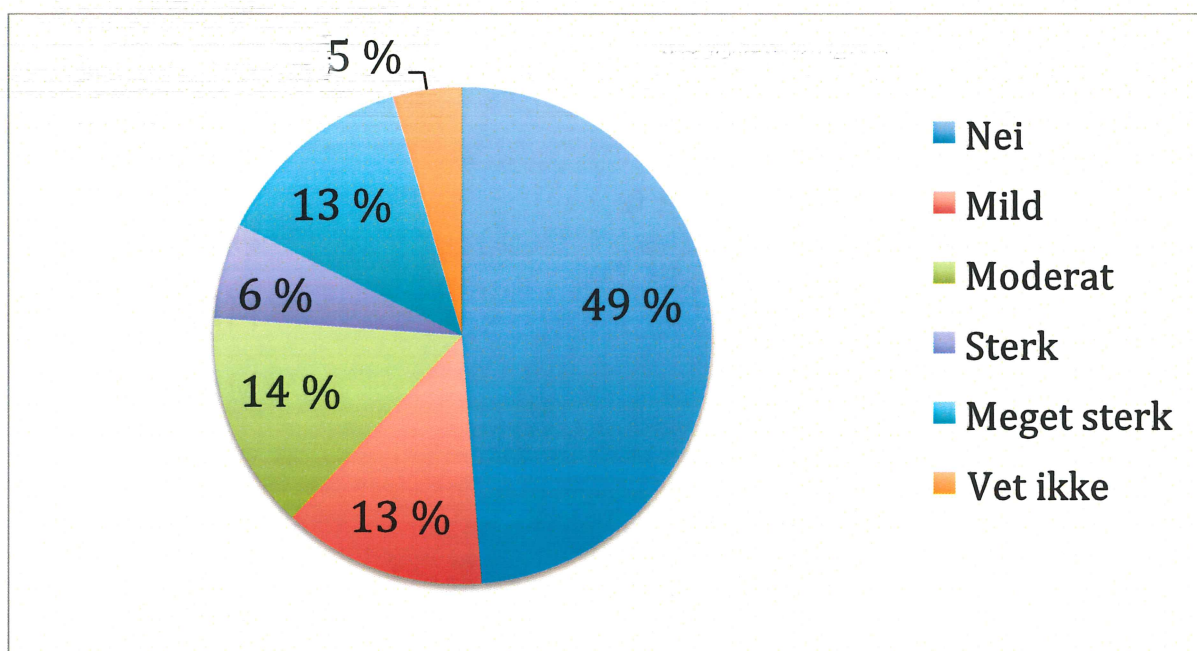
48% av hundene som defineres med meget sterk frykt for fyrverkeri viser også sterk eller meget sterk frykt for skudd.

3,8 % av hundene defineres med meget sterk eller sterk frykt for fyrverkeri viser ingen frykt for skudd.

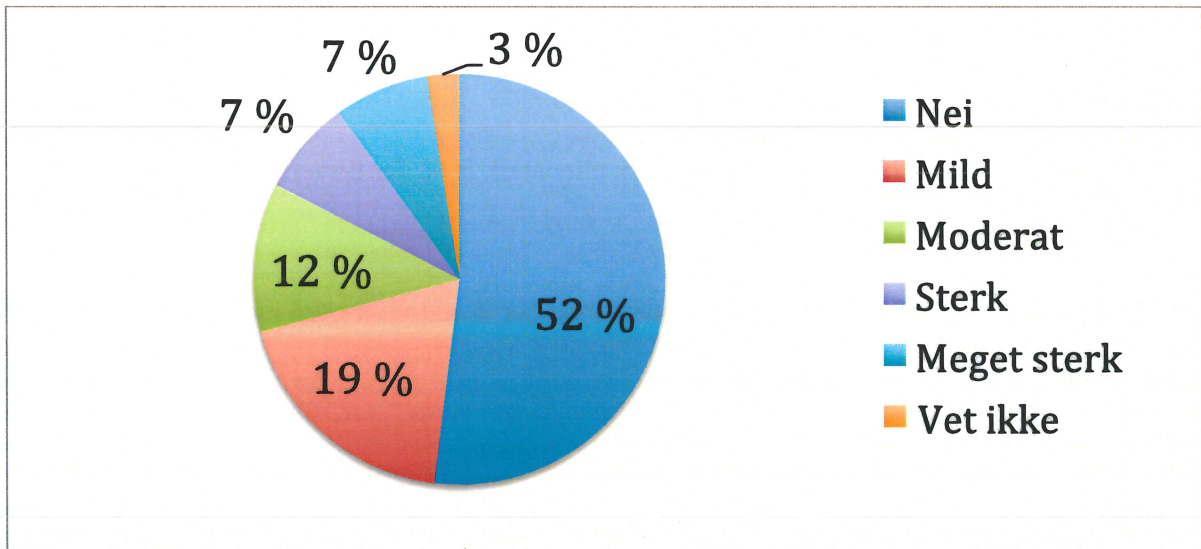
100% av hundene defineres med meget sterk frykt for skudd viser også meget sterk frykt for fyrverkeri.

90% av hundene defineres med sterk frykt for skudd viser også meget sterk eller sterk frykt for fyrverkeri.

1,7% av hundene defineres med meget sterk eller sterk frykt for skudd viser ingen frykt for fyrverkeri.

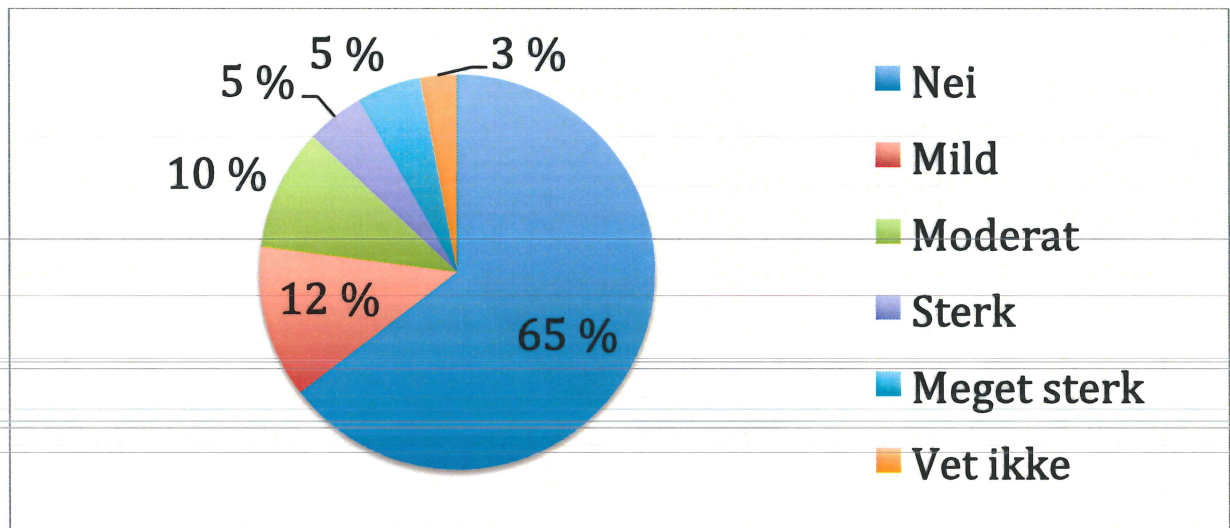


Figur 11: Er hunden redd for fyrverkeri?

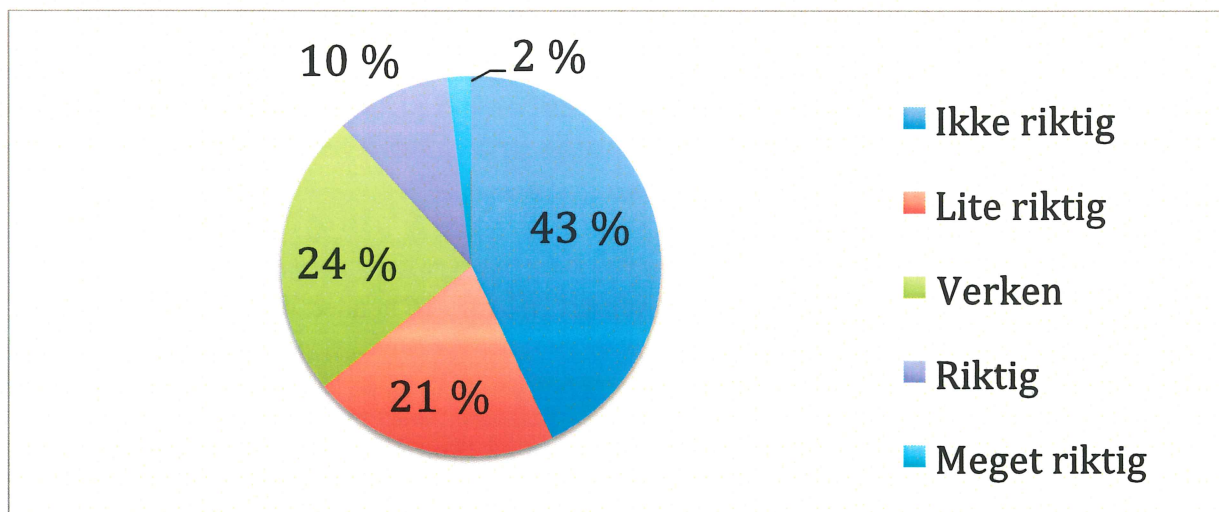


Figur 12: Er hunden redd for skudd?

10% av eierene oppgir at hunden er sterkt eller meget sterkt berørt av torden. Samtidig beskriver 12% at hunden oppleves som pysete/pinglete. På motsatt side oppleves 64% som lite pysete/pinglete.



Figur 13: Er hunden redd for torden?



Figur 14: Er hunden pysete/pinglete?

Blant de øvrige resultatene fra den delen av helseundersøkelsen som omhandler lydberørthet finner vi disse tallene:

0,5% av hundene viser meget sterk eller sterk frykt for trafikkstøy. 78,4% viser ingen frykt for trafikkstøy.

2% av hundene viser meget sterk eller sterk frykt for hjemmestøy. 70,9% viser ingen frykt for hjemmestøy (støvsuger m.m).

59% av hundene bjeffer ofte eller meget ofte når det ringer på. 15,9% bjeffer aldri når det ringer på.

97,8% av hundeeierne svarer riktig eller meget riktig på påstanden om at hunden kan oppfattes som glad.

Sekvensering

CRH

Exon 1 lar seg sekvensere godt. Det er sekvensert DNA fra 16 hunder, uten å finne variasjon.

Sekvensen er lik referansesekvensen.

Det ble det satt opp sekvensering av 16 DNA-prøver på exon 2. Det ble noen sekvenser som kan tolkes, og dobbel sekvens på de øvrige. CRH 2-3 sekvenseres godt, og dekker en del av CRH 2-2.

Tabell 5: Sekvensering CRH

Exon	Hunder	Sekvenskvalitet	Variasjon
CRH 1-1*	16 (29-36 + 1-8)	Variabel kvalitet, 12F, 11R	Ingen variasjon
CRH 1-2	16 (29-36 + 1-8)	Ok kvalitet, 11F, 13R	Ingen variasjon
CRH 2-1	32 (29-36 + 1-24)	Dårlig kvalitet. 7F, 3R	Ingen variasjon
CRH 2-2	32 (29-36 + 1-24)	Dårlig kvalitet. 6F, 12R	Ingen variasjon
CRH 2-3	16 (29-36 + 1-8)	Ok kvalitet, 13F, 14R	Ingen variasjon

* CRH 1-1/1-2 betyr første eller andre del av exon1, tilsvarende fra de andre exons

RGS2

Gode bånd på exon 2, 3, 4 og første del av 5 (resten av 5 er UTR). Det ble ikke bånd på exon 1 på gel, men gjort forsøk på sekvensering. Første halvdel av exon 1 består av ukjent sekvens, og primerene er laget over dette N-området.

Tabell 6: Sekvensering RGS2

Exon	Hunder	Sekvenskvalitet	Variasjon
RGS2 1-1*	16 (29-36 + 1-8)	Ikke lesbare	Ikke mulig å vurdere
RGS2 1-2	16 (29-36 + 1-8)	Ingen forward sekvens. Dårlig kvalitet 8R	Ikke mulig å vurdere
RGS2 2 og 3	24 (29-36 + 1-16)	God kvalitet, 24F, 24R	Ingen SNP
RGS2 4	24 (29-36 + 1-16)	God kvalitet, 23F, 24R	Ingen SNP
RGS2 5-1	24 (29-36 + 1-16)	Ok kvalitet, 23F, 22R	Ingen SNP
RGS2 5-2	Ikke sekvensert		
RGS2 5-3	Ikke sekvensert		
RGS2 5-4	Ikke sekvensert		
RGS2 5-5	16 (29-36 + 1-8)	Ok kvalitet, 11F, 12R	Ingen SNP
RGS2 5-6	16 (29-36 + 1-8)	Ok kvalitet, 12F, 12R	Ingen SNP
RGS2 5-7	16 (29-36 + 1-8)	Dårlig kvalitet, 3F, 9R	Ikke mulig å vurdere

*RGS2 1-1/1-2 betyr første eller andre del av exon 1, tilsvarende fra de andre exons

PSAP

Gode bånd på exon 1, 2, 3, 4, 6, 8, 13, 14 og 15. Svake bånd på exon 7.

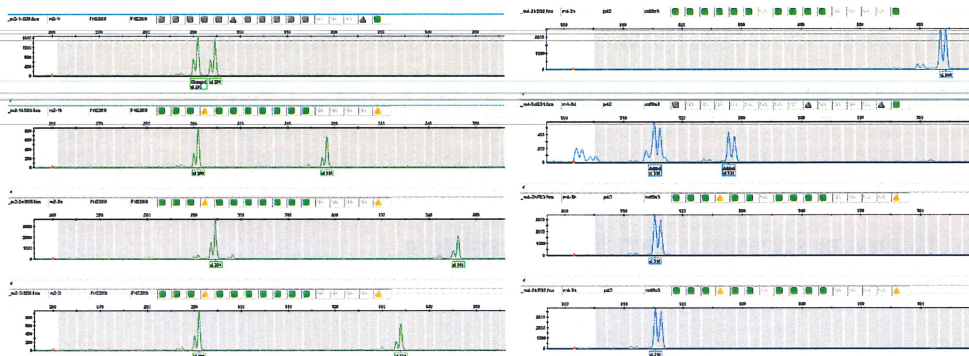
Det er sekvensert 16 DNA-prøver på alle exon som har gitt bånd på gel. Det er ikke funnet variasjon i noen av disse exonene. På exon 1 og 8 er det funnet variasjon hos andre raser, og her ble ytterligere 16 hunder sekvensert uten å finne variasjon.

Tabell 7: Sekvensering PSAP

Exon	Hunder	Sekvenser	Variasjon
PSAP 1	32 (1-16 + 31-47)	God kvalitet, 29F, 26R	Ingen insersjon / SNP
PSAP 2	16 (5-11 + 39-47)	Ok kvalitet, 11F, 13R	Ingen SNP
PSAP 3	16 (5-11 + 39-47)	God kvalitet, 13F, 14R	Ingen SNP
PSAP 4	16 (5-11 + 39-47)	Ok kvalitet, 9F, 15R	Ingen SNP
PSAP 6	16 (5-11 + 39-47)	Ok kvalitet, 11F, 13R	Ingen SNP
PSAP 7	16 (5-11 + 39-47)	Dårlig kvalitet, 6F, 11R	Ikke mulig å vurdere
PSAP 8	32 (1-16 + 31-47)	God kvalitet, 30F, 26R	Ingen insersjon / SNP
PSAP 13	16 (5-11 + 39-47)	Dårlig kvalitet, 10F, 14R	Ikke mulig å vurdere
PSAP 14	16 (5-11 + 39-47)	God kvalitet, 13F, 13R	Ingen SNP
PSAP 15	16 (5-11 + 39-47)	Ok kvalitet, 12F, 16R	Ingen SNP

Genetisk variasjon

Et tilfeldig utvalg av 14 caser og 15 kontroller ble testet for genetisk variasjon over 19 markører, med et standardsett med mikrosattelitt-primere, som ble detektert på en kapillærelektroforesemaskin.



Figur 15: Typing av mikrosatellitter på kapillærelektroforesemaskin

Figurene viser typing av to mikrosatellitter, FH2289 og COL9a3, på hver av fire hunder (en linje er en hund). Bildet til venstre (FH2289) viser at alle 4 hunder har to topper (heterozygote) og at mange av toppene ligger på ulike steder (=genetisk variasjon). Bildet til høyre (COL9a3) viser at den øverste og de to nederste hundene er homozygote (bare en topp) mens hund nummer to er heterozygot.

Homozygoti er gitt verdi 0 og heterozygoti er gitt verdi 1 for hver markør fra hver hund, og det er beregnet et gjennomsnitt av disse for hver markør. Disse tallene varierer fra 0,259 (c22.279, lavest) til 0,88 (FH2001, høyest).

Antall alleler varierer fra 2 (FH 2772) til 11 (Cra-FH3810 og FH2289). Den gjennomsnittlige beregnede heterozygositeten over alle markører og alle prøvene var 0,64.

Tabell 8: Oversikt over mikrosatellitter som ble brukt i undersøkelsen av genetisk variasjon

Primer	Antall alleler	Heterozygoti	Primer	Antall alleler	Heterozygoti
Aht171	9	0,7931	Inra21	5	0,69
Aht211	4	0,259	Pez08	4	0,0556
C22.279	5	0,7241	Pez12	8	0,84
FH2001	4	0,88	FH3325	8	0,708
FH2054	3	0,571	Cfi-ttta10	7	0,536
FhH247	9	0,679	Col9a3	6	0,3793
FH2289	11	0,857	Cfa5-61tttc21	5	0,586
FH2293	7	0,75	Rdh5 taga 10	6	0,483
FH2328	5	0,741	Cra-fh3810	11	0,852
FH2772	2	0,3793			

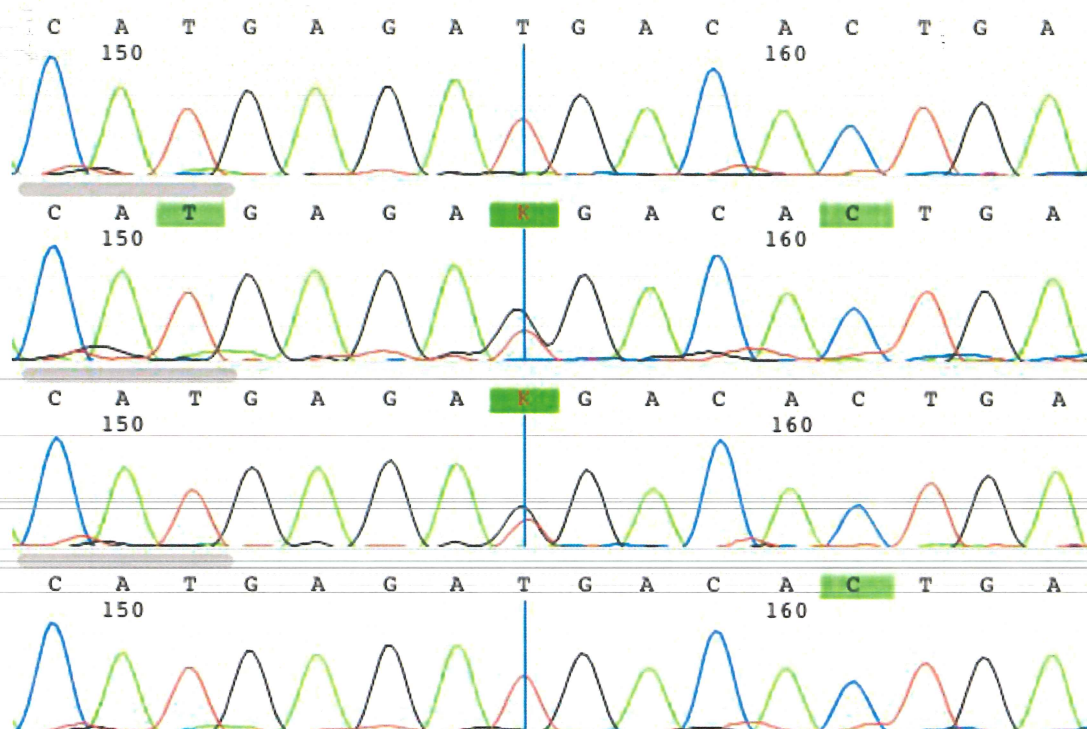
NE / ATF2

Alle de 58 DNA-prøvene som ble samlet inn i forbindelse med prosjektoppgaven, i tillegg til 12 som ikke oppfylte inklusjonskriteriene for assosiasjonsanalysen (totalt 70), er sekvensert på ATF2.

Tabell 9: Sekvensering NE

Exon	Hunder	Sekvenser	Variasjon
NE_e5	70	Gode. 70F, 70R	SNP G>T

Sekvensering viser variasjon på den posisjonen som var forventet. 8 av de 70 hundene er heterozygote, og bærere av mutasjonen som gir NE (se eksempel i figur 16).



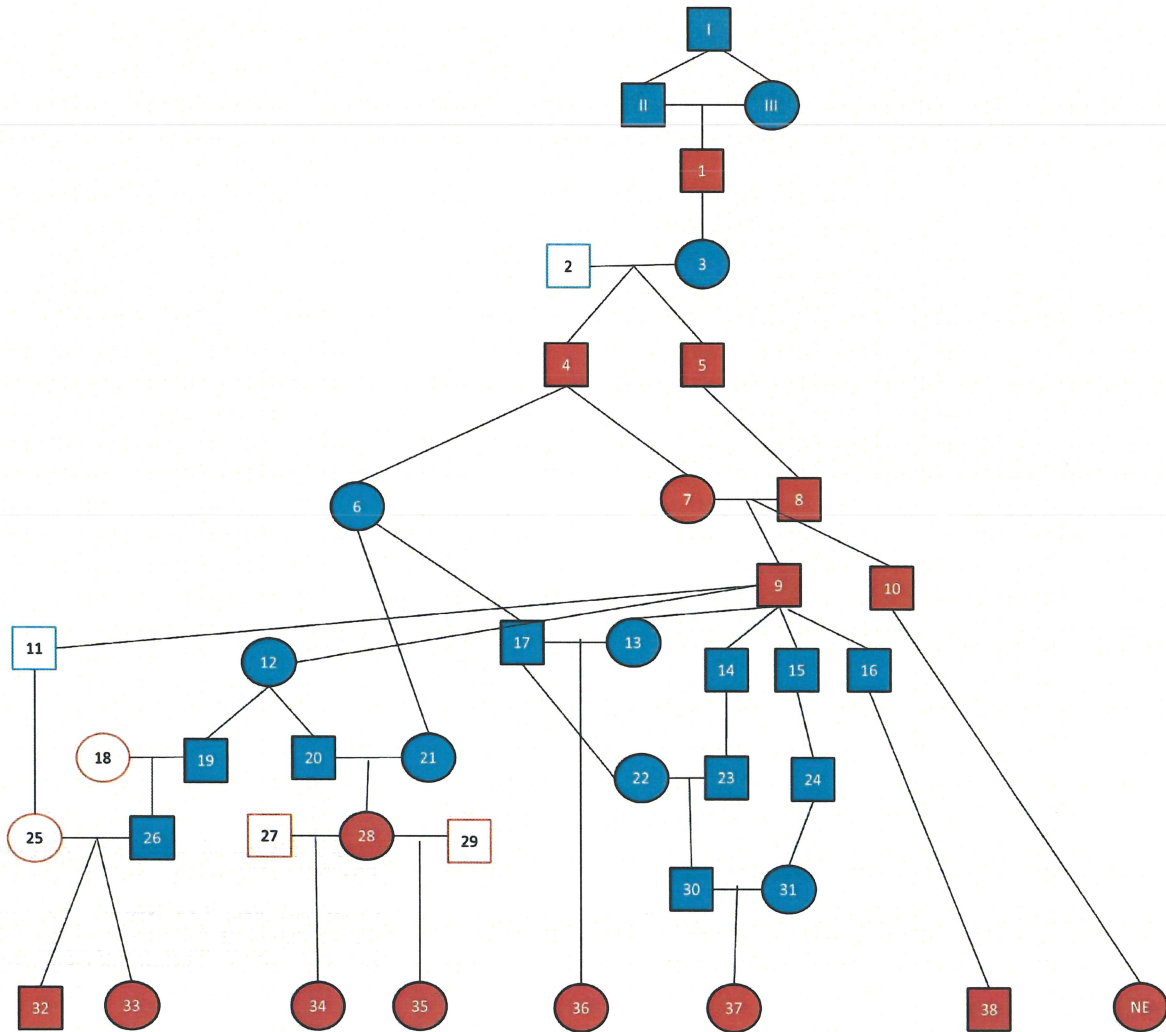
Figur 16: SNP på ATF2 Exon 5

Dette betyr at NE-mutasjon har en allelfrekvens på ca 6%. Dersom den norske puddelpopulasjonen er i genetisk balanse, kan en ved hjelp av Hardy-Weinbergs lov forvente en forekomst av NE på ca 0,3%.

Ved å se nærmere på slektningene til de 8 hundene som er testet bærere kan disse ved enkel stamtavleundersøkelse snevres ned til 3 ulike stamhunder, fordi flere av de testede hundene har en forelder som er kjent ikke-bærer. En hund har også far som er kjent bærer.

Studie av stamtavler, NE

Ved hjelp av informasjon tilgjengelig Poodle Health Registry Database, Orthopedic Foundation for Animals, og øvrige offentlig kjente bærere, i tillegg til egne funn, er det satt opp en stamtavle som viser hvordan mutasjonen for NE kan være nedarvet i puddelpopulasjonen.



Figur 17: Genkart for mutasjon på ATF2. Morslinjer er tatt ut flere steder av plasshensyn, på grunn av store antall avkom etter samme far med ulike mor. Tette røde og blå er kjente og sannsynlige bærere. Hvite er kjente og sannsynlige fri.

PHR har registrert 140 bærere av NE-genet, og inkluderer hunder både fra USA og Europa. I tillegg er 8 bærere funnet i forbindelse med prosjektoppgaven. Ved å granske stamtavlene til disse totalt 148, deres forfedre, og søsken, avkom og øvrige slektninger av forfedre, er dessuten en rekke andre hunder funnet å være bærere, etter å ha produsert bærer-avkom med fritestet partner.

For omtrent 65% (97) av de 148 hundene finnes den samme hunden (Lake Cove That's my Boy - 9) i direkte linje bakover etter 3, 4 eller 5 generasjoner. Ved å ta med ytterligere to generasjoner (Trelarken's Turn Back Time -8 , og helbrødre Whisperwind On a Carousel – 5 og Whisperwind Brass Brand - 4) møtes enda ca 20% (30) av stamtavlene. Granskning av stamtavlene til de aktuelle hundenes øvrige slektninger viser ingen sannsynlig kobling til NE-genet, og der det er doblet på linjene fører disse tilbake til det samme brødreparet (8 og 5). For de øvrige ca 15% (21) må stamtavlene tilbake ytterligere 2 ledd før en felles stamfar (Pinafore President - 1) finnes. Samtlige av de 148 hundene er sporbare til denne ene hunden.

Det er samtidig studert i overkant av 400 stamtavler fra hunder med ukjent bærerstatus, eller kjent ikke-bærerstatus. Det er mange ikke-bærere som også har Pinafore President bak på stamtavla si, men det er også mange kjente ikke-bærere hvor denne hunden ikke finnes igjen.

Occam's razor-prinsipp (Hawking, 1988; Newton, 1687; Thorburn, 1915), tar utgangspunkt i at der det finnes flere ulike mulige årsaker til en hendelse, er det størst sannsynlighet for at den enkleste løsningen er den rette. Fordi Pinafore President er den første hunden som er å finne som felles stamfar i direkte linje bak på stamtavlene til samtlige NE-bærere, er det sannsynlig at han var bærer av NE. Dette styrkes av at det ikke er funnet andre fellesnevne for alle de aktuelle hundene.

Stamtavlegranskningen viser for øvrig sterk grad av linjeavl (innavl) på storpuddel, spesielt i tidsrommet 1959-1985, både på linjer der NE opptrer, og i linjer der det ikke gjør det. Nesten alle hundene (>95% av et tilfeldig utvalg på 600 stamtavler), uavhengig av NE-status, stammer etter Wycliffe T-kull. Også hunder som i dag tilsynelatende er ubeslektet over 3 slektsledd er nært beslektet hvis man studerer stamtavlene noen flere generasjoner bakover.

Diskusjon

Lydangst

Helseundersøkelsen er besvart for 402 storpuddler. 61 av disse er døde, med en gjennomsnittlig levealder på 9,94 år. Dersom antallet storpuddler totalt i Norge pr 2015 antas å være omtrent tilsvarende NKKs totale registreringstall de siste ti årene (2005-2014), består storpuddelpopulasjonen i dag av rundt 3200 hunder. Da er ikke import/eksport inkludert. Helseundersøkelsens 402 hunder utgjør følgelig omtrentlig 12% av den totale populasjonen, som gir en sikkerhetsmargin på 4,6% ved et 95% konfidensintervall.

Svar fra helseundersøkelsen viser at 19,4% av storpuddlene viser sterk eller meget sterk frykt for fyrverkeri. Tallene for skudd og torden er henholdsvis 14,9% og 10%. For trafikkstøy og hverdagsstøy er derimot tallene 0,5% og 2%, som viser at storpuddelen ikke er generelt usikker rundt støy. 11,8% er helt eller delvis enig i at hundene er pysete / pinglete på et mer generelt grunnlag.

Når nesten 1 av 5 storpuddler viser uttalt fryktreaksjon i forbindelse med oppskytning av raketter, og 1/6 ved avfiring av skudd, er det forholdsvis mange. Med tanke på at rasen har opprinnelse som vannapportør er det oppsiktsvekkende, dette var opprinnelig jakthunder som ikke bør være skuddredde. At det ikke er lagt vekt på skuddfasthet i avl er ikke overraskende, da rasen i stor grad kun fungerer som familie- og utstillingshund, men det er likevel uventet at en så stor andel hunder kan hevdes å lide av lydangst.

Det er sterk støtte for at lydangst har en genetisk komponent. Dette begrunnes med at forekomst av lydangst varierer sterkt mellom raser (Storengen, Boge, Strøm, Løberg, & Lingaas, 2014).

Antallet hunder som oppgis å ha lydangst er tilsynelatende tilfeldig fordelt mellom både kjønn og fargevarianter. Det er 35 (44%) hanner og 43 (55%) tisper. Farge er ikke oppgitt i undersøkelsen, men et raskt søk på registreringsnummer viser at alle farger er representert, i en fordeling som omtrentlig tilsvarer fargefordelingen i populasjonen for øvrig. Det er flest sorte, mange hvite, omtrent like mange brune og grå, og noen fawn. En eventuell genetisk faktor vil derfor trolig ikke være knyttet til kjønn eller farge.

Genetisk variasjon

Prosjektarbeidet har vist at det er begrenset med variasjon i kandidatgenene på de utvalgte hundene. Det er ikke funnet variasjon i noen exons, heller ikke de exons der det tidligere er beskrevet at det finnes variasjon hos andre raser. Dette kan tyde på at genene er konserverte i rasen, og selvsagt et tegn på at disse genene har vært like hos de hundene som har hatt stor innflytelse på avlen i rasen. Dette er vanskelig å vurdere årsaken til at det er lite variasjon i disse genene hos storpuddel, før en har et bredere bilde av generell variasjon i disse genene hos andre hunderaser. Undersøkelsen av de genetiske markørene, viser en gjennomsnittlig heterozygositet på 0,62. Selv om mange raser kan ha høyere heterozygositet indikerer ikke dette tallet at det er spesielt manglende genetisk variasjon hos storpuddel.

Dette er et lite materiale, og på enkelte exon er bare et fåtall hunder sekvensert. Det er derfor ikke usannsynlig at det kan finnes variasjon i populasjonen på de aktuelle genene. Men fordi undersøkelsen omfatter både svært redde og helt uredde hunder er det lite trolig at disse genene kan assosieres med lydangst. Det betyr at det er andre gener som påvirker angst hos storpudde.

Enkelte exons er ikke sekvensert, og variasjon i disse er derfor ukjent. Dette skyldes først og fremst primere som ikke har fungert, og begrenset tidsramme. Det er selvsagt mulig at årsaken til at det har vært vanskelig å få PCR-produkter fra noen exons, og at noen PCR-produkter gav dårlig sekvens, nettopp skyldes genetisk variasjon (f.eks. mindre insersjoner/delesjoner). Det kan selvsagt være at slik variasjon kunne være assosiert med lydangst, men inntil nærmere studier av alle exons er gjennomført må en gå ut fra at disse genene ikke er assosiert med lydangst hos pudde.

For CRH er begge exons sekvensert, men på et lite antall hunder. Exon 1 er UTR. Exon 2 har kodende første halvdel. Det ble derfor gjort mange forsøk på å få primerne her til å fungere bedre, og satt opp sekvensering gjentatte ganger. Det er ikke funnet variasjon i de sekvensene som er mulige å tolke, men fordi antallet er så lite er det ikke mulig å konkludere med at variasjon ikke finnes.

For RGS2 er exon 1 ikke sekvensert. Første halvdel av exonet består av et område uten kjent sekvens (N-område), og også intronet før dette består av et lengre område med ukjent sekvens. Det er forsøkt laget primere over dette området, og også kryssninger mellom gammel og ny R- og F-primer, uten gode bånd. Enkelte sekvenser er doble og uleselige, mens andre har lav kvalitet og er bare delvis mulige å rekonstruere. Der det finnes sekvenser er disse uten

variasjon. Dette tyder på at disse sekvensene har en struktur som gjør at de er vanskelige å amplifisere/sekvensere.

RGS2 exon 2, 3, 4 og første del av exon 5 gir gode bånd på gel, og sekvenseres med god kvalitet. De er alle sekvensert på 24 hunder, hvorav 16 fra studiepopulasjonen og 8 fra kontrollpopulasjonen. Det er ikke funnet noen variasjon på disse fire, og heller ikke på intronet mellom exon 2 og 3, som er sekvensert i sin helhet. Alle følger de sekvensene som er oppgitt som standard. Resten av RGS2 exon 5 består av UTR. Deler av exon 5, lot seg ikke sekvensere/amplifisere, og disse primerne har heller ikke har gitt bånd på gel. For del 5, 6 og 7 er det sekvensert 16 hunder uten å finne variasjon.

Tross et relativt stort antall sekvenser er det i disse ikke funnet noen variasjoner i en relativt heterogen gruppe hunder, for RGS2. Det kan finnes SNPer hos hunder som ikke er sekvensert, men det er usannsynlig at dette er av betydning for forekomsten av lydangst hos storpuddel. Det er også en mulighet for at det finnes variasjon i introns som ikke er blitt med, og i exon 1, som ikke lar seg sekvensere med de primerne som er brukt i dette forsøket.

For PSAP er det 10 exons forsøkt sekvensert. For exon 7 og 13 er kvaliteten på sekvensene så lav at det ikke er mulig å vurdere om det finnes variasjon i disse. I nærheten av exon 1 og exon 8 er det tidligere funnet en insersjon/delesjon i et lite utvalg hunder av ulike raser (Ellen Arnet, upubliserte data). Det er ikke funnet noe hos storpuddel tidligere. Sekvensering av DNA fra 32 storpuddler viser ingen variasjon i dette området, verken i exon eller i intron. Alle sekvensene er identiske med referansesekvensen. De øvrige 4 (5) exons er ikke forsøkt sekvensert, fordi primerne ikke ga bånd på gel.

Stamtavleforskningen viser at det gjennom tidene har vært sterk linjeavl på storpuddel, og en kan argumentere for at også det kan ha betydning for den genetiske variasjonen. At hundene er så nært beslektet gir lavere sannsynlighet for genetisk variasjon, og kanskje er storpuddler en mer homozygot hunderase enn man antar. Det er påstått at pudler med ulik farge er mer ubeslektet, men søk i stamtavlene viser at dette ikke er tilfelle. Også de brune, røde og grå storpuddlene kan kobles til de sorte og hvite linjene via få slektsledd. Det eneste unntaket finnes i enkelte brune linjer, der det ikke finnes Wycliffehunder, men i stedet en gammel Tsjekkisk linje. Undersøkelsen har bare med to hunder fra disse linjene, og utvalget er derfor for lite til å si sikkert om det kan være større genetisk variasjon der.

Det er totalt sekvensert omtrent 6000 basepar, i hovedsak exons. Det er ikke funnet variasjon i noen av de sekvenserte områdene på noen av de tre genene. Det er derfor sannsynlig at det finnes lite variasjon i disse genene hos storpuddel. Hvorfor finner vi ikke genetisk variasjon i disse tre kandidatgenene? Det kan være mange årsaker til dette.

Variasjon er beskrevet i CRH og RGS2 hos mus, rotte og menneske, men hittil ikke hos hund. Dette kan være et resultat av linjeavl, genetiske flaskehalsar eller genetisk drift. Dersom disse genene er i nærheten av andre gener som er påvirket av seleksjon for rasetypiske egenskaper (som ofte viser mindre variasjon), kunne en også tenke seg at det virket negativt på variasjon i disse genene. Høy grad av innavl forekommer hos mange raser, også hos storpuddel, og vil kunne ha ført til en grunnere genpool. Enkelte egenskaper er systematisk selektert vekk, egenskaper som kan ha vært koblet til spesifikke genetiske varianter.

Disse genes betydning i kroppen er omfattende, og det er mulig at variasjon her ikke er forenlig med liv eller at det er en sterk naturlig seleksjon mot nye, mindre funksjonelle

varianter. CRH er for eksempel direkte koblet opp mot immunsystemet og ACTH-systemet, som styrer svært mange livsviktige funksjoner i kroppen. Dersom dette er tilfelle vil spontane mutasjoner i disse områdene ha forsvunnet ved naturlig seleksjon, ved at affiserte individer ikke blir født, ikke vokser opp eller ikke formerer seg.

At variasjon i PSAP 1 og 8 ikke er funnet hos storpuddel kan tyde på at denne variasjonen ikke finnes hos denne rasen. Forsøket der denne variasjonen først ble oppdaget omfattet 8 ulike raser. Det er ikke gjort videre undersøkelser av disse for å undersøke om sekvensene varierer mellom hunder av samme rase, eller om alle er like innad i rasene. Det er derfor heller ikke gjort noen vurdering av denne variasjonens betydning for lydangst.

Enkelte primere fungerer veldig dårlig, eller ikke i det heletatt, med dette materialet. Det kan skyldes at sekvensene er vanskelige å amplifisere, for eksempel på grunn av ugunstig basesammensetning, eller at det aktuelle genet er vanskelig å sekvensere. Dersom området der primerne plasseres har stor genetisk variasjon kan dette føre til mutasjoner i primersetet og redusere primerfunksjonen. Et annet utfall er dårlige/uleselige sekvenser. For enkelte av disse exonene er det lange områder med ukjent sekvens. Grunnen til at sekvensen er ukjent etter sekvenseringen av hundegenomet, kan nettopp tyde på at sekvensen er vanskelig å amplifisere/sekvensere. Det er selvfølgelig en mulighet for at det forekommer variasjon i de områdene som ikke er sekvensert. Det er også mulighet for at variasjon forekommer akkurat i det området primeren er designet for å binde, og at det fører til at de aktuelle DNA-prøvene ikke blir sekvensert.

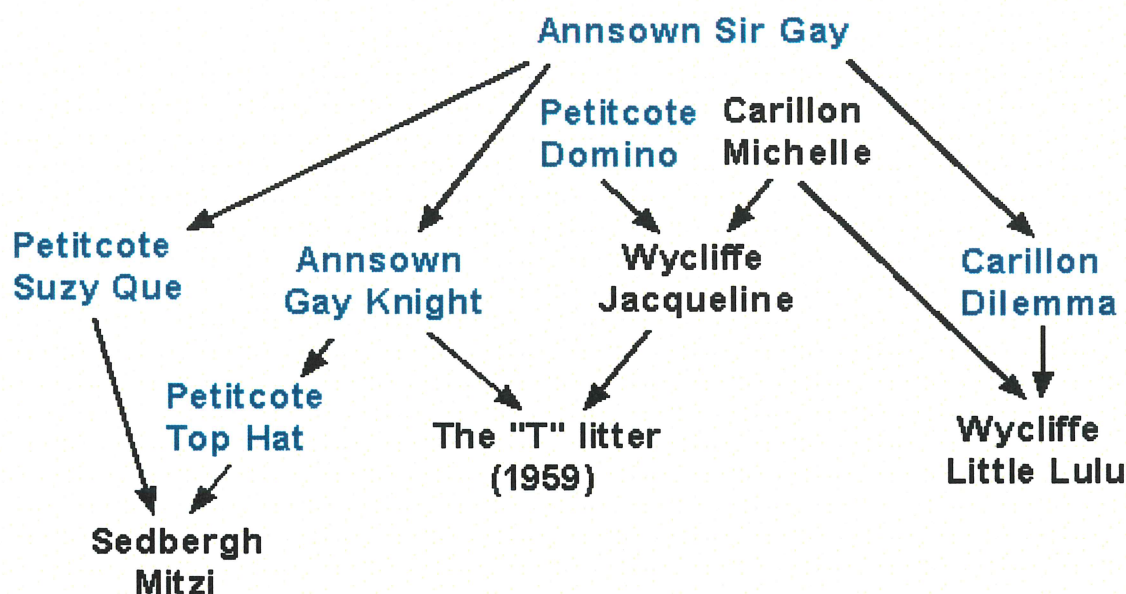
Ved å undersøke genetisk variasjon hos 29 storpuddler, målt med 19 ulike mikrosatelitt-primere, finnes et gjennomsnittlig antall alleler på 6,26 (range 2-11) og en gjennomsnittlig

heterozygositet på 0,64. Dette er tall som vitner om en generelt akseptabel genetisk variasjon hos rasen. Det tyder på at det først og fremst er de valgte kandidatgenene kan ha lite genetisk variasjon, og at genene er godt konserverte gjennom evolusjonen, slik som diskutert tidligere. Genenes funksjon kan være av en sånn betydning at mutasjoner her ikke er forenelig med liv, og at variasjoner forsvinner i den naturlige seleksjonen.

Nedarving av Neonatal Encephalopathy

Stamtavlegranskningen viser at nesten alle storpuddler i dag har et felles opphav i kennel Wycliffe. Dette var en Canadisk kennel som på 50- og 60-tallet drev hard linjeavl på bare 5 storpuddler. Senere drev kennelen systematisk linjeavl i flere tiår, og alet opp svært mange champions som ble ettertraktede avlshunder i verden for øvrig.

Den virkelig store seleksjonen hos kennel Wycliffe skjedde i 1959, med det som er blitt kjent som "The T-litter". (John B. Armstrong, 1999, upublisert data). Dette kullet oppsto etter linjeavl på hundene Annsown Sir Gay, og Annsown Gay Knight, T-kullvalpene ble avlet på hverandre og hverandres avkom, og samtlige Wycliffe-hunder har en eller flere av disse hundene bak seg, gjerne på flere sider av stamtavla. Dette er kjent blant puddeloppdrettere som "the Wycliffe bottleneck", og PHR oppgir prosent av Wycliffe på stamtavlene til alle hundene i sin database som direkte følge.



Figur 18: Wycliffe bottleneck, Armstrong 1999

Samtidig som det kan konkluderes med at Wycliffe finnes bak svært mange nålevende storpuddler, er det ikke påfallende mange hunder som er bærere av genet for NE. Alle de hundene som er funnet bærere i denne studien, og alle hundene som offisielt er kjente bærere kan spores til den ene hannhunden, Pinafore President, født i 1981. Det finnes en rekke hunder som ikke har denne hunden i sin stamtavle.

Pinafore President har også Wycliffe-bakgrunn, med Wycliffe Virgil på begge sider av sin stamtavle (etter Wycliffe Timothy). Også Wycliffe Theresa og Wycliffe Tomas er bak på samme stamtavle. Han er selv etter en halvsøskenparring; Langcroft Country Pride er både morfar og farfar.

Med tanke på den utbredte bruken av hundene i Wycliffes T-kull er det usannsynlig at disse hundene var bærere av mutasjonen på ATF2 som forårsaker NE. Alle de aktuelle stamtavlene møtes 6 generasjoner før Wycliffe T-kull. Skulle Wycliffes T-hunder vært bærere ville enda flere hunder vært bærere, og gått utenom Pinafore President.

NE-mutasjonen er hittil ikke funnet hos de små pudlene, noe som kan tyde på at mutasjonen oppsto etter at stor og liten puddel ble adskilte raser. Dersom vi ser disse opplysningene under ett, og går ut i fra at Pinafore President må ha vært bærer av mutasjonen på ATF2, kommer vi til to potensielle scenarioer:

- Mutasjonen på ATF2 oppsto i Pinafore President, eller en av hans forfedre, utenom Wycliffe-linjene.
- Mutasjonen på ATF2 fantes i en av hundene som er stamfar for kennel Wycliffe.

Det første scenarioet er absolutt mer sannsynlig enn det andre, spredningen av Wycliffe tatt i betraktning. Hvilken hund før Pinafore President som er mutasjonens opprinnelse vil det være vanskelig å spekulere i, men fordi ingen kjent bærer er funnet uten direkte tilknytning til denne enkelthunden, er det ikke sannsynlig at mutasjonen oppsto lenge før ham.

Samtidig som det konkluderes med at Pinafore President kan være stamfar for alle NE-bærere i Skandinavia kan det trekkes noen flere konklusjoner. NPK tok inn anbefalt NE-test i sine avlskrav i 2010, etter at USA-import og NE-bærer Diego Da Maya ble champion, og oppdrettere begynte å bruke ham på sine tisper i Norge og Sverige. Det ble gått ut i fra at dette ikke var et problem i Skandinavia fra før, og mange stilte seg skeptiske til å ta genet inn i populasjonen. Diego Da Maya ble derfor brukt relativt lite.

Stamtavlegranskningen viser derimot at vi har hatt flere linjer etter Pinafore President i både

Norge og Sverige i minst to tiår, og at enkelte oppdrettere har doblet på NE-linjer flere ganger. Det er svært sannsynlig at noen har opplevd å miste valper affisert av NE, uten at de har forstått at det var dette valpene led av. Sekvensering av DNA fra undersøkelsens 70 hunder bekrefter dette; det er funnet bærere som ikke har noen tilknytning til Diego Da Maya før tidligst ved Lake Cove that's my boy.

Begrensninger

Det kan være ulike tilfeldige og systematiske faktorer som påvirker utfallet av et studie som dette.

Når det gjelder atferdsundersøkelsen vil denne kunne være påvirket av eiers tolkning av hundens atferd, som vil kunne gi tilfeldige feil i undersøkelsen. Eier kan ha mistolket spørsmål, trykket på feil alternativ eller unnlatt å svare på enkelte spørsmål. I denne sammenheng er det særlig definisjonen av frykt for fyrverkeri som er relevant (frykt / ikke-frykt). Ulike mennesker definerer frykt på ulik måte. Hundene er ikke observert av en uavhengig part under påvirkning av lyd, og beskrivelsen fra eier kan ikke valideres med sikkerhet. Helseundersøkelsens totale validitet stiller krav til at eiere er ærlige og nøyaktige i sine besvarelser.

For NE forutsetter stamtavlegranskningen at korrekt informasjon er lagt ut av PHR og OFA.

Det er også muligheter for systematiske feil i helseundersøkelsen, ved at det bare en spesiell gruppe av eiere som har svart på undersøkelsen. Dersom bare de som var positive til rasens atferd, eller bare de som var negative til rasens atferd svarte, vil en kunne få et feil inntrykk. Med det antall besvarelser som ligger bak helseundersøkelsen, og at det er en fin blanding av oppdrettere og vanlige hundeeiere som har besvart undersøkelsen er det lite trolig at resultatene påvirkes av systematiske feil.

Ved en eventuell grundigere studie vil det være ønskelig med et større utvalg hunder, både i studiepopulasjonen og kontrollgruppa. Det vil også være nødvendig med sekvensering av et

større materiale. Dette ville kunne øke sannsynligheten for å oppdage sjelden varianter i materialet, men disse ville ikke ha en sannsynlig påvirkning på lydangst i materialet, siden det er en jevn fordeling mellom caser og kontroller i materialet. Når det gjelder selve atferdsklassifisering kunne en tenke seg at hundene kunne vært observert av en uavhengig part, og angst gradert etter fastsatte kriterier. I praksis er dette vanskelig å få til. I denne undersøkelsen vil den dokumenterte begrensede variasjonen i de tre atferdsgenene hos storpuddel begrense mulighetene til å finne assosiasjoner til lydangst av disse.

Konklusjon

Lydangst

Lydangst er et utbredt problem hos storpuddel i Norge, og observeres som sterk eller meget sterk hos omtrent 1 av 5 hunder. Den genetiske bakgrunnen er ukjent, men det er sterke indikasjoner på at det finnes en genetisk komponent i utviklingen av angst hos hund.

Tidligere undersøkelser har vist genetisk variasjon på genene CRH, RGS2 og PSAP hos andre arter/raser storpuddel, men de er ikke påvist tilsvarende variasjon i denne undersøkelsen. En eventuell variasjon er uvanlig og forekommer i gjennomsnitt hos færre enn 1 av 16 hunder.

Det er ikke sannsynlig at denne eventuelle variasjonen er assosiert med frykt for høye lyder.

En eventuell variasjon kan være assosiert med andre fysiske eller mentale egenskaper som ikke er belyst i denne oppgaven.

For øvrig er eiere av storpuddel generelt fornøyd med hundenes gemytt og atferd, de opplever rasen som frisk, glad og familiekjær. Rasen er generelt trygg i hverdagen, og mentalt stabil i møte med hverdagsutfordringer og hverdagsstøy.

Undersøkelsen av generell genetisk variasjon hos storpuddelpopulasjonen viser ikke tegn på spesielt lav genetisk variasjon i rasen. Den lave genetiske variasjon i de undersøkte atferdsgenene, kan derfor være et uttrykk for at disse har viktige funksjoner som begrenser muligheten for variasjon, eller at genene kan ligge i nærheten av andre gener som har vært utsatt for seleksjon knyttet til rasetypiske egenskaper. Det er begrenset kunnskap om genetisk variasjon i disse genene hos andre hunderaser, og det er derfor vanskelig å vurdere om disse genene kan være assosiert med angst i andre raser.

Neonatal Encephalopathy

Undersøkelsen av hundene i materialet viser tilstedeværelse av den samme mutasjonen på ATF2 som tidligere publisert (Chen et al., 2008). Den er mulig å teste for ved sekvensering av DNA fra både blod og svaber, og innledende tester viser i hovedsak klare resultater. Det er mulig å spore mutasjonen bakover i stamtavlene, og studier av stamtavlene viser at hunden Pinafore President kan ha vært bærer av mutasjonen. Dersom det er tilfellet kan det ha bidratt til genets spredning i storpuddelpopulasjonen, både i Skandinavia, Europa for øvrig og i USA.

Det er ikke mulig å konkludere med i hvilken hund mutasjonen først har oppstått, men det er sannsynlig at den har opprinnelse i USA eller Canada, et sted mellom Wycliffe's T-kull i 1959 og Pinafore President i 1981. Det er ikke funnet litteratur som indikerer at denne konklusjonen er trukket tidligere.

Det lever i dag mange hunder i Skandinavia, og Europa for øvrig, som har Lake Cove That's my Boy eller hans forfedre, inkludert Pinafore President, på mange steder i sine stamtavler, og som er potensielle bærere av genet for NE. Det er ikke usannsynlig at mange er bærere uten at eieren er klar over at linjene er utsatt. Det vil være fornuftig av storpuddeleiere å teste sine hunder for NE før de bruker sine hunder i avl, for å unngå dobling av genet, og dermed tap av valper.

Takk til bidragsytere

Stor takk til veileder Frode Lingaas for oppfølging, hjelp og støtte både med prosjektoppgaven og helseundersøkelsen. Takk også til Ole, Ellen, Margrethe og Liv på seksjon for genetikkk for at de aldri slutter å smile og trøste når studentene ser fortvila ut. Takk til medstudent Kim Bellamy for fabelaktig positiv innstilling og samarbeidsvilje.

Stor takk til Ida Myhrer Stø for uvurderlig hjelp med stamtavlegranskning, tekniske utfordringer og generell motivasjon til å ikke gi opp! Takk til Norsk Puddelklubb og alle de norske puddeleiere for bidrag til oppgaven.

Takk også til medstudent Liza Miriam Cohen for distraksjoner, overfladiske samtaler og lange fine turer med puddeldamene.

Takk til pappa for evig optimisme, og til mamma for hjemmelagde kjøttkaker, rent sengetøy og lufting av hunder.

Summary

Title: Noise anxiety, genes and genetic variation in Standard Poodles, a study with focus on behaviour related genes

Author: Karin Handegård Westereng

Supervisor: Prof. Frode Lingaas, BasAm, Section for genetics

A health survey regarding Standard Poodles has been conducted, showing that noise anxiety is prevalent in the Norwegian Standard Poodle population, and that strong or very strong fear of noises affects almost 1 in 5 dogs. Several studies show in different species show that behaviour is hereditary, and that there are a number of genes that are associated with the occurrence of noise anxiety in other species.

DNA samples have been taken from 28 Standard Poodles with firework related anxiety, and 30 dogs without fear of fireworks. Three candidate genes, previously shown to be associated with anxiety, have been selected for further study; CRH, RGS2 and PSAP were sequenced to look for genetic variation, and assess whether variation in these genes is associated with the occurrence of noise anxiety in Standard Poodles. The results show that these genes show little variation in Standard Poodles, and there are no indications that these genes are associated with noise anxiety in this breed. We also conducted a study of genetic variation in the collected material, using 19 polymorphic microsatellites. The study showed that the average heterozygosity of all markers/dogs was 0,64, which indicate does not support a general low level of genetic variation. The reason for the low variation in the candidate genes may therefore be that they may have showed little variation in the founders of the breed, that the function does not allow too much variation or that the genes may be closely linked to genes of traits associated to breed specific characteristics that are (nearly) fixed during selection.

Because of the low observed genetic variation in the three candidate genes, a pedigree study of Standard Poodles was conducted. This study was based on the spread of the gene for Neonatal Encephalopathy. DNA samples from a total of 70 Standard Poodles have been

sequenced on exon 5 of the gene ATF2, to investigate the prevalence of carriers of the recessive mutation causing NE. 10% of the investigated dogs are found to be carriers. Studies of pedigrees find one dog in direct line on all pedigrees with carriers, and this dog is therefore a likely rise to the gene spread in the later population.

Referanser

- Amstadter, A. B., Koenen, K. C., Ruggiero, K. J., Acierno, R., Galea, S., Kilpatrick, D. G., et al. (2009). Variant in RGS2 moderates posttraumatic stress symptoms following potentially traumatic event exposure. *Journal of Anxiety Disorders*, 23(3), 369-373.
- Arato, M., Banki, C. M., Bissette, G., & Nemeroff, C. B. (1989). Elevated CSF CRF in suicide victims. *Biological Psychiatry*, 25(3), 355-359.
- Bakshi, V. P., & Kalin, N. H. (2000). Corticotropin-releasing hormone and animal models of anxiety: Gene-environment interactions. *Biological Psychiatry*, 48(12), 1175-1198.
- Ballamwar, V. A., Bonde, S. W., Mangle, N. S., & Vyavahare, S. H. (2008). Noise phobia in dog. *Veterinary World*, 1(11), 351.
- Brace, C. L. (1962). *Physique, physiology, and behavior: An attempt to analyze a part of their roles in the canine biogram*
- Chen, X., Johnson, G. S., Schnabel, R. D., Taylor, J. F., Johnson, G. C., Parker, H. G., et al. (2008). A neonatal encephalopathy with seizures in standard poodle dogs with a missense mutation in the canine ortholog of ATF2. *Neurogenetics*, 9(1), 41-49.

- Cui, H., Nishiguchi, N., Ivleva, E., Yanagi, M., Fukutake, M., Nushida, H., et al. (2008). Association of RGS2 gene polymorphisms with suicide and increased RGS2 immunoreactivity in the postmortem brain of suicide victims. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 33(7), 1537-1544.
- Deussing, J. M., & Wurst, W. (2005). Dissecting the genetic effect of the CRH system on anxiety and stress-related behaviour. *Comptes Rendus Biologies*, 328(2), 199-212.
- Donner, J., Pirkola, S., Silander, K., Kananen, L., Terwilliger, J. D., Lonqvist, J., et al. (2008). An association analysis of murine anxiety genes in humans implicates novel candidate genes for anxiety disorders. *Biological Psychiatry*, 64(8), 672-680.
- Hawking, S. (1988). *A brief history of time*,
- Hettema, J. M., Sun, C., Chen, X., & Kendler, K. S. (2013). Genetic association study between RGS2 and anxiety-related phenotypes. *Psychiatric Genetics*, 23(2), 92.
- Hohoff, C., Weber, H., Richter, J., Domschke, K., Zwanzger, P. M., Ohrmann, P., et al. (2015). RGS2 ggenetic variation: Association analysis with panic disorder and dimensional as well as intermediate phenotypes of anxiety. *American Journal of Medical Genetics.Part B, Neuropsychiatric Genetics : The Official Publication of the International Society of Psychiatric Genetics*, 168(3), 211-222.
- Holsboer, F. (1999). The rationale for corticotropin-releasing hormone receptor (CRH-R) antagonists to treat depression and anxiety. *Journal of Psychiatric Research*, 33(3), 181-214.

- Holsboer, F., & Ising, M. (2008). Central CRH system in depression and anxiety--evidence from clinical studies with CRH1 receptor antagonists. *European Journal of Pharmacology*, 583(2-3), 350-357.
- Hovatta, I., & Barlow, C. (2008). Molecular genetics of anxiety in mice and men. *Annals of Medicine*, 40(2), 92-109.
- Ingi, T., Krumins, A. M., Chidiac, P., Brothers, G. M., Chung, S., Snow, B. E., et al. (1998). Dynamic regulation of RGS2 suggests a novel mechanism in G-protein signaling and neuronal plasticity. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 18(18), 7178-7188.
- Kehrl, J. H., & Sinnarajah, S. (2002). RGS2: A multifunctional regulator of G-protein signaling. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 34(5), 432-438.
- Koenen, K. C., Amstadter, A. B., Ruggiero, K. J., Acierno, R., Galea, S., Kilpatrick, D. G., et al. (2009). RGS2 and generalized anxiety disorder in an epidemiologic sample of hurricane-exposed adults. *Depression and Anxiety*, 26(4), 309-315.
- Lacerda-Pinheiro, S. F., Pinheiro Junior, R. F., Pereira de Lima, M. A., Lima da Silva, C. G., Vieira dos Santos Mdo, S., Teixeira Junior, A. G., et al. (2014). Are there depression and anxiety genetic markers and mutations? A systematic review. *Journal of Affective Disorders*, 168, 387-398.
- Leygraf, A., Hohoff, C., Freitag, C., Willis-Owen, S. A., Krakowitzky, P., Fritze, J., et al. (2006). Rgs 2 gene polymorphisms as modulators of anxiety in humans? *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria : 1996)*, 113(12), 1921-1925.

- Lifschytz, T., Broner, E. C., Zozulinsky, P., Slonimsky, A., Eitan, R., Greenbaum, L., et al. (2012). Relationship between Rgs2 gene expression level and anxiety and depression-like behaviour in a mutant mouse model: Serotonergic involvement. *The International Journal of Neuropsychopharmacology / Official Scientific Journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)*, 15(9), 1307-1318.
- Lund, D. J., Agger, J. F., & Vestergaard, K. S. (1996). Reported behaviour problems in pet dogs in denmark: Age distribution and influence of breed and gender. *Preventive Veterinary Medicine*, 28(1), 33-48.
- Mackenzie, S. A., Oltenacu, E. A., & Leighton, E. (1985). Heritability estimate for temperament scores in german shepherd dogs and its genetic correlation with hip dysplasia. *Behavior Genetics*, 15(5), 475-482.
- Marks, I. M. (1986a). Epidemiology of anxiety. *Social Psychiatry.Sozialpsychiatrie.Psychiatrie Sociale*, 21(4), 167-171.
- Marks, I. M. (1986b). Genetics of fear and anxiety disorders. *The British Journal of Psychiatry : The Journal of Mental Science*, 149, 406-418.
- Merali, Z., Khan, S., Michaud, D. S., Shippy, S. A., & Anisman, H. (2004). Does amygdaloid corticotropin-releasing hormone (CRH) mediate anxiety-like behaviors? dissociation of anxiogenic effects and CRH release. *The European Journal of Neuroscience*, 20(1), 229-239.
- Mouri, K., Hishimoto, A., Fukutake, M., Nishiguchi, N., Shirakawa, O., & Maeda, K. (2010). Association study of RGS2 gene polymorphisms with panic disorder in japanese. *The Kobe Journal of Medical Sciences*, 55(5), E116-21.

- Newton, I. (1687). *Principa, system of the world*
- Ohl, F. (2005). Animal models of anxiety. *Handbook of Experimental Pharmacology*, (169)(169), 35-69.
- Ohl, F., Arndt, S. S., & van der Staay, F. J. (2008). Pathological anxiety in animals. *Veterinary Journal (London, England : 1997)*, 175(1), 18-26.
- Oliveira-Dos-Santos, A. J., Matsumoto, G., Snow, B. E., Bai, D., Houston, F. P., Whishaw, I. Q., et al. (2000). Regulation of T cell activation, anxiety, and male aggression by RGS2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(22), 12272-12277.
- Overall, K. L., Dunham, A. E., & Frank, D. (2001). Frequency of nonspecific clinical signs in dogs with separation anxiety, thunderstorm phobia, and noise phobia, alone or in combination. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 219(4), 467-473.
- Persson, M. E., Roth, L. S., Johnsson, M., Wright, D., & Jensen, P. (2015). Human-directed social behaviour in dogs shows significant heritability. *Genes, Brain, and Behavior*, 14(4), 337-344.
- Rugbjerg, H., Proschowsky, H. F., Ersboll, A. K., & Lund, J. D. (2003). Risk factors associated with interdog aggression and shooting phobias among purebred dogs in denmark. *Preventive Veterinary Medicine*, 58(1-2), 85-100.
- Saetre, P., Strandberg, E., Sundgren, P. E., Pettersson, U., Jazin, E., & Bergstrom, T. F. (2006). The genetic contribution to canine personality. *Genes, Brain, and Behavior*, 5(3), 240-248.

- Salman, M. D., New, J. G., Jr, Scarlett, J. M., Kass, P. H., Ruch-Gallie, R., & Hetts, S. (1998). Human and animal factors related to relinquishment of dogs and cats in 12 selected animal shelters in the united states. *Journal of Applied Animal Welfare Science : JAAWS*, 1(3), 207-226.
- Schmutz, S. M., & Schmutz, J. K. (1998). Heritability estimates of behaviors associated with hunting in dogs. *The Journal of Heredity*, 89(3), 233-237.
- Scott, J. P., & Fuller, J. L. (1965). Physique, physiology, and behavior: An attempt to analyze a part of their roles in the canine biogram.
- Sherman, B. L., & Mills, D. S. (2008). Canine anxieties and phobias: An update on separation anxiety and noise aversions. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, 38(5), 1081-106, vii.
- Smoller, J. W., Paulus, M. P., Fagerness, J. A., Purcell, S., Yamaki, L. H., Hirshfeld-Becker, D., et al. (2008). Influence of RGS2 on anxiety-related temperament, personality, and brain function. *Archives of General Psychiatry*, 65(3), 298-308.
- Smoller, J. W., Yamaki, L. H., Fagerness, J. A., Biederman, J., Racette, S., Laird, N. M., et al. (2005). The corticotropin-releasing hormone gene and behavioral inhibition in children at risk for panic disorder. *Biological Psychiatry*, 57(12), 1485-1492.
- Sotnikov, S. V., Markt, P. O., Malik, V., Chekmareva, N. Y., Naik, R. R., Sah, A., et al. (2014). Bidirectional rescue of extreme genetic predispositions to anxiety: Impact of CRH receptor 1 as epigenetic plasticity gene in the amygdala. *Translational Psychiatry*, 4, e359.

- Spady, T. C., & Ostrander, E. A. (2008). Canine behavioral genetics: Pointing out the phenotypes and herding up the genes. *American Journal of Human Genetics*, 82(1), 10-18.
- Storengen, L. M., Boge, S. C. K., Strøm, S. J., Løberg, G., & Lingaas, F. (2014). A descriptive study of 215 dogs diagnosed with separation anxiety. *Applied Animal Behaviour Science*, (159), 82-89.
- Thorburn, W. M. (1915). Occam's razor. *Mind*, (24), 287-288.
- van Gaalen, M. M., Stenzel-Poore, M. P., Holsboer, F., & Steckler, T. (2002). Effects of transgenic overproduction of CRH on anxiety-like behaviour. *The European Journal of Neuroscience*, 15(12), 2007-2015.
- Yalcin, B., Willis-Owen, S. A., Fullerton, J., Meesaq, A., Deacon, R. M., Rawlins, J. N., et al. (2004). Genetic dissection of a behavioral quantitative trait locus shows that *Rgs2* modulates anxiety in mice. *Nature Genetics*, 36(11), 1197-1202.

Vedlegg

Brev til dyreeier

Instruks for svaberprøver

Tusen takk for at du vil bidra med DNA fra din storpuddel!

Dette prosjektet går ut på å sammenligne DNA fra hunder som er redde for høye lyder med hunder som ikke er redde. Hensikten med prosjektet er å lete etter genetiske markører som kan relateres til frykt hos storpuddel.

DNA-prøven tas ved hjelp av en svaber. Denne finner du vedlagt.

Hvordan ta prøven:

Hunden bør ikke ha spist eller vært ute de siste to timene før prøven tas.

Åpne pakken, og ta vare på papiret.

Unngå å berøre bomullsdelene av svaberen med fingrene.

Gni svaberen godt mot hundens tannkjøtt, på innsiden av kinnene. Det er viktig at du tar i litt, slik at DNA får festet seg godt.

Skru av den grønne korken, og plasser svaberen opp i røret med blå væske, og skru godt igjen.

Bomullsenden skal nå være badet i væske.

Merk glasset tydelig med hundens navn, og legg det tilbake i pakken. Teip den igjen.

Legg ved en kort beskrivelse av hunden, inkludert navn (stamtavlenavn eller kallenavn), fødselsdato hvis du har den, og en vurdering av hvor redd hunden er for fyrverkeri. Skriv

gjerne noe om hvordan hunden reagerer på høye lyder. Legg også ved navn på eier, og kontaktinformasjon (telefonnummer eller epost).

Hunden testes for den arvelige sykdommen Neonatal Encephalopathy, resultatet på denne testen kommer i løpet av mars.

Legg prøven i en vanlig konvolutt, sett på frimerke og merk konvolutten med:

Norges miljø- og biovitenskapelige universitet

Fakultet for veterinærmedisin og biovitenskap

BasAm – seksjon for genetikk

PB 8146 Dep.

0033 Oslo

Merk konvolutten med "Karin Westereng – storpuddel".

Takk for hjelpen!

Med vennlig hilsen

Karin Westereng, veterinærstudent

NMBU, Norges Veterinærhøgskole

karinwe@nmbu.no

Database

ID	FØDT	CASE	FARGE	KJØNN	PRØVE	ID	FØDT	KTR	FARGE	KJØNN	PRØVE
1	2003	R		H	Blod	1a	2002	U	G	H	Blod
4a	2009	R	S	T	Blod	2a	2007	U	G	T	Blod
1b	2002	R	S	T	Blod	3a	2009	U	S	T	Blod
3b	2009	R	H	T	Blod	5a	2012	U	G	H	Blod
1d	2009	R	S	T	Svaber	6a	2013	U	G	T	Blod
2d	2011	R	S	T	Svaber	7a	2012	U	G	H	Blod
4d	2009	R	H	H	Svaber	8a	2009	U	H	H	Blod
5d	2006	R	S	T	Svaber	9a	2011	U	G	T	Blod
6d	2006	R	S	H	Svaber	10a	2007	U	S	T	Blod
8d	2011	R	H	T	Svaber	2b	2009	U	S	H	Blod
6e	2013	R	S	T	Svaber	3d	2004	U	B	T	Svaber
1g	2007	R	S	T	Svaber	7d	2013	U	S	T	Svaber
4g	2007	R	H	T	Svaber	1e	2010	U	S	T	Svaber
5g	2011	R	G	T	Svaber	2e	2004	U	S	H	Svaber
6g	2007	R	S	T	Svaber	3e	2011	U	A	H	Svaber
1h	2002	R	S	H	Svaber	4e	2013	U	S	H	Svaber
2h	2012	R	H	T	Svaber	5e	2012	U	A	T	Svaber
3h	2006	R	B	T	Svaber	7e	2013	U	S	T	Svaber
5h	2010	R	S	H	Svaber	8e	2013	U	S	T	Svaber
6h	2007	R	A	T	Svaber	7f	2009	U	B	T	Svaber
7h	2008	R	S	T	Svaber	4h	2009	U	S	T	Svaber
8h	2008	R	A	T	Svaber	5i	2005	U	S	H	Svaber
1i	2000	R	S	T	Svaber	7i	2006	U	S	H	Svaber
2i	2007	R	H	T	Svaber	8i	2008	U	S	H	Svaber
3i	2013	R		H	Svaber	1k	2013	U	S	T	Svaber
4i	2005	R	H	H	Svaber	2k	2011	U	S	H	Svaber
6i	2003	R	S	T	Svaber	3k	2010	U		T	Svaber
7k	2009	R	S	H	Svaber	4k	2012	U		H	Svaber
						5k	2012	U		T	Svaber
						6k	2011	U	S	T	Svaber

R=Redd

S=Sort

T=Tispe

U=Uredd

H=Hvit

H=Hannhund

G=Grå

B=Brun

A=Aprikos/Fawn



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Postboks 5003
NO-1432 Ås
67 23 00 00
www.nmbu.no