



Project: Frequentiebepaling via DNA-testen van een aantal prioritaire erfelijke aandoeningen bij een aantal hondenrassen

Prof. L. Peelman

Labo Dierlijke Genetica (LDG)
Faculteit Diergeneeskunde
Universiteit Gent
Heidestraat 19
B-9820 Merelbeke
Tel 09 264 78 03
Fax 09 264 78 49
Email: Luc.Peelman@UGent.be



Situering

Om een geïntegreerde fokstrategie voor de verschillende hondenrassen in België te kunnen uitwerken op een verantwoorde en wetenschappelijk onderbouwde manier dienen per ras twee belangrijke aspecten binnen de Belgische context te worden onderzocht. Enerzijds dient nagegaan te worden wat de genetische diversiteit en inteeltgraad is binnen de rassen en anderzijds dient bepaald te worden wat de frequentie is van de belangrijkste erfelijke aandoeningen in deze rassen. Enkel door deze gegevens te combineren kan een degelijke geïntegreerde fokstrategie in de huidige Belgische context uitgewerkt worden. Tot op heden werd – voor zover het al werd uitgevoerd – voor zowel de bepaling van de genetische diversiteit als de frequentie van erfelijke aandoeningen gebruik gemaakt van gegevens verzameld in buitenlandse studies/populaties. Deze gegevens werden geëxtrapoleerd naar de Belgische situatie. Hoewel dit zeker een indicatie kan geven over de lokale toestand, houdt het ook een aantal mogelijke valstrikken in. Genetische diversiteit en dus ook de frequentie van erfelijke aandoeningen zijn onderhevig aan plaats- en tijdsgebonden schommelingen als gevolg van het (overmatig) inzetten van bepaalde (populaire) dieren waardoor subpopulaties (lijnen) ontstaan die wat betreft genetische samenstelling behoorlijk van elkaar kunnen verschillen en die bijgevolg niet representatief zijn voor elkaar.

Om een goed idee te krijgen over de Belgische situatie dienen beide aspecten in de huidige, lokale context bepaald te worden. Het geeft weinig meerwaarde om enkel de genetische diversiteit binnen de Belgische populaties te bepalen en voor de erfelijke afwijkingen van buitenlandse gegevens gebruik te maken of omgekeerd. Om echt een goed werkinstrument te maken dienen beide zaken op dezelfde populaties bepaald te worden. Aangezien er nauwelijks tot geen frequentiebepalingen van erfelijke aandoeningen binnen in België gehouden hondenrassen werden uitgevoerd dient dit nog te gebeuren. Gegevens over frequenties van erfelijke aandoeningen verkregen via dierenartsen, dierenklinieken en fokkers zijn heel fragmentarisch om verschillende redenen, waarvan de voornaamste uiteraard is dat er op enkele uitzonderingen na geen systematische registratie is. In veel gevallen worden dierenartsen en dierenklinieken enkel geconfronteerd met aangetaste dieren of dieren waarvan een vermoeden van aantasting bestaat. Een bijkomend probleem is dat nogal wat erfelijke aandoeningen sterk gelijkende symptomen veroorzaken en dat de symptomen van dezelfde aandoening sterke variaties kunnen vertonen waardoor een eenduidige diagnose moeilijk is en de frequentie van voorkomen van de aandoeningen moeilijk te bepalen is op basis van uiterlijke kenmerken. Frequentieschattingen louter op basis van klinische aspecten dienen dan ook met de nodige voorzichtigheid genomen te worden. De situatie is heel anders voor de erfelijke aandoeningen waarvoor een DNA-test werd ontwikkeld. Frequentiebepalingen van mutaties verantwoordelijk voor een erfelijke aandoening kunnen betrouwbaar gebeuren. Een niet onbelangrijk pluspunt hierbij is dat voor recessieve aandoeningen ook binnen de groep van niet aangetaste dieren onderscheid gemaakt kan worden tussen heterozygoten (dragers), die de mutatie aan 50% van de nakomelingen doorgeven, en homozygoten die volledig vrij zijn van de mutatie. Bij de frequentiebepaling op basis van een DNA-test kan dus ook de frequentie bepaald worden van asymptomatische dragers, wat een belangrijk aspect is om gedegen fokadvies te kunnen geven.

Projectvoorstel

Concreet wordt hierbij voorgesteld om aan de hand van beschikbare DNA-testen voor een aantal in België gehouden hondenrassen een frequentiebepaling te doen van een aantal geselecteerde erfelijke aandoeningen. Momenteel zijn reeds meer dan 150 verschillende DNA testen voor honden beschreven in de internationale wetenschappelijke literatuur. Het is onmogelijk om deze allemaal in deze studie op te nemen. Om die reden werd een prioriteitenlijst opgemaakt.

Selectie van de prioritaire hondenrassen en te testen erfelijke aandoeningen

In eerste instantie zal gekeken worden naar een aantal van de elf rassen opgenomen in de studie “Genetische diversiteit in functie van de controle van erfelijke afwijkingen bij Belgische hondenrassen” die momenteel wordt uitgevoerd door de onderzoeksgroep van Prof. Nadine Buys (KULeuven) in het kader van het Consortium en dit om de data van beide onderzoeken zoveel mogelijk te kunnen integreren. Het betreft de rassen Border Collie, Duitse Herder, Golden Retriever en Labrador Retriever. Voor zes rassen betrokken in de vermelde studie, Ardense Koehond, Vlaamse Koehond, Mechelse Herder, Tervureense Herder, Belgisch Griffonnetje en Brussels Griffonnetje, zijn geen DNA testen in het openbare domein beschikbaar. De Mechelse Herder zal echter wel opgenomen worden in de studie, zoals verder is uitgelegd. Het Schipperke, waarvoor 1 DNA test beschikbaar is, is dan weer een weinig populair ras in België en wordt daarom niet opgenomen in de lijst met prioritair te onderzoeken rassen.

De vijf weerhouden rassen behoren tot de meest populaire rassen in België. Volgens de TOP LOSH 2010 staat de Duitse Herder op 1, de Mechelse Herder op 2, de Border Collie op 3, de Golden Retriever op 4 en de Labrador Retriever op 6. Het is dan ook zeer relevant om deze 5 rassen op te nemen in de lijst met prioritair te onderzoeken rassen. Voor veel aandoeningen zijn in de internationale wetenschappelijke literatuur geen prevalentiegegevens beschikbaar. Daar waar dit wel het geval is wordt dit aangegeven.

Voor de Border Collie zijn momenteel 4 DNA testen beschikbaar in het publieke domein. Het betreft Collie eye anomalie (CEA), Cyclische neutropenie (CN), Multidrug resistance 1 (MDR1) en Neuronale ceroid lipofuscinosis 5 (NCL5). De prevalentie van CEA in Border Collies wordt geschat op ongeveer 2 à 3 % in de USA en het VK. In de ruw- en gladharige Collie loopt de frequentie op tot boven de 70% (Lowe et al., 2003). De prevalentie van MDR1 werd in de USA en Duitsland geschat op ongeveer 1%. Bij Collies is de prevalentie ongeveer 60% in beide landen (Mealey, 2008; Gramer et al., 2011). De prevalentie van NCL5 werd in Australië geschat op 3 tot 4% (Melville et al., 2005).

Voor de Duitse Herder zijn momenteel 4 DNA testen beschikbaar in het publieke domein. Het betreft Anhidrotische ectodermale dysplasie (AED), Degeneratieve myelopathie (DM), Mucopolysaccharidosis VII (MPS VII) en Renal cystadenocarcinoma and nodular dermatofibrosis (RCND). AED is een X-gebonden overervende ziekte waardoor ze meer voorkomt bij reuen dan bij teven. DM is een ernstige aandoening van het ruggenmerg die zich pas op latere leeftijd doorzet waardoor in nogal wat gevallen reeds met de dieren is gefokt. Op deze wijze kan de aandoening zich verspreiden. Een DNA test om de mutatie vroegtijdig op te sporen is hier dus heel sterk aangewezen (Awano et al., 2009).

Voor de Golden Retriever zijn momenteel 6 DNA testen beschikbaar in het publieke domein. Het betreft Dystrofe epidermolysis bullosa (DEB), Duchenne musculaire dystrofie (DMD), Osteogenesis imperfecta (OI), Golden Retriever PRA 1 (GR-PRA1), Progressieve rod-cone degeneratie (PRCD) en Sensoric ataxic neuropathy (SAN). De frequentie van DMD blijkt behoorlijk hoog te zijn (Kornegay et al., 2011). SAN is een mitochondriale aandoening die bijgevolg via de moeder wordt doorgegeven (Baranowska et al., 2009).

Voor de Labrador Retriever zijn momenteel 7 DNA testen beschikbaar in het publieke domein. Naast de bij de Golden Retriever vermelde PRCD zijn dat Centronucleaire myopathie (CM), Exercise induced collapse (EIC), Hemofilie B (H-B), Myotubulaire myopathie (X-linked) (XLMTM), Narcolepsie (NA) en Oculoskeletal dysplasie (OD). In een studie op 400 dieren in de VS werd de frequentie van EIC aangetaste dieren vastgesteld op 3% en het aantal dragers van de mutatie op 37% (Patterson et al., 2008). Hemofilie B en XLMTM zijn X-chromosoom gebonden recessieve aandoeningen en komen bijgevolg meer voor bij mannelijke dan vrouwelijke dieren.

Voor de Mechelse Herder specifiek zijn momenteel geen DNA testen in het openbare domein beschikbaar. Echter gezien de populariteit van het ras in België en de relatieve verwantschap met de Duitse Herder is het interessant en nuttig om na te gaan in hoeverre de bij de Duitse Herder geïdentificeerde mutaties (zie hierboven) ook aanwezig zijn bij de Mechelse Herder. Hoewel veel erfelijke aandoeningen bij honden ras specifiek zijn worden een aantal aangetroffen bij heel wat rassen. Dikwijls zijn dit oude mutaties die reeds aanwezig waren voor de splitsing van de rassen, soms zijn het nieuwere mutaties die door (onbewuste) inkruising in een ander ras werden geïntroduceerd. Een voorbeeld hiervan werd onlangs aangetroffen in het LDG met betrekking tot de MDR1 mutatie. Zoals eerder is aangegeven wordt MDR1 frequent aangetroffen bij Collies en in mindere mate ook bij de Border Collie en Shetland sheepdog (sheltie). Deze mutatie werd nu echter tijdens een lopend onderzoek in het LDG ook aangetroffen bij een Duitse Herder.

Naast de 5 vermelde rassen opgenomen in de lopende studie over inteelt wordt voorgesteld om ook 5 andere, in België relatief populaire rassen te bestuderen. Voor deze rassen zijn minstens twee DNA testen beschikbaar en sommige van de betrokken aandoeningen komen, gebaseerd op klinische gegevens, frequent voor.

Voor de Australische Herder zijn momenteel vijf DNA testen in het openbare domein beschikbaar. Het betreft Cataract (CA), Cobalamine malabsorptie (COM), Collie eye anomalie (CEA), Multi drug resistance (MDR1) en Neuronale ceroid lipofuscinosis 6 (NCL6). De prevalentie van MDR1 werd in de VS geschat op 29% (Mealey, 2008) en in Duitsland op 22% (Gramer et al., 2011). De frequentie van NCL6 blijkt heel laag te zijn in de VS (Katz et al., 2011).

Voor de Cavalier King Charles Spaniel zijn momenteel drie DNA testen in het openbare domein beschikbaar. Het betreft Thrombocytopenia (TC), Episodic falling syndrome (EFS) en Duchenne musculaire dystrofie (DMD). In een studie in de VS werd recent het aantal dragers van de EFS mutatie geschat op 12,9% (Gil et al., 2011).

Voor de Ierse Setter zijn momenteel vier DNA testen in het openbare domein beschikbaar. Het betreft Leukocyt adhesie deficiëntie (CLAD), Globoid cell leukodystrophy (Krabbe dis., GCL), Hemofilie A en PRA rcd1. Prevalentie van CLAD werd geschat op 5% in de VS en 7,6% in Australië (Kijas et al., 1999, Jobling et al., 2003). GCL is een progressieve, zeldzame aandoening van het metabolisme. Exacte prevalentiegegevens zijn echter niet beschikbaar (McGraw en

Carmichael, 2006). Het aantal dragers van PRA rcd1 werd in de VS geschat op 7,8% (Aguirre et al., 1999).

Voor de Rottweiler zijn momenteel twee DNA testen in het openbare domein beschikbaar. Het betreft Duchenne musculaire dystrofie (DMD) en Mucopolysaccharidosis I (MPS I).

Voor de Boxer zijn momenteel twee DNA testen in het openbare domein beschikbaar. Het betreft Degeneratieve myelopathie (DM) en Right ventricular cardiomyopathy (ARVC). DM wordt bij de Boxer beschouwd als een frequent voorkomende aandoening. Systematische frequentiestudies van de mutatie werden echter nog niet beschreven (Awano et al., 2009). De frequentie van ARVC wordt in de VS als heel hoog beschreven, maar ook hier zijn geen exacte cijfergegevens beschikbaar (Meurs et al., 2010). Vanwege de hoge frequentie en de ernst van deze aandoeningen is een prioritaire aanpak zeker verantwoord.

Samenvattende tabel met prioritair te onderzoeken rassen en DNA testen

Ras (alfabetisch)	Aandoeningen/DNA testen
Australische Herder	CA, COM, CEA, MDR1, NCL6
Border Collie	CEA, CN, MDR1, NCL5
Boxer	ARVC, DM
Cavalier King Charles Spaniel	TC, EFS, DMD
Duitse Herder	AED, DM, MPS VII, RCND
Golden Retriever	DEB, DMD, OI, GR-PRA1, PRCD, SAN
Ierse Setter	CLAD, GCL, PRA rcd1, H-A
Labrador Retriever	CM, EIC, H-B, XLMTM, NA, OD, PRCD
Mechelse Herder	AED, DM, MPS VII, RCND
Rottweiler	DMD, MPS I

Praktische uitvoering van de DNA-testen

Om een betrouwbare frequentiebepaling te kunnen doen zijn minimaal 50 onverwante dieren noodzakelijk. Gezien mogelijke populatiesubstructuren (lijnen) lijkt het ons echter aangewezen om dit als een absoluut minimum te beschouwen en eerder te streven naar 100. Zoals gebruikelijk in de statistiek is ook hier het principe van hoe meer, hoe betrouwbaarder de resultaten geldig. Voor het verzamelen van de stalen zullen verschillende kanalen aangesproken worden. Om een zo representatief mogelijke steekproef van de Belgische (Vlaamse) populaties te verkrijgen zullen stalen verzameld worden via fokkers, dierenartsen, dierenklinieken en DNA-stalen beschikbaar bij Progenus die werden genomen in het kader van ouderschapscontrole.

Voor de DNA-testen van honden wordt in het LDG, daar waar mogelijk, gebruik gemaakt van zogenaamde probetesten op een real-time PCR machine. Deze probetesten bestaan er uit dat op basis van gezuiverd DNA het stukje gen waarin de mutatie zit wordt vermeerderd via de polymerase kettingreactie (PCR) en dat tijdens deze reactie twee aanwezige, fluorochroom gemerkte sondes (probes) specifiek voor de normale variant respectievelijk de mutante variant, worden afgebroken of niet. Het afbreken van de probe zendt het bijhorende fluorochroomsignaal

uit, dat vervolgens wordt opgevangen door een camera van de machine. Aangezien deze detectie gebeurt tijdens de reactie zelf kan deze in real time gevolgd worden. Vandaar ook de benaming real-time PCR. Bij een dier homozygoot voor de normale variant zal enkel het bijhorende fluorochroom gedetecteerd worden. Idem voor de mutatie. Wanneer beide varianten aanwezig zijn (heterozygoot, drager) zullen beide signalen aan de halve sterke van de homozygoten worden opgevangen.

Voor enkele van de aandoeningen kan de probetest niet gebruikt worden omdat het grote(re) deletiemutaties betreft. Voorbeelden hiervan zijn SAN en EFS. Voor detectie van deze mutaties wordt gebruik gemaakt van een combinatie van PCR en sequencer.

Algemeen ook zullen de stalen die een dubieus resultaat opleveren met de probetest worden gesequencet ter verificatie. Daar sequencer een stuk kostelijker en arbeidsintensiever is dan de real-time PCR wordt dit niet routinematig toegepast.

Referenties

Aguirre, G.D., Baldwin, V., Weeks, K.M., Acland, G.M., Ray, K.: Frequency of the codon 807 mutation in the cGMP phosphodiesterase beta-subunit gene in Irish setters and other dog breeds with hereditary retinal degeneration *Journal of Heredity* 90:143-147, 1999.

Awano, T., Johnson, G.S., Wade, C.M., Katz, M.L., Johnson, G.C., Taylor, J.F., Perloski, M., Biagi, T., Baranowska, I., Long, S., March, P.A., Olby, N.J., Shelton, G.D., Khan, S., O'Brien, D.P., Lindblad-Toh, K., Coates, J.R.: Genome-wide association analysis reveals a SOD1 mutation in canine degenerative myelopathy that resembles amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:2794-9, 2009.

Baranowska, I., Jäderlund, K.H., Nennesmo, I., Holmqvist, E., Heidrich, N., Larsson, N.G., Andersson, G., Wagner, E.G., Hedhammar, A., Wibom, R., Andersson, L.: Sensory ataxic neuropathy in golden retriever dogs is caused by a deletion in the mitochondrial tRNA^{Tyr} gene. *PLoS Genet* 5:e1000499, 2009.

Gill, J.L., Tsai, K.L., Krey, C., Noorai, R.E., Vanbellinghen, J-F., Garosi, L.S., Shelton, G.D., Clark, L.A., Harvey, R.J.: A canine BCAN microdeletion associated with Episodic Falling Syndrome *Neurobiology of Disease* 45: 130-6, 2011.

Gramer, I., Leidolf, R., Doring, B., Klintzsch, S., Kramer, E.M., Yalcin, E., Petzinger, E., Geyer, J.: Breed distribution of the nt230(del4) MDR1 mutation in dogs. *Vet J* 189:67-71, 2011.

Jobling, A.I., Ryan, J., Augusteyn, R.C.: The frequency of the canine leukocyte adhesion deficiency (CLAD) allele within the Irish Setter population of Australia. *Aust Vet J* 81:763-5, 2003.

Katz, M.L., Farias, F.H., Sanders, D.N., Zeng, R., Khan, S., Johnson, G.S., O'Brien, D.P.: A missense mutation in canine CLN6 in an Australian shepherd with neuronal ceroid lipofuscinosis. *J Biomed Biotechnol* 2011:198042, 2011

Kijas, J.M.H., Bauer, T.R., Gafvert, S., Marklund, S., Trowald-Wigh, G., Johannisson, A., Hedhammar, A., Binns, M., Juneja, R.K., Hickstein, D.D., Andersson, L.: A missense mutation in the beta-2 integrin gene (ITGB2) causes canine leukocyte adhesion deficiency *Genomics* 61:101-107, 1999.

Kornegay, JN., Bogan, JR., Bogan, DJ., Childers, MK., Grange, RW.: Golden retriever muscular dystrophy (GRMD): Developing and maintaining a colony and physiological functional measurements. *Methods Mol Biol* 709:105-23, 2011.

Lowe, JK., Kukekova, AV., Kirkness, EF., Langlois, MC., Aguirre, GD., Acland, GM., Ostrander, EA.: Linkage mapping of the primary disease locus for collie eye anomaly. *Genomics* 82:86-95, 2003.

McGraw, RA., Carmichael, KP.: Molecular basis of globoid cell leukodystrophy in Irish setters. *Vet J* 171:370-2, 2006.

Mealey, K.L., Meurs, K.M.: Breed distribution of the ABCB1-1Delta (multidrug sensitivity) polymorphism among dogs undergoing ABCB1 genotyping. *J Am Vet Med Assoc* 233:921-4, 2008.

Melville, SA., Wilson, CL., Chiang, CS., Studdert, VP., Lingaas, F., Wilton, AN.: A mutation in canine CLN5 causes neuronal ceroid lipofuscinosis in Border collie dogs. *Genomics* 86:287-94, 2005.

Meurs, KM., Mauceli, E., Lahmers, S., Acland, GM., White, SN., Lindblad-Toh, K.: Genome-wide association identifies a deletion in the 3' untranslated region of Striatin in a canine model of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Hum Genet* 128:315-24, 2010.

Patterson, EE., Minor, KM., Tchernatynskaia, AV., Taylor, SM., Shelton, GD., Ekenstedt, KJ., Mickelson, JR.: A canine DNMT1 mutation is highly associated with the syndrome of exercise-induced collapse. *Nat Genet* 40:1235-9, 2008.