



Kira Varesvuo

NR2E3- ja ETNK1-geenivariantin aiheuttama etenevä verkkokalvon rappeumasairaus koirilla

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalytiikka (AMK)

Laboratorioanalytiikka

Opinnäytetyö

7.5.2024

Tiivistelmä

Tekijä:	Kira Varesvuo
Otsikko:	NR2E3- ja ETNK1-geenivariantin aiheuttama etenevä verkkokalvon rappeumasairaus koirilla
Sivumäärä:	28 sivua + 1 liite
Aika:	7.5.2024
Tutkinto:	Laboratorioanalyttikko (AMK)
Tutkinto-ohjelma:	Laboratorioanalytiikka
Ohjaajat:	FM Sara Mikkonen Lehtori Tiina Soininen

Työ tehtiin kevään 2024 aikana professori Hannes Lohen Koirien geenitutkimusryhmässä Helsingin yliopistossa ja Folkhälsanin tutkimuskeskuksessa, FM Sara Mikkosen väitöskirjatutkimusta varten. Koirien geenitutkimusryhmän tavoitteena on tunnistaa geenivirheitä koirien erilaisiin perinnöllisiin sairauksiin ja ominaisuuksiin, kehittää geenitestejä jalostuksen apuvälineeksi ja soveltaa saatua tietoa ihmissairauksien selvittämiseen.

Tutkimusryhmä oli jo aiemmin löytänyt etenevää verkkokalvon rappeumasairautta (PRA) aiheuttavan ETNK1-geenivariantin suomenlapinkoirilta ja NR2E3-geenivariantin karjalankarhukoirilta. Työssä oli tarkoitus selvittää, löytyisikö muun rotuisilta, PRA:ta sairastavilta koirilta kyseisiä geenivirheitä. Tutkittavana oli 169 PRA:ta sairastavaa koiraa, 66:sta eri rodusta. Tämän lisäksi oli tarkoitus optimoida ETNK1-PCR:ää jatkotutkimuksiin kantajafrekvenssin selvittämistä varten.

NR2E3-geeniä tutkittiin qPCR:llä, eikä muun rotuisilta koirilta löytynyt kyseistä geenivirhettä. PRA:n aiheuttaja on siis jokin vielä tuntematon geenivariantti. ETNK1-geenivarianttia tutkiessa huomattiin, etteivät alkuperäiset alukkeet olleet sopivia pitkän deleetion PCR:ään. Tilalle suunniteltiin toisenlaiset alukeparit eri sekvenssillä, millä tutkimusta voidaan jatkaa tutkimusryhmässä.

Avainsanat: ETNK1-geenivariantti, NR2E3-geenivariantti, PCR, PRA, qPCR

Tämän opinnäytetyön alkuperä on tarkastettu Turnitin Originality Check -ohjelmalla.

Abstract

Author: Kira Varesvuo
Title: Progressive Retinal Atrophy in Dogs Caused by NR2E3- and ETNK1-gene Variants
Number of Pages: 28 pages + 1 appendix
Date: 7 May 2024

Degree: Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme: Laboratory Sciences
Instructors: Sara Mikkonen, MSc
Tiina Soininen, Senior Lecturer

The thesis project was conducted in Professor Hannes Lohi's canine genetics research group as part of Sara Mikkonen's PhD research in Helsinki University and Folkhälsan research center. The goal of the canine genetics research group is to identify genetic defects in different inherited diseases and characteristics in dogs, develop gene tests as tools for breeding and implement found information to human disease research.

Dog gene research group had found *ETNK1*-gene variant in Finnish Lapphunds and *NR2E3*-gene variant in Karelian Bear Dog. These variants cause progressive retinal atrophy (PRA). The aim of this project was to find out if these genes were the cause of PRA in other dog breeds. This study included 169 dogs suffering from PRA from 66 different breeds. In addition to this, the aim was to optimize *ETNK1*-PCR for further research for carrier frequency.

NR2E3-gene was studied by performing qPCR. No new dog breeds with *NR2E3* gene variant were found. The genetic cause for PRA in these dogs remains unknown. When researching *ETNK1* gene variant, it became clear that the primers used were not suitable for PCR. New primers were designed, and the research group can continue to research this variant.

Keywords: ETNK1-gene variant, NR2E3-gene variant, PCR, PRA, qPCR

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Työn taustaa	1
2.1	Periytymismallit	1
2.2	Koirat geneettisen tutkimuksen kohteina	2
2.3	Verkkokalvon rappeumasairaudet	3
2.3.1	Retinitis Pigmentosa (RP)	5
2.3.2	Progressiivinen retinan atropia (PRA)	5
2.3.3	Etenevä verkkokalvon rappeumasairaus karjalankarhukoirilla ja suomenlapinkoirilla	7
2.4	<i>NR2E3</i> -geeni ja sen toiminta	7
2.5	<i>ETNK1</i> -geeni ja sen toiminta	8
3	Työn suoritus	10
3.1	Tutkimuskohortti	10
3.2	PCR:n optimointi <i>ETNK1</i> -geenille	10
3.3	GC-rikas gradientti PRA:ta sairastavalle suomenlapinkoiralle	12
3.4	<i>NR2E3</i> -geenin qPCR	14
3.5	Jatkotutkimukset yksittäiselle näytteelle	15
4	Tulokset	16
4.1	<i>ETNK1</i> -variantin PCR	16
4.2	TaqMan-ajo <i>NR2E3</i> -geenivariantille	17
5	Tulosten analysointi	20
5.1	<i>ETNK1</i> -alukkeiden suunnittelu jatkotutkimuksia varten	21
5.2	Mahdollisia syitä <i>NR2E3</i> :n qPCR:ssä ilmenneeseen virheeseen	22
6	Yhteenveto	23
	Lähteet	24

Liite 1: Tutkittavat koirarodut

Lyhenteet

- AAV: *Adeno-associated viral vector*. Adenoassosioitu virusvektori.
- DAG: *Diacylglycerol*. Diasyyliglyseroli.
- ECT: *CTP:phosphoethanolamine cytidyltransferase*. CTP:fosfoetanoli-amiinisytidyylitransferaasi.
- EPT: *1,2-diacylglycerol ethanolaminephosphotransferase*. 1,2-diasyy-
liglyserolietanoliamiinifosfotransferaasi.
- FIMM: *Institute for Molecular Medicine Finland*. Suomen molekyyli lääketie-
teen instituutti.
- LCA: *Leber congenital amaurosis*. Leberin synnynnäinen amauroosi.
- PRA: *Progressive Retinal Atrophy*. Etenevä verkkokalvon rappeu-
masairaus.
- PE: *Phosphatidylethanolamine*. Fosfatidyylietanoliamiini.
- RPE: *Retinal pigment epithelium*. Verkkokalvon pigmenttiepiteeli.
- RP: *Retinitis Pigmentosa*. Verkkokalvon pigmenttirappeuma.

Geenit

CCDC66: Coiled-Coil Domain Containing 66.

ETNK1: Ethanolamine kinase 1.

HIVEP3: Human immunodeficiency virus type I enhancer binding protein 3.

IFT122: Intraflagellar Transport 122.

IMPG2: Interphotoreceptor Matrix Proteoglycan 2.

NR2E3: Nuclear receptor subfamily 2 group E member 3.

PDE6B: Phosphodiesterase 6B.

PRCD: Photoreceptor Disc Component.

RHO: Rhodopsin.

RPE65: Retinoid Isomerohydrolase RPE65.

SLC4A3: Solute Carrier Family 4 Member 3.

TTC8: Tetratricopeptide Repeat Domain 8.

1 Johdanto

Työ tehtiin kevään 2024 aikana Hannes Lohen Koirien geenitutkimusryhmässä Helsingin yliopistossa ja Folkhälsanin tutkimuskeskuksessa, osana Sara Mikko-
sen väitöskirjatutkimusta. Koirien geenitutkimusryhmän tavoitteena on tunnistaa geenivirheitä koirien erilaisiin perinnöllisiin sairauksiin ja ominaisuuksiin, kehittää geenitestejä jalostuksen apuvälineeksi ja soveltaa saatua tietoa vastaavien ihmissairauksien geneettisen taustan selvittämiseen. Geenilöydöt avaavat mahdollisuuksia ymmärtää tautimekanismeja ja luovat pohjaa diagnostiikan ja parempien hoitojen kehittämiseen myös ihmisillä, sillä ihmisten ja koirien sairaudet, sekä niiden geneettinen tausta ovat pitkälti samanlaisia. Toistaiseksi suuri osa tutkimusryhmän tunnistamista tautigeneeneistä on ollut samoja myös vastaavissa ihmissairauksissa. [1].

Tutkimusryhmä oli jo aiemmin tunnistanut etenevää verkkokalvon rappeumasairautta (PRA) aiheuttavan *ETNK1*-geenivariantin suomenlapinkoirilta ja *NR2E3*-geenimuutoksen karjalankarhukoirilta. *ETNK1*-geenissä on noin 22 kb:n kokoinen deleetio, *NR2E3*:ssa puolestaan kahden emäksen deleetio. Työn tarkoituksena oli selvittää, löytyisikö muun rotuisilta, PRA:ta sairastavilta koirilta kyseisiä geenivirheitä. Tämän lisäksi oli tarkoitus optimoida *ETNK1*-PCR:ää jatkotutkimuksiin myös kantajafrekvenssin selvittämistä varten.

Yksityiset koirien omistajat olivat vapaaehtoisesti luovuttaneet koiriensa verinäytteitä tutkimusta varten.

2 Työn taustaa

2.1 Periytymismallit

Sairauksien syntyyn vaikuttavat aina perintötekijät. Monigeenisissä sairauksissa vain yhden geenin muutos aiheuttaa sairauden, kun taas polygeenisissä sairauksissa useammat geenit sekä muun muassa elintavat vaikuttavat

sairastumisen riskiin. Ihmisillä suurin osa yleisesti esiintyvistä sairauksista, kuten sydän- ja verisuonitaudit, diabetes, mielenterveyshäiriöt ja allergiset sairaudet, johtuu monien tekijöiden yhteisvaikutuksesta. Kyseessä on monitekijäinen periytyminen, jossa sairastumiseen vaikuttavat perimän lisäksi elinolosuhteet, raskaudet ja elämäntavat. Usein taudin periytymistapa voidaan päätellä sukupuusta, sillä jokaisella periytymistavalla on tunnuspiirteensä. Sukupuuta tarkastelemalla voidaan myös arvioida, onko muuttunut perintötekijä sukukromosomeissa (X ja Y) vai jossakin muussa kromosomissa eli autosomissa. [2.]

Resessiivisessä eli peittyvässä periytymisessä sairaus ilmenee, kun variantti on peritty kummaltakin vanhemmalta. Näin voi käydä, kun kumpikin terveistä vanhemmista on saman geenivariantin kantaja. [3.]

Dominoivassa eli vallitsevassa periytymisessä jo yksi geenivariantti riittää aiheuttamaan sairauden, vaikka vastingeeni olisi normaali. Vallitsevasti periytyvät sairaudet esiintyvät yleensä peräkkäisissä sukupolvissa, mutta oireiden alkamisikä ja vaikeusaste voivat vaihdella saman suvun henkilöillä. Monet vasta aikuisena esiin tulevat perinnölliset sairaudet ovat vallitsevasti periytyviä. Joissain tapauksissa vallitsevasti periytyviin geeneihin on syntynyt uusi variaatio (de novo) siihen muna- tai siittiösoluun, josta sairastunut henkilö on saanut alkunsa. Tällöin tautigeeni ei ole kummaltakaan vanhemmalta peritty. [2.]

X-kromosomissa eli sukupuolikromosomissa olevien perintötekijöiden variaatiot aiheuttavat vakavampia oireita miehille kuin naisille johtuen siitä, että naisilla on kaksi X-kromosomia [2].

2.2 Koirat geneettisen tutkimuksen kohteina

Kesykoiran historia ulottuu vähintään 15 000 vuoden ja mahdollisesti jopa 100 000 vuoden taakse. Kesykoira on kesyyntynyt alun perin harmaasudesta, itäisen Euraasian alueella. Koirat ja ihmiset kehittivät molempia hyödyttävän suhteen jakamalla elintilaa ja ravintolähteitä. Viime vuosisatojen aikana ihmiset ovat kasvattaneet valikoivasti koiria, joiden ominaisuudet tukevat tarpeita esimerkiksi

metsästämisessä ja paimennuksessa. [4.] Kontrolloitujen jalostuskäytäntöjen tulos on erottanut geneettisen vaihtelun koiraroduiksi, joilla on erityisiä fenotyyppejä. Nämä pääasiassa suljetut rotukoirien jalostuspopulaatiot saavat vain vähäistä geneettistä vaihtelua populaation ulkopuolelta, mikä on johtanut geneettisen monimuotoisuuden vähenemiseen rotujen sisällä. [5.]

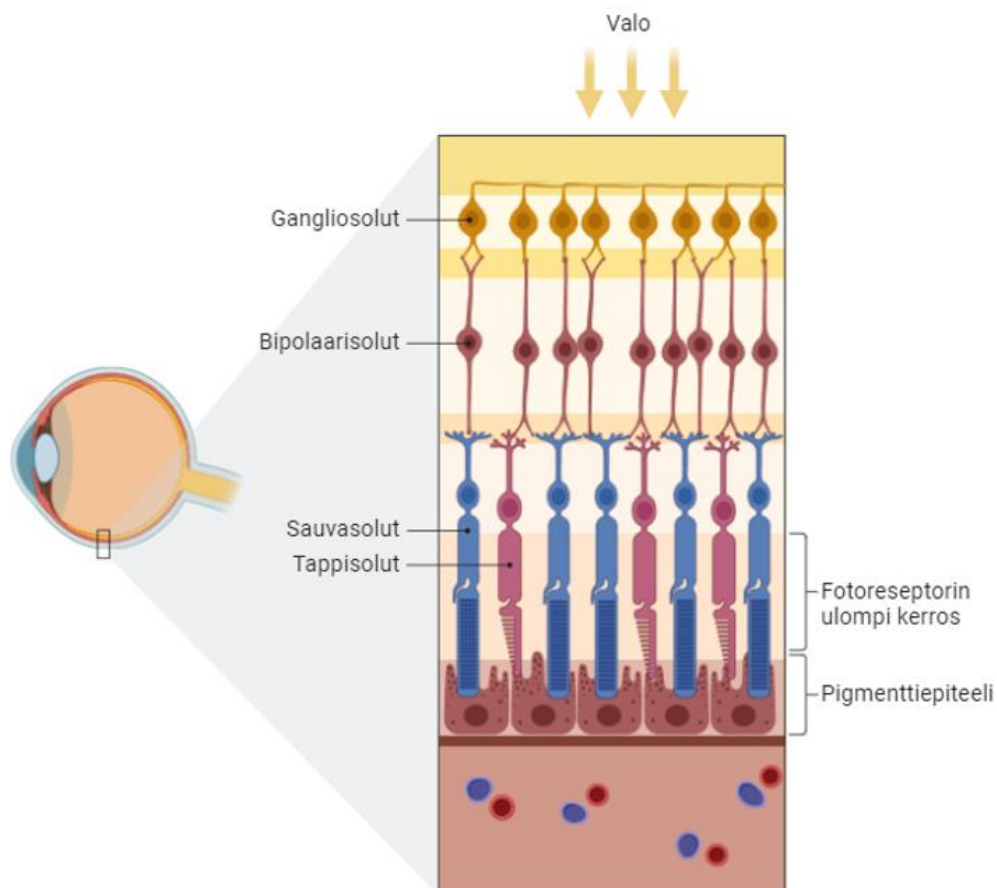
Tiukkojen jalostusohjelmien ja koiran evoluutiohistorian aikana esiintyneiden populaation pullonkaulojen vaikutuksesta monilla noin 400 nykyisestä koirarodusta esiintyy suurissa määrin tiettyjä sairauksia, kuten syöpiä, sokeutta, sydänsairauksia, kaihia, epilepsiaa, lonkkadysplasiaa ja kuuroutta. Useimpia näistä sairauksista havaitaan myös ihmisillä ja kliiniset ilmenemismuodot ovat molemmilla lajeilla samankaltaisia. Tiettyjen sairauksien korkea esiintyvyys tietyissä koiraroduissa antaa viitteitä siitä, että kunkin taudin taustalla on rajattu määrä lokuksia. Tämä tekee niiden geneettisestä tarkastelusta helpompaa kuin ihmisillä. [4.]

Rotukoirien geneettinen yhtenäisyys on ollut eduksi koirien geneettisten ominaisuuksien, kuten verkkokalvon sairauksien, tutkimisessa. Ihmisten verkkokalvosairaudet kattavat laajan fenotyyppi- ja geneettisen kirjon, mikä tekee kunkin muodon eristämisen ja analysoimisen vaikeaksi. Rotukoirien sairaudet ovat puolestaan usein fenotyypiltään ja geneettisesti yhtenäisiä ja siten helpommin tunnistettavissa. Tähän mennessä koirilla on tunnistettu yli 470 varianttia geneettisten sairauksien aiheuttajiksi [6].

2.3 Verkkokalvon rappeumasairaudet

Perinnölliset verkkokalvorappeumat ovat suuri joukko sairauksia, joille on yhteistä etenevät näön menettämiseen johtavat muutokset verkkokalvon aistinso-lujen toiminnassa. Näiden sairauksien luokittelu on muuttunut monimutkaisemmaksi sitä mukaa kun sairauksien aiheuttamia geenejä ja geenivirheitä on tunnistettu. Tautiryhmä on kliinisesti ja geneettisesti heterogeeninen. Usean eri geenin virheet voivat aiheuttaa samankaltaisen taudinkuvan, ja toisaalta yhden geenin virhe voi johtaa taudinkuvaltaan ja periytymistavaltaan erilaiseen sairau-teen. Verkkokalvon rappeumasairaudet johtavat yleensä valoa aistivien solujen

(sauva- ja tappisolut) tuhoutumiseen sisimpien hermosolujen, kuten bipolaari- ja gangliosolujen säilyessä pidempään terveinä. [7.] Kuvassa 1 esitetty verkkokalvon rakenne.



Kuva 1. Verkkokalvo koostuu valoa aistivista sauva- ja tappisoluista sekä sisemmistä ganglio- ja bipolaarisoluista.

Koirat toimivat erinomaisena mallina ihmisten silmäsairauksien tutkimisessa. Koiran silmä on sekä anatomisesti että fysiologisesti hyvin samanlainen kuin ihmisillä, verrattuna esimerkiksi yleisesti eläinmalleina käytettyihin hiiriin. [8.] Koirien verkkokalvon sairaudet ovat samankaltaisia ihmisten sairauksien kanssa, joten koirilla tehdyt tutkimukset edistävät myös ihmisten sairauksien ymmärtämistä [9]. Esimerkiksi Leberin synnynnäinen amauroosi (*Leber congenital amaurosis*, LCA) eli verkkokalvon surkastuma, johon liittyy ensimmäisen elinvuoden aikana ilmestyvä vahvasti alentunut näöntarkkuus, on sairaus, jonka

hoito on kehitetty koiramallin perusteella [10; 11]. LCA-tapauksista 6 % johtuu mutaatioista verkkokalvon pigmenttiepiteelillä (*retinal pigment epithelium*, RPE) ekspressoivassa geenissä, *RPE65*:ssa [12]. Tämä mutaatio löydettiin ensin koirilta, ranskalaiselta briardirodulta [13]. Tunnistettua koiramallia hyödynnettiin testatessa geeniterapian toimivuutta: 16 Rpe65-cDNA:ta kantavaa AAV-vektoria (adenoassosioitu virusvektori) injektoidiin verkkokalvon alle ja niiden osoitettiin muuntavan RPE:tä palauttaen näkösyklin ja johtaen verkkokalvon toiminnan ja näön paranemiseen [14]. Onnistuneiden tutkimusten perusteella geeniterapian mahdollisuutta lähdettiin tutkimaan myös ihmisillä [14], ja nykyään *RPE65*-geenin variantin aiheuttamaan perinnölliseen verkkokalvon surkastumaan on olemassa injektoidava lääke, Luxturna [15].

2.3.1 Retinitis Pigmentosa (RP)

Retinitis pigmentosa on ihmisillä esiintyvä perinnöllinen etenevä verkkokalvon rappeumasairaus, joka johtuu fotoreseptorien, ensimmäisenä sauvasolujen ja lopulta myös tappisolujen sekä pigmenttiepiteelin asteittaisesta tuhoutumisesta. Oireet alkavat hämäräsokeudella sauvasolujen heikennyttyä. Seuraavaksi kehittyy perifeerisen näkökentän puutos, jossa näkökenttä kaventuu reunoilta ja alaosasta. Taudin loppuvaiheessa myös keskikentän näkö häviää ja johtaa viimein sokeutumiseen. Sairaus voi periytyä X-kromosomissa tai autosomissa dominantisti tai resessiivisesti. [16.] Retinitis pigmentosalle on löydetty 69 eri kausatiivista varianttia [17]. Monissa tapauksissa retinitis pigmentosan aiheuttava geenivirhe on voitu tunnistaa, mutta noin 30–80 %:ssa tapauksista sairauden geneettinen tausta on vielä tunnistamatta [18].

2.3.2 Progressiivinen retinan atopia (PRA)

Koirat kärsivät myös retinitis pigmentosan kaltaisesta etenevästä verkkokalvon rappeumasairaudesta, mutta sitä kutsutaan eläinlääketieteessä nimellä progressiivinen retinan atopia, PRA. Sairautta tavataan yli 100 koirarodulla, ja niiden oirekuvasto on kliinisesti tunnistettava ja viittaa eri asteisiin näönpuutteisiin. PRA:n kliiniset tutkimukset ovat osoittaneet, että vaikka taudin loppuvaiheessa

oireet ovat samankaltaisia, ikä, jolloin ensimmäiset muutokset ilmenevät, sekä etenemisnopeus ovat enimmäkseen rotukohtaisia. [6.] PRA:n aiheuttamia variantteja on löydetty rotukoirilta useita. PRA:han ei ole parantavaa hoitoa, mutta sairauden ilmenemiseen voidaan vaikuttaa jalostusvalinnoilla, jota voidaan ohjata esimerkiksi geenitestien avulla. [19.] Taulukossa 1 esitettynä jo tunnettuja PRA:ta aiheuttavia geenivariantteja.

Taulukko 1. Geenit, joista on tunnistettu progressiivisen retinan atropiaa aiheuttavia variantteja. Taulukkoon on merkitty myös, onko ihmisen verkkokalvon sairauksiin tunnistettu samoja kausatiivisia geenejä.

Geeni	Koirarotu	Ihmisillä [17]
<i>RHO</i>	Englannin mastiffi [20]	Kyllä
<i>CCDC66</i>	Schapendoes [21]	
<i>SLC4A3</i>	Kultainennoutaja [22]	
<i>TTC8</i>	Kultainennoutaja [23]	Kyllä
<i>HIVEP3</i>	Kääpiösnautseri [24]	
<i>PDE6B</i>	Espanjanvesikoira [25]	Kyllä
<i>IMPG2</i>	Lhasa Apso [26]	Kyllä
<i>CCDC66</i>	Portugalivesikoira [27]	
<i>PRCD</i>	Useita rotuja [28]	Kyllä
<i>IFT122</i>	Lapinporokoira, suomenlapinkoira [19]	

Viimeisen kahden vuosikymmenen aikana on tunnistettu lukuisia verkkokalvon rappeumasairauksiin yhdistettyjä geenejä ja useita koiramalleja on käytetty ymmärtämään niiden molekyylimekanismeja, sekä testaamaan toimintaperiaatteita ja uusien hoitojen turvallisuutta [29].

2.3.3 Etenevä verkkokalvon rappeumasairaus karjalankarhukoirailla ja suomenlapinkoirailla

Karjalankarhukoira ja suomenlapinkoira ovat molemmat suomalaisia koirarotuja, joilla kummallakin esiintyy PRA:ta [19; 30] Tähän mennessä tehdyissä tutkimuksissa on löydetty kaksi geenivarianttia, *PRCD* ja *IFT122*, joiden variantit aiheuttavat PRA:ta kyseisillä koiraroduilla. Kuitenkaan molempien rotujen useilla koirilla nuorella iällä alkanut PRA ei selity näillä jo tunnetuilla varianteilla [18]. Kuvassa 2 karjalankarhukoira ja suomenlapinkoira.



Kuva 2. Vasemmalla kuvassa karjalankarhukoira, oikealla suomenlapinkoira. Molemmilla roduilla on todettu etenevää verkkokalvon rappeumasairautta.

2.4 *NR2E3*-geeni ja sen toiminta

NR2E3-geeni koodaa fotoreseptorisoluspesifistä tumareseptoria, joka vaikuttaa siihen, tuleeko fotoreseptorisolujen esiasteen solusta tappi- vai saivasolu.

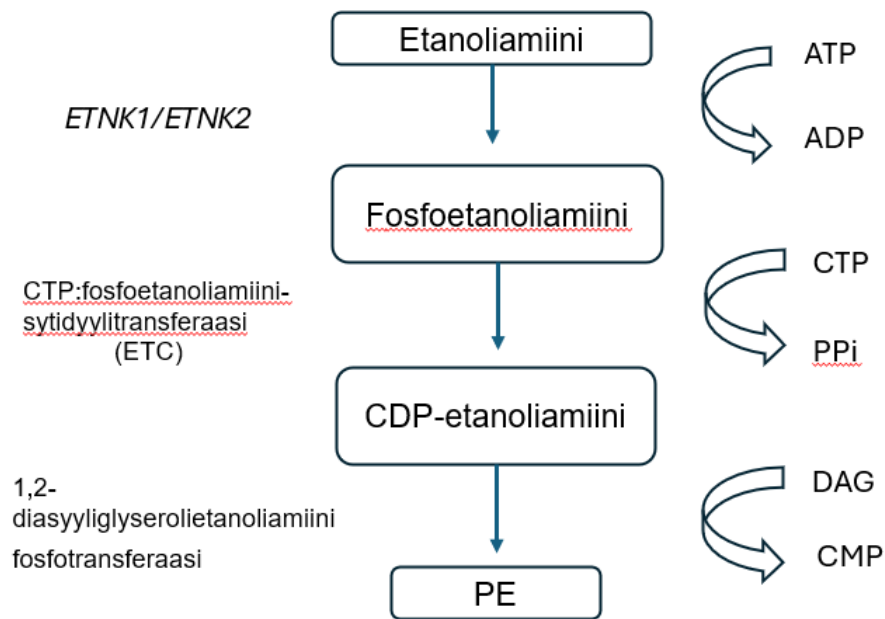
NR2E3:n oletetaan vaikuttavan normaaliin proteiinien silmukoitumiseen. Kyseisen geenin varianttien on todettu aiheuttavan ihmisillä retinitis pigmentosaa, joka johtaa makulan halkeiluun ja tappisolujen toiminnan heikkenemiseen. [31.] Ihmisillä *NR2E3*-geeni sijaitsee kromosomissa 15 [32]. Koirilla *NR2E3*-geeni sijaitsee kromosomissa 30 ja siinä on 10 eksonia [33]. Koiran *NR2E3*-geenin rakenne on esitetty kuvassa 3. Referenssinä käytetty CanFam4-koiran koko genomia.



Kuva 3. *NR2E3*-geenin rakenne. Geeni sijaitsee koirilla kromosomissa 30, eksonia on 10. Eksonit mittakaavassa mustina laatikoina, joiden välissä intronit.

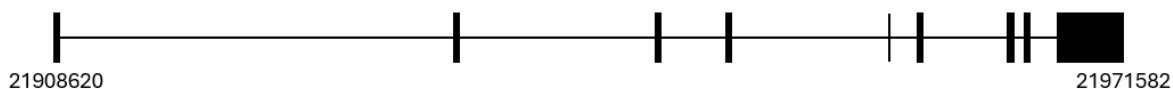
2.5 *ETNK1*-geeni ja sen toiminta

ETNK1, eli etanoliamiinikinaasi toimii fosfatidyylietanoliamiinin synteesin ensimmäisessä vaiheessa. CDP-etanoliamiinireitti fosfolipidisynteesille (kuva 4) koostuu kolmesta entsyymaattisesta vaiheesta. Ensimmäisessä vaiheessa etanoliamiinikinaasi katalysoi etanoliamiinin ATP-riippuvaista fosforylaatiota muodostaen fosfoetanoliamiinia ja sivutuotteena syntyy ADP:tä. Toisessa vaiheessa CTP:fosfoetanoliamiinisytidyylitransferaasi (ECT) käyttää fosfoetanoliamiinia ja CTP:tä muodostamaan korkean energian luovuttajan CDP-etanoliamiinia vapauttaen pyrofosfaattia. 1,2-diasyyliglyserolietanoliamiinifosfotransferaasi (EPT) katalysoi reitin lopullista reaktiota käyttämällä CDP-etanoliamiinia ja lipidiankkuria, kuten diasyyliglyserolia (DAG), muodostaen fosfatidyylietanoliamiinia (PE). [34.]



Kuva 4. CDP-etanolamiinireitti koostuu kolmesta vaiheesta, joista ensimmäisessä *ETNK1* ja *ETNK2* toimivat fosforyloiden etanolamiinia fosfoetanolamiiniksi.

Fosfatidylietanolamiini on toiseksi yleisin fosfolipidi useimmissa soluissa, joissa se muodostaa 25 % kokonaisfosfolipidistä. Fosfatidylietanolamiini ylläpitää kalvon läpäisevyysesteitä ja toimii välituotteena kalvon fuusio- ja fissiotahtumissa. [35]. *ETNK1*-geenin varianttien on todettu aiheuttavan ihmisillä erilaisia myelooisia kasvaimia [36]. Koirilla kyseisen geenin variantteja ei ole aiemmin löydetty. *ETNK1*-geeni sijaitsee ihmisillä kromosomissa 12, ja siinä on 13 eksonia [37]. Koirilla *ETNK1*-geeni (kuva 5) sijaitsee kromosomissa 27, ja siinä on 9 eksonia [38]. Referenssinä käytetty CanFam4-koiran koko genomia. Koirien *ETNK1*-geeni on 92,55 prosenttisesti ortologinen ihmisen vastaavan geenin kanssa [39].



Kuva 5. *ETNK1*-geenin rakenne. Geeni sijaitsee koirilla kromosomissa 27 ja siinä on 9 eksonia. Eksonit mittakaavassa mustina pystyviivoina, joiden välissä intronit.

3 Työn suoritus

Työssä käytetyt näytteet oli kerätty etukäteen Koirien geenitutkimusryhmän biopankkiin. Yksityiset koirien omistajat olivat vapaaehtoisesti luovuttaneet koiriensa verinäytteitä tutkimusta varten. Tutkimusryhmällä on näytteiden keräämiseen lupa Etelä-Suomen aluehallintovirastolta, keräyslupa ESAVI/25696/2020. DNA oli eristetty verinäytteistä ennen työn aloitusta.

3.1 Tutkimuskohortti

Tutkittaviksi näytteiksi valittiin 169 koira, joilla oli todettu PRA. Koirat kuuluivat yhteensä 66 rotuun. Tutkittavat koirarodut esitetty liitteessä 1. Tutkittavaksi valittiin PRA:ta sairastavia koiria, joiden sairautta ei ollut voitu selittää millään muulla jo tunnetulla geenivariantilla. Karjalankarhukoirilta on tunnistettu uusi PRA:ta aiheuttava variantti geenissä *NR2E3* ja suomenlapinkoirilta geenissä *ETNK1*. Tämän työn tarkoituksena oli selvittää, löytyisikö muun rotuisilta koirilta *NR2E3*- tai *ETNK1*-geenivariantin aiheuttamaa PRA:ta.

3.2 PCR:n optimointi *ETNK1*-geenille

Alukepareja oli kahdet, alukepari A ja alukepari B, molempien tuote kooltaan noin 22 000 bp. Taulukossa 2 esitettyinä alukkeiden sekvenssit 5'–3'-suunnassa.

Taulukko 2. Alukkeiden sekvenssit 5'–3'-suunnassa, sekä tuotteiden koot (bp).

Geeni	Aluke	Sekvenssi 5'-3'	Tuotteen pituus (bp)
<i>ETNK1</i>	forward	CCCTGACTTCCAAAAGTCC	22592
<i>ETNK1</i>	reverse	CGTCCCTGTGTACATGCAAG	
<i>ETNK1</i>	forward	TGCTAGGCTTGATCCCACAA	22704
<i>ETNK1</i>	reverse	CGCCCTGACTTCCAAAAGT	

Gradientti-PCR-ajo suoritettiin New England Biolabsin Q5® High-Fidelity PCR -protokollan mukaan. Taulukossa 3 esitetty yhteen reaktioon pipetoitavat määrät µl, sekä reaktion loppupitoisuus.

Taulukko 3. Gradientti-PCRää varten pipetoidut reagenssit (µl) ja reaktion loppupitoisuus.

Q5® High-Fidelity PCR Kit	Reaktion loppupitoisuus	1 reaktioon (µl)
Q5 MASTER MIX 2x	1 x	3,1
10 µM Primer F	0,95 µM	0,6
10 µM Primer R	0,95 µM	0,6
5 M Betaini	0,79 M	1,0
H ₂ O		0,4
DNA 10 ng/µl	0,95 ng/µl	0,6
Yhteensä		6,3

Gradientti-PCR ajettiin Bio-Radin T100 Thermal Cyclerilla. Taulukossa 4 esitetynä ajo-ohjelma.

Taulukko 4. Gradientti-PCR:n ajo-ohjelma.

Lämpötila °C	Aika (s)	Syklit
98	30	
98	10	38
56–65	30	38
72	30	38
72	120	

PCR tuotteet analysoitiin 1 prosenttisella agarosigeelillä käyttäen standardina Generuler 1kb Plus DNA ladderia. Näytteitä ajettiin geelillä 100 V, 45 minuuttia. Geeli kuvattiin Bio-Radin ChemiDoc MP Imaging -laitteella.

3.3 GC-rikas gradientti PRA:ta sairastavalle suomenlapinkoiralle

Alukkeiden toimivuutta testattiin gradienttiajolla Rochen GC-Rich PCR System -protokollan mukaan. Näytteeksi valittiin PRA:ta sairastava suomenlapinkoira. Taulukossa 6 esitettynä pipetoidut määrät ja reaktion loppupitoisuudet.

Taulukko 5. GC-Rich PCR System -protokollan mukaan yhteen reaktioon pipe-
toidut määrät ja reaktion loppupitoisuudet.

GC-RICH PCR System	Reaktion loppupitoisuus	1 reaktioon (µl)
GC rich resolution solution	0,5 M	0,125
5x GC rich PCR reaction buffer with DMSO	1 x	2,5
10 mM dNTP	200 µM	0,075
5 mM F primer	0,5 µM	1,25
5 mM R primer	0,5 µM	1,25
GC rich PCR enzyme	2 U/50 µl	0,25
H ₂ O		3,8
5 M Betaiini	0,8 M	2
DNA 10 ng/µl	1 ng/µl	1,25
Yhteensä		12,5

Gradientti-PCR ajettiin Bio-Radin T100 Thermal Cyclerilla. PCR-ohjelma esitet-
tynä taulukossa 7.

Taulukko 6. Gradientti-PCR-ohjelma.

Lämpötila °C	Aika (s)	Syklit
98	120	
95	30	35
56–65	30	35
72	45	35
72	10 min	
4	Hold	

PCR-tuote analysoitiin 1 prosenttisella agarosigeelillä. Standardina käytettiin Generuler 1kb Plus DNA -ladderia. Geeliä ajettiin 100 V, 45 minuuttia. Geeli kuvattiin Bio-Radin ChemiDoc MP Imaging -laitteella.

3.4 NR2E3-geenin qPCR

Protokollana käytettiin Applied Biosystems'in TaqPath™ ProAmp™ Master Mix -protokollaa. Taulukossa 9 pipetoidut määrät ja reaktion loppupitoisuus.

Taulukko 7. Master mixiä pipetoidut määrät yhteen reaktioon ja reaktioiden loppupitoisuudet.

Protocol TaqPath ProAmp	Reaktion loppupitoisuus (μM)	1 reaktioon (μl)
Genotyping master mix (2x)	1	5
TaqMan SNP genotyping assay (40x)	0,5	0,125
DNA (10ng/μl)	2	2
H ₂ O		2,875
Yhteensä		10

Näytteet pipetoitiin 96-kuoppalevyille, kuhunkin kuoppaan 8 μl Master mixiä ja 2 μl näytettä. Negatiivikontrollina käytettiin steriiliä vettä.

qPCR ajo suoritettiin Bio-Radin CFX96™ Real-Time Systemillä ja C1000 Touch™ Thermal Cyclerilla. Fluoroforeiksi valittiin VIC, FAM ja ROX. Taulukossa 10 esitettynä qPCR-ajo-ohjelma.

Taulukko 8.qPCR-ajo-ohjelma.

	45 sykliä		
	Alkudenaturaatio	Denaturaatio	Annealing + ekstensio
Lämpötila °C	95	95	60
Aika	5 min	15 s	1 min

3.5 Jatkotutkimukset yksittäiselle näytteelle

TaqMan ajosta otettiin jatkotutkimuksiin yksi näyte, jolle suoritettiin PCR-ajo Rochen GC-Rich PCR System -protokollalla, kuten taulukossa 6. PCR-ohjelmanä käytettiin samaa ohjelmaa, kuin taulukossa 7.

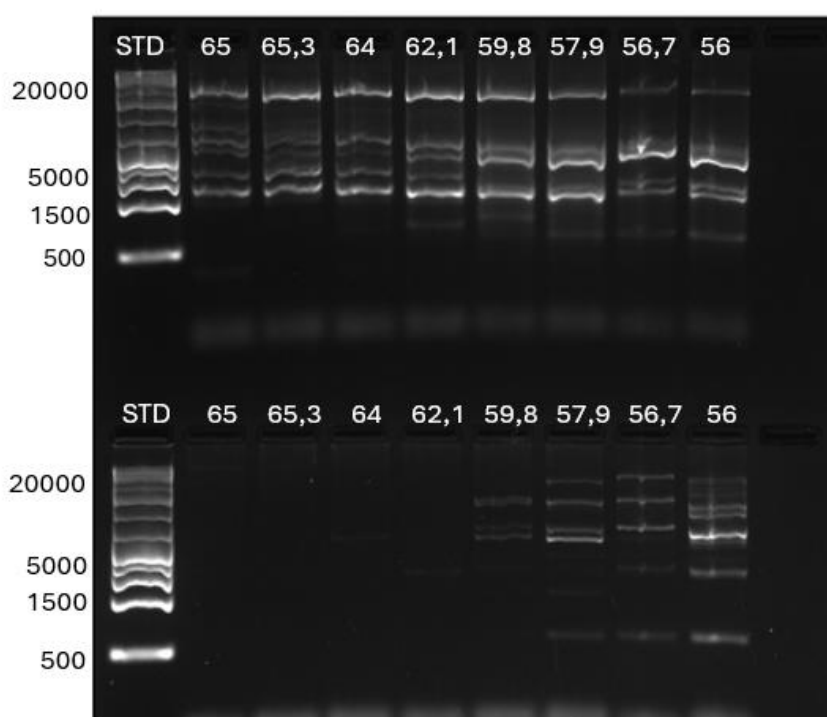
PCR-tuote analysoitiin yksi prosenttisella agarosigeelillä. Standardina käytettiin New England Quick-Load 100 bp DNA -ladderia. Geeliä ajettiin 100 V, 25 minuuttia. Geeli kuvattiin Bio-Radin ChemiDoc MP Imaging -laitteella.

Näyte puhdistettiin Applied Biosystems™ ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent -kitillä sekvensointia varten. Reagenssia pipetoitiin 1,6 µl ja näytettä 5 µl, minkä jälkeen näytettä inkuboitiin 37 °C:ssa 15 minuuttia ja 80 °C:ssa 15 minuuttia. Puhdistuksen jälkeen näytteeseen lisättiin 1,6 µl aluketta (5 µM). Näyte sekvensoitiin forward-suuntaan. Näyte sekvensoitiin Suomen molekyyliäketieteen instituutissa (FIMM).

4 Tulokset

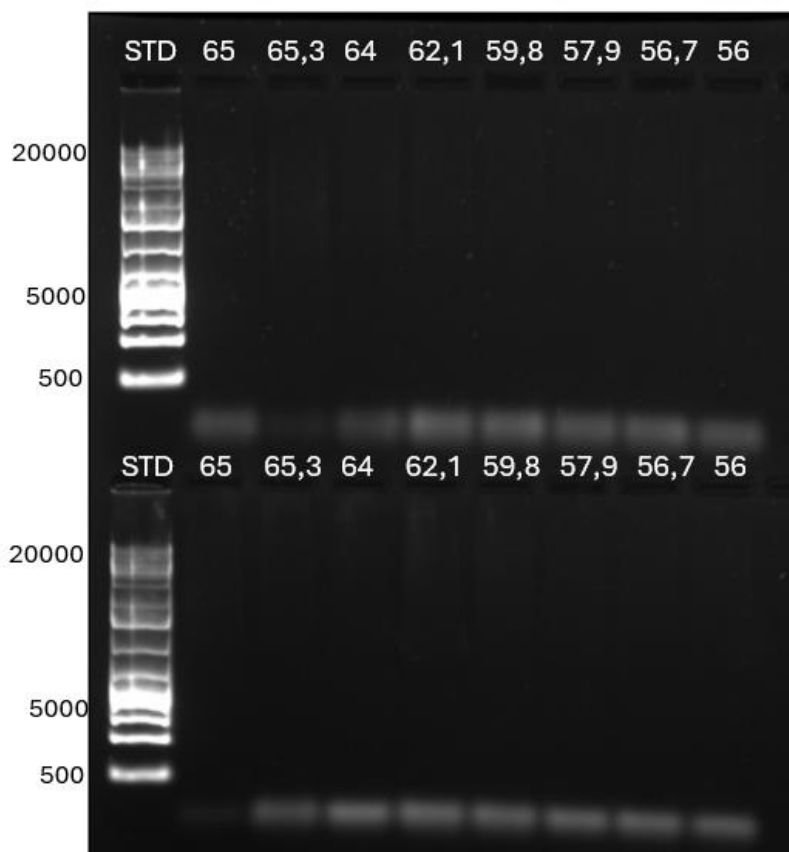
4.1 *ETNK1*-variantin PCR

New England Biolabsin Q5® High-Fidelity PCR kitillä tehty gradientti-PCR-ajo ei onnistunut, vaan geelillä (kuva 6) nähdään molemmilla riveillä useita erikokoisia tuotteita kaikilla eri lämpötiloilla. Ylemmällä rivillä alukepari A, jonka tuotteen koon pitäisi olla 22 592 bp. Alemmalla rivillä alukepari B, jonka tuotteen koon tulisi olla 22 704 bp.



Kuva 6. Toimimattoman gradientti-PCR:n geelikuva, jossa ylärivillä aluke A:ssa (22592 bp) useita tuotteita kaikilla eri lämpötiloilla. Alarivillä aluke B:ssä (22704 bp) useita tuotteita lämpötiloilla 59,8–56 °C. Standardina käytettiin Generuler 1kb Plus DNA ladderia.

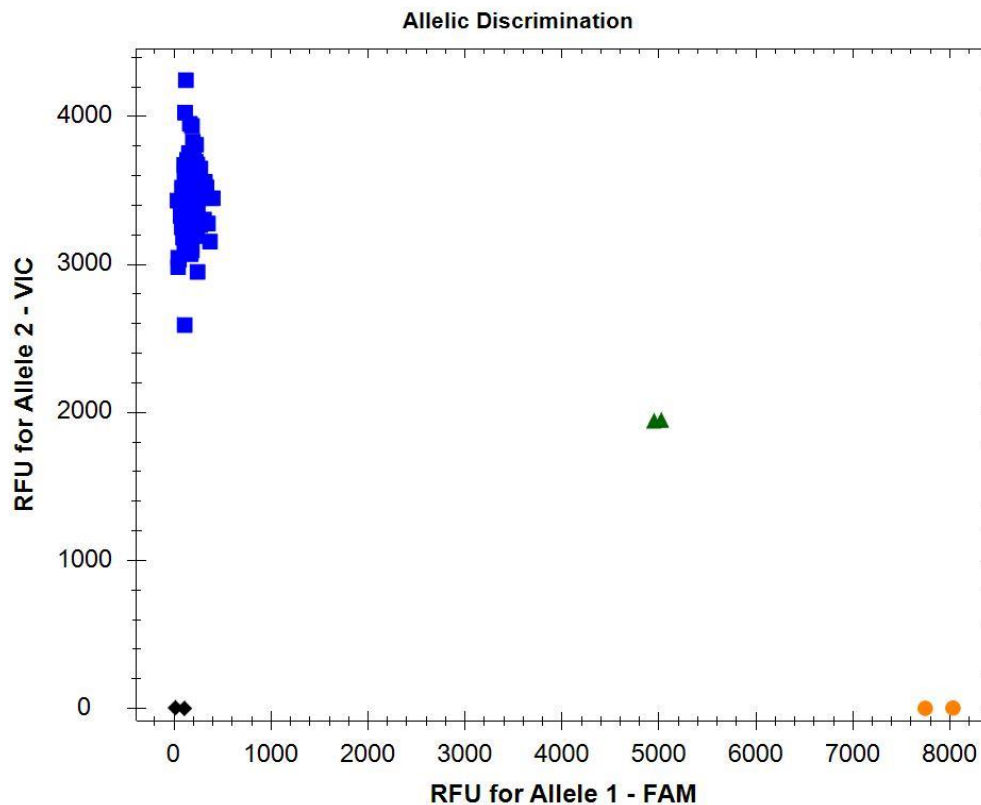
Roche GC-Rich PCR System -protokollan mukaan tehty gradientti-PCR *ETNK1*-näytteellä ei toiminut millään lämpötilalla, kuva 7. Voitiin siis päätellä, että alukkeet eivät toimi, ja päädyttiin suunnittelemaan uudet alukkeet eri sekvenssillä.



Kuva 7. PRA:ta sairastavalla suomenlapinkoiran näytteellä tehty gradientti-PCR. Geelillä ei ollut tuotteita millään lämpötilalla, joten voitiin päätellä, etteivät alukkeet toimi. Standardina käytettiin Generuler 1kb Plus DNA ladderia.

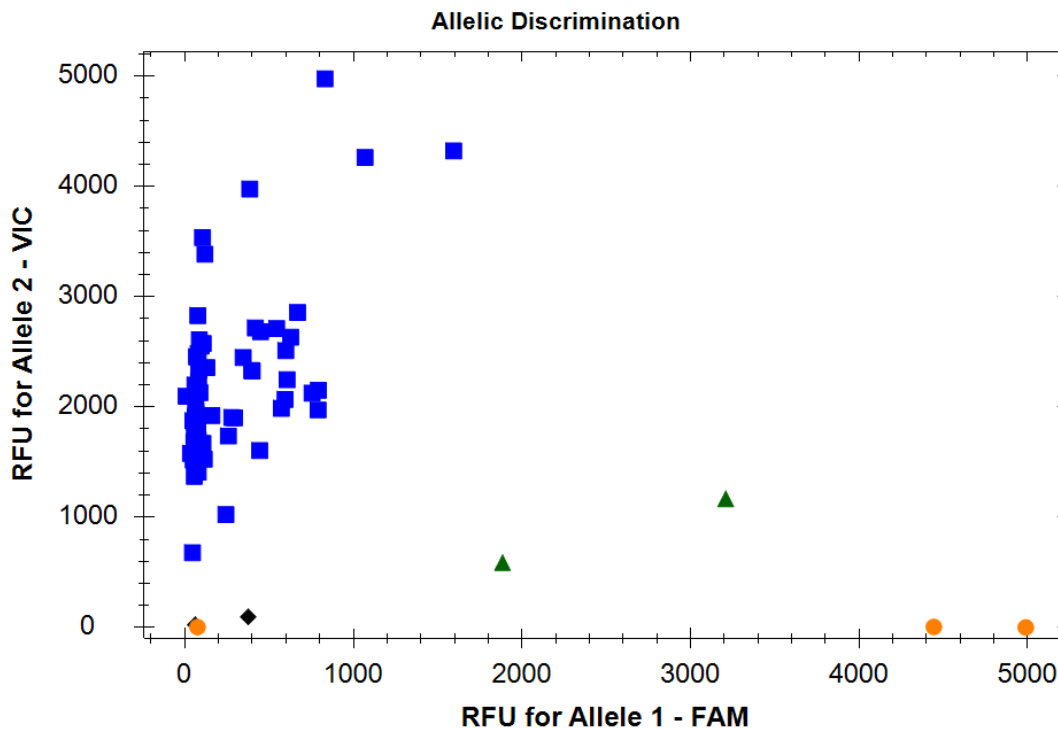
4.2 TaqMan-ajo *NR2E3*-geenivariantille

Näytteitä oli yhteensä 169, joten ajoja tehtiin kaksi 96-kuoppalevyille. Ajot olivat keskenään samanlaiset. Ensimmäisestä TaqMan-ajosta ei ilmennyt uusia koiria, joiden PRA selittyisi *NR2E3*-variantilla. Kuvassa 8 qPCR:n tulokset; kaikki testatut koirat edustivat villityyppiä variantin suhteen.



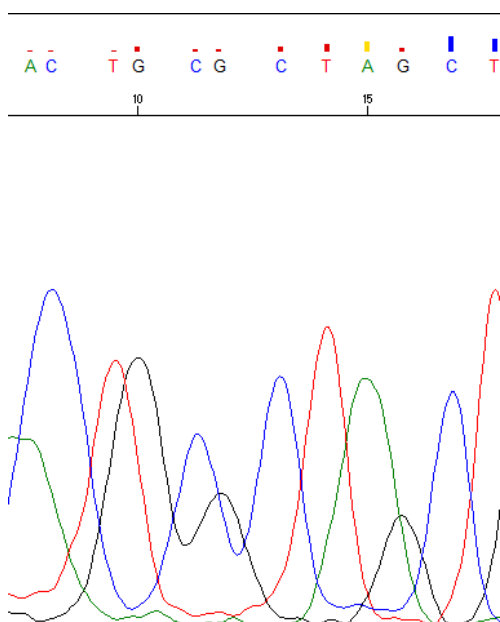
Kuva 8. TaqMan-ajon kuva, jossa oranssit ympyrät edustavat positiivikontrolleja (variantin suhteen sairaita), vihreät kolmiot kantajia, siniset neliöt villityyppiä ja mustat nelikulmiot negatiivikontrollia.

Toisessa ajossa pisteet olivat levinneet laajemmalle alueelle (kuva 9), kuin ensimmäisessä ajossa. Yksi testatuista koirista näytti olevan homotsygootti testattavan variantin suhteen. Näyte otettiin jatkotutkimuksiin sekvensoitavaksi FIMM:lle.



Kuva 9. TaqMan ajon kuva, jossa oranssit ympyrät edustavat positiivikontrolleja (sairaita), vihreät kolmiot kantajia, siniset neliöt villityyppiä ja mustat neliöt negatiivikontrolleja. Oranssi näyte vasemmalla on mahdollisesti homotsygootti yksilö, joka otettiin jatkotutkimuksiin.

Sekvenssi oli melko heikkolaatuinen, mutta tulkittavissa. Sekvensoinnin mukaan kyseessä oli variantin suhteen terve yksilö, joten kyseessä oli jonkinlainen virhe qPCR:ssä. Sekvensoinnin tulokset kromatogrammissa, kuva 10.



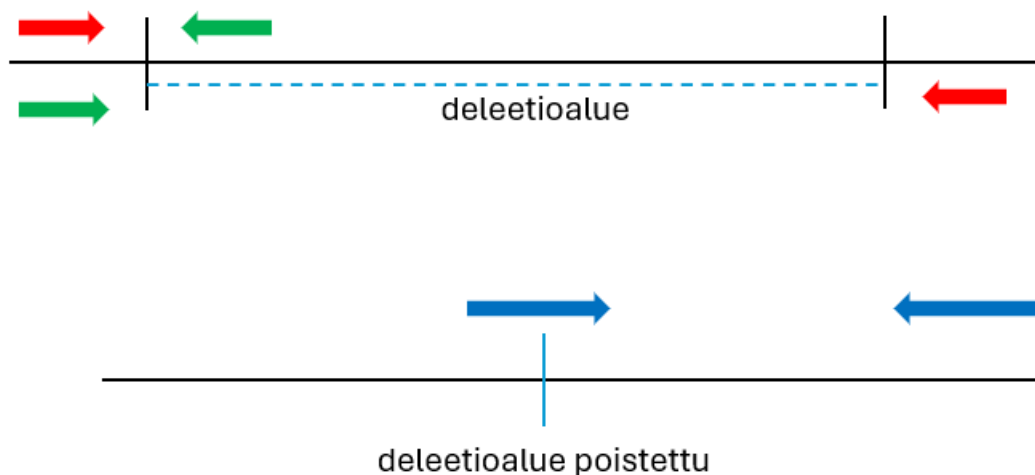
Kuva 10. Sekvensoinnin kromatogrammi, kyseessä oli *NR2E3* variantin suhteen villityyppi GC/GC.

5 Tulosten analysointi

Ensimmäinen PCR-ajo *ETNK1*-variantille Q5-kitillä ei onnistunut, sillä alukkeet sitoutuivat myös ei-toivotuissa kohdissa. Monistettava alue oli todella pitkä, yli 22 kb, minkä takia PCR oli haastava saada onnistumaan. Alueella esiintyi myös toistojaksoja ja siinä oli korkea GC-pitoisuus, mikä osaltaan hankaloitti PCR:ää. Gradientti-PCR Rochen GC-Rich-kitillä osoitti, etteivät koko alueen kattavat alukkeet toimineet. Yleisin syy miksi PCR ei toimi, on vääränlaiset alukkeet, jolloin ainoa ratkaisu on suunnitella uudet. Muita syitä miksi PCR ei toimi, voisivat olla esimerkiksi vahingoittuneet alukkeet tai näyte, vääränlaisen säilytyksen takia tai jatkuvasta sulatuksesta ja jäädytyksestä johtuen. Myös DNA-polymeraasi voisi olla heikentynyt samoista syistä. Deleetion kohdalla oli kuitenkin tiedossa, että kyseessä oli pitkä ja hankalasti monistettava alue, joten päädyttiin suunnittelemaan kokonaan toisenlaiset alukkeet eri sekvenssillä.

5.1 *ETNK1*-alukkeiden suunnittelu jatkotutkimuksia varten

Alukkeet olisi mahdollista suunnitella siten, ettei välttämättä tarvitse mennä koko alueen yli ja silti selvittää esimerkiksi kantajuus. Etenkin pitkän deleetion kohdalla tämä helpottaisi PCR:ää. Kuvassa 11 esitettynä alkuperäiset alukkeet ja uudet alukkeet, joilla kantajafrekvenssin tutkimista olisi mahdollista jatkaa.



Kuva 11. Ylempi viiva esittää sekvenssiä, joka sisältää deleetion. Punaiset nuolet osoittavat alkuperäisten toimimattomien alukeparien sijainnin. Vihreät nuolet osoittavat uuden alukeparin sijainnin juuri ennen deleetion alkukohtaa ja sen jälkeen. Alemman viivan siniset nuolet osoittavat toisen alukeparin kohdan, joka monistuu deleetiokohdan yli.

Uusien alukeparien avulla voitaisiin selvittää, onko kyseessä variantin *ETNK1* suhteen sairas yksilö, terve yksilö vai kantaja. Terveillä yksilöillä ei ole deleetiota, jolloin vihreiden nuolten mukaan tehdyt alukkeet monistuisivat deleetiota ennen ja jatkuisivat sen alkukohtaan yli. Tällöin geelillä näkyisi PCR:llä monistunut tuote. Niillä koirilla, joilla on variantti, tuotetta ei muodostu. Homotsygooteilla yksilöillä taas puolestaan on sekvenssissä deleetio, jolloin sinisten nuolten mukaan suunniteltu alukepari saisi PCR-tuotteen monistumaan suoraan deleetion yli. Kantaja saataisiin selville, mikäli geelille muodostuisi kaksi eri tuotetta. Kyseessä olisi silloin variantin suhteen heterotsygootti yksilö. Alukkeilla voitaisiin tutkia, löytyykö *ETNK1*-variantin aiheuttamaa PRA:ta muilta roduilta. Tutkimalla

kaikki Koirien geenitutkimusryhmän biopankin suomenlapinkoirat voitaisiin myös selvittää *ETNK1*-variantin kantajafrekvenssi.

5.2 Mahdollisia syitä *NR2E3*:n qPCR:ssä ilmenneeseen virheeseen

Tutkittavista koirista ei löytynyt yksilöitä, joiden PRA selittyisi *NR2E3*-variantilla, vaan ne edustivat variantin suhteen villityyppiä. Ainoastaan yksi tutkittavista koirista oli qPCR:n perusteella homotsygootti, mutta tarkemmat tutkimukset osoittivat tuloksen virheelliseksi. Homotsygootin yksilön signaalin sijainti qPCR-tuloksissa oli epälooginen. Signaalin olisi pitänyt sijaita oikeassa laidassa positiivikontrollien lähellä. Nyt signaali näkyi kuitenkin negatiivikontrollien vieressä. Kyseinen näyte aiheutti epäilyksen siitä, ettei kyseessä ole variantin suhteen sairas yksilö, vaan että näytteen kohdalla olisi tapahtunut jokin virhe. FIMM:in sekvensoinnin jälkeen vahvistui, että kyseessä ei ollut *NR2E3*-geenivariantin aiheuttama PRA, vaan yksilö oli variantin suhteen terve.

Virheellinen tulos qPCR:ssä olisi voinut johtua pipetointivirheestä. Kuitenkin jos esimerkiksi DNA olisi jäänyt pipetoimatta kokonaan, näytteen olisi pitänyt näkyä mustana negatiivikontrollia vastaavana signaalina. Yksi vaihtoehto olisi, että positiivikontrolleja pipetoidessa näytettä olisi mennyt myös kyseisen näytteen kaivoon. Tämä vaikuttaa epätodennäköiseltä, sillä kaivot sijaitsivat kaukana toisistaan. Positiivikontrollinäytteet pipetoitiin kuoppalevyn reunaan, toiseksi viimeisiin kaivoihin, kun taas virheellisesti sairaana näkynyt näyte sijaitsi kuoppalevyn keskellä. Mikäli positiivikontrollia olisi mennyt näytteen kaivoon, sen signaalin olisi pitänyt näkyä samassa paikassa positiivikontrollien kanssa. Toinen vaihtoehto on, että näytteessä olisi ollut kontaminaatio. Tämä ei todennäköisesti myöskään ole virheen aiheuttaja, sillä se olisi luultavasti tullut ilmi FIMMin sekvensoinnissa ja näkynyt kromatogrammissa. Kontaminaatio olisi voinut olla myös reagensseissa, mutta siinä tapauksessa virheen olisi pitänyt näkyä myös negatiivikontrolleissa, sillä kaikkiin näytteisiin käytettiin samaa mastermixiä.

qPCR suoritettiin protokollan mukaan ja kaikki muut näytteet toimivat kuten pitkän. On siis epätodennäköistä, että itse qPCR-ajossa olisi ollut ongelmia.

Virheen syy jäi selvittämättä, mutta FIMMin sekvensoinnin avulla voitiin varmistaa, ettei kyseessä ollut variantin suhteen sairastunut yksilö.

6 Yhteenveto

Tässä tutkimuksessa oli tarkoitus selvittää, esiintyykö karjalankarhukoirilta *NR2E3*-geenistä tai suomenlapinkoirilta *ETNK1*-geeneistä löytyneitä uusia variantteja muilta koiraroduilta. Tutkittavana oli 169 PRA:ta sairastavaa koiraa, joiden sairautta ei voitu selittää millään muulla jo tunnetulla geenivariantilla. Koirat edustivat 66:ta eri koirarotua.

Tutkimusten perusteella *NR2E3*-geenivarianttia ei esiintynyt muun rotuisilla PRA:ta sairastavilla koirilla. PRA:n aiheuttaa siis jokin muu vielä tuntematon geenivirhe. *ETNK1*-geenivariantin suhteen tutkimus jäi aikataulusyistä kesken. Tässä työssä on suunniteltu uudet alukkeet eri sekvenssillä, joilla tutkimuksia voidaan jatkaa.

Tutkittavat PRA:ta aiheuttavat variantit ovat olleet myös muiden tutkimusten perusteella rotuspesifisiä [19], mikä tukee tulosta: *NR2E3*-variantti esiintyy vain karjalankarhukoirilla. Geneettisiä syitä PRA:n aiheuttajiksi on todennäköisesti useita, sillä ihmisilläkin PRA:ta vastaavan sairauden, retinitis pigmentosan aiheuttajiksi on tähän mennessä löydetty lähes 70 eri geenivarianttia [17]. Tulosten perusteella voidaan päätellä, että *NR2E3*-variantti on mahdollisesti melko uusi variantti, sillä sitä on löydetty vain yhdeltä rodulta. Esimerkiksi toista etenevää verkkokalvon rappeumasairautta aiheuttavaa varianttia, *PRCD*:tä esiintyy noin 40 rodulla [28; 40], mikä antaa viitteitä siitä, että kyseinen variantti on vanhempi ja esiintynyt koirilla jo pitkään.

ETNK1-geenivariantin tutkimista sekä kantajafrekvenssin selvitystä jatketaan tutkimusryhmässä tässä työssä suunniteltujen alukemallien mukaisesti.

Lähteet

- 1 Koiran geenit. Verkkoaineisto. Lohen tutkimusryhmä/Helsingin yliopisto. <<https://www.koirangeenit.fi/>>. Luettu 13.3.2024.
- 2 Kääriäinen, Helena & Toivanen, Leena. 2023. Sairauksien periytyvyys. Verkkoaineisto. <<https://www.terveyskirjasto.fi/dlk00985>>. 9.2.2023. Luettu 19.3.2024.
- 3 Hanchard, Neil A. 2024. Autosomal resessive disorder. Verkkoaineisto. <<https://www.genome.gov/genetics-glossary/Autosomal-Recessive-Disorder>>. 18.3.2024. Luettu 19.3.2024.
- 4 Lindblad-Toh, Kerstin; Wade, Claire M.; Mikkelsen, Tarjei S.; Karlsson, Elinor K.; Jaffe, David B.; Kamal, Michael, Clamp, Michele; Chang, Jean L.; Kulbokas III, Edward J.; Zody, Michael C.; Mauceli, Evan, Xie, Xiaohui; Breen Matthew; Wayne, Robert K.; Ostrander, Elaine A.; Ponting, Chris P.; Galibert, Francis; Smith, Douglas R; deJong, Pieter J.; Kirkness, Ewen; Alvarez; Pablo; Biangi, Tara; Brockman, William; Butler, Jonathan; Chin, Chee-Wye; Cook, April; Cuff, James; Daly, Mark J.; DeCapiro, David; Gnerre, Sante; Grabherre, Manfred; Kellis, Manolis; Kleber, Michael; Bardeleben, Carlyne; Goodstadt, Leo; Heger, Andreas; Hitte, Christophe; Kim, Lisa; Koepfli, Klaus-Peter; Parker, Heidi G.; Pollinger, John P.; Searle, Stephen M.J.; Sutter, Nathan B.; Thomas, Rachel; Webber, Caleb & Lander, Eric S. 2005. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature* 438, s. 803–819.
- 5 Wayne, Robert K. & Ostrander, Elaine A. 2007. Lessons learned from the dog genome. Verkkoaineisto. <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168952507003058#section0020>>. Luettu 14.3.2024.
- 6 OMIA – Online Mendelian Inheritance in Animals. 2024. University of Sydney. <https://omia.org/results/?search_type=advanced&gb_species_id=9615&result_type=variant&defect=yes&singlelocus=yes&characterised=yes>. 28.3.2024. Luettu 28.3.2024.
- 7 Sankila, Eeva-Marja. 2007. Verkkokalvon perinnölliset rappeumat - geenien tunnistamisesta hoitoihin. Aikakauskirja Duodecim. <<https://www.duodecimlehti.fi/duo96850>>. Luettu 28.3.2024.
- 8 Vaquer, Guillaume; Dannerstedt, Frida R.; Mavris, Maria; Bignami, Fabrizia; Llinares-Garcia, Jordi; Westermarck, Kerstin & Sepodes, Bruno. 2013. Animal models for metabolic, neuromuscular and ophthalmological rare diseases. *Nature Reviews Drug Discovery* 2013;12(4):287–305.

- 9 Miyadera Keiko; Acland Gregory M. & Aguirre, Gustavo D. 2012. Genetic and phenotypic variations of inherited retinal diseases in dogs: the power of within- and across-breed studies. *Mamm Genome*. 2012 Feb; 23(1–2):40–61.
- 10 Leberin synnynnäinen amauroosi. 2019. Duodecim terveyskirjasto. <<https://www.terveyskirjasto.fi/orp01497>>. 4.11.2019 Luettu 29.3.2024.
- 11 Petersen-Jones, Simon M. & Komáromy, András M. 2015. Dog models for blinding inherited retinal dystrophies. *Hum Gene Ther Clin Dev*. 2015 Mar;26(1):15–26.
- 12 Den Hollander, Anneke I.; Roepman, Ronald; Koenekoop, Robert K. & Cremers, Frans P. M.; 2008. Leber congenital amaurosis: genes, proteins and disease mechanisms. *Prog Retin Eye Res* 2008; 27: 391–419.
- 13 Veske, A.; Nilsson S.E.; Narfström, K. & Gal, A. Retinal dystrophy of Swedish briard/briard-beagle dogs is due to a 4-bp deletion in RPE65. *Genomics* 1999; 57: 57–61.
- 14 Acland, Gregory M.; Aguirre, Gustavo D.; Ray, Jharna; Zhang, Qi; Aleman, Tomas S.; Cideciyan, Artun V.; Pearce-Kelling, Susan E.; Anand, Vibha; Zeng, Yong; Maguire, Albert M.; Jacobson, Samuel G.; Hauswirth, William W. & Bennett, Jean. 2001. Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness. *Nat Genet* 2001; 28: 92–95.
- 15 Gao, Jie; Hussain, Reham M. & Weng, Christina Y. 2020. Voretigene Neparvovec in Retinal Diseases: A Review of the Current Clinical Evidence. *Clin Ophthalmol*. Nov 13; 14: 3855–3869.
- 16 Retinitis pigmentosa. Verkkoaineisto. Duodecim terveyskirjasto. <<https://www.terveyskirjasto.fi/orp01798>>. 28.11.2019. Luettu 15.3.2024.
- 17 Daiger, Stephen P. 2024. Summaries of Genes and Loci Causing Retinal Diseases. Verkkoaineisto. Retnet. <<https://web.sph.uth.edu/RetNet/sum-dis.htm?csrt=11804138241067409817>>. Luettu 28.3.2024.
- 18 Daiger, S.; Sullivan, L. & Bowne, S. 2013. Genes and mutations causing retinitis pigmentosa. *Clin Genet* 2013;84(2):132–141.
- 19 Kaukonen, Maria; Pettinen, Inka-Tuulevi; Wickström, Kaisa; Arumilli, Meharji; Donner, Jonas; Juhola, Ida-Julia; Holopainen, Salla; Turunen, Joni A; Yoshihara, Masahito; Kere, Juha & Lohi, Hannes. 2021. A missense variant in IFT122 associated with a canine model of retinitis pigmentosa. *Hum Genet* 140, 1569–1579.

- 20 Kijas, James W.; Cideciyan, Artur V.; Aleman, Tomas S.; Pianta, Michael J.; Pearce-Kelling, Susan E.; Miller, Brian J.; Jacobson, Samuel G. & Aguirre, Gustavo D.; Acland Gregory M. 2002. Naturally occurring rhodopsin mutation in the dog causes retinal dysfunction and degeneration mimicking human dominant retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Apr 30;99(9):6328–33.
- 21 Dekomien, Gabriele; Vollrath, Conni; Petrasch-Parwez, Elisabeth; Boevé, Michale H.; Akkad, Denis A.; Gerding, Wanda M. & Epplen, Jörg T. 2010. Progressive retinal atrophy in Schapendoes dogs: mutation of the newly identified CCDC66 gene. *Neurogenetics*. May;11(2):163–74.
- 22 Downs, Louise M.; Wallin-Håkansson, Berit; Boursnell, Mike; Marklund, Stefan; Hedhammar, Åke; Truvé, Katarina; Hübinette, Louise; Lindblad-Toh, Kerstin; Bergström, Tomas & Mellersh, Cathryn S. 2011. A frameshift mutation in golden retriever dogs with progressive retinal atrophy endorses SLC4A3 as a candidate gene for human retinal degenerations. *PLoS One*. 2011;6(6).
- 23 Downs, Louise M.; Wallin-Håkansson, Berit; Bergström, Tomas & Mellersh, Cathryn S. 2014. A novel mutation in TTC8 is associated with progressive retinal atrophy in the golden retriever. *Canine Genet Epidemiol*. Apr 16; 1: 4.
- 24 Kaukonen, Maria; Quintero, Ileana B.; Mukarram, Abdul Kadir; Hytönen, Marjo K.; Holopainen, Saira; Wickström, Kaisa; Kyöstilä, Kaisa; Arumilli, Meharji; Jalomäki, Sari; Daub, Carsten O.; Kere, Juha & Lohi, Hannes; DoGA Consortium. 2020. A putative silencer variant in a spontaneous canine model of retinitis pigmentosa. *PLoS Genet*. Mar 9;16(3).
- 25 Winkler, Paige A.; Ramsey, Harrison D. & Petersen-Jones, Simon M. 2020. A novel mutation in PDE6B in Spanish Water Dogs with early-onset progressive retinal atrophy. *Vet Ophthalmol*. Sep;23(5):792–796.
- 26 Hitti-Malin, Rebekkah J.; Burmeister, Louise M.; Ricketts, Sally L.; Lewis, Thomas W.; Pettitt, Louise; Boursnell, Mike; Schofield, Ellen C; Sargan, David & Mellersh, Cathryn S. 2020. A LINE-1 insertion situated in the promoter of IMPG2 is associated with autosomal recessive progressive retinal atrophy in Lhasa Apso dogs. *BMC Genet*. Sep 7;21(1):100.
- 27 Murgiano, Leonardo; Becker, Doreen; Spector, Courtney; Carlin, Kendall; Santana, Evelyn; Niggel, Jessica K.; Jagannathan, Vidhya; Leeb, Tosso; Pearce-Kelling Sue; Aguirre, Gustavo D. & Miyadera, Keiko. 2020. CCDC66 frameshift variant associated with a new form of early-onset progressive retinal atrophy in Portuguese Water Dogs. *Sci Rep*. Dec 3;10(1):21162.

- 28 Zangerl, Barbara; Goldstein, Orly; Philp, Alisdair R.; Lindauer, Sarah J. P.; Pearce-Kelling, Susan E.; Mullins, Robert F.; Graphodatsky, Alexander S.; Ripoll, Daniel; Felix, Jeanette S.; Stone, Edwin M.; Acland, Gregory M. & Aguirre, Gustavo D. 2006. Identical mutation in a novel retinal gene causes progressive rod–cone degeneration in dogs and retinitis pigmentosa in humans. *Genomics*, Volume 88, Issue 5. s 551–563.
- 29 Beltran WA. 2009. The use of canine models of inherited retinal degeneration to test novel therapeutic approaches. *Vet Ophthalmol*. May-Jun;12(3):192–204.
- 30 Ahonen, Saija J. & Lohi, Hannes. 2014. Progressive Retinal Atrophy in the Karelian Bearddog; A Large Animal Model for Retinitis Pigmentosa. *Verkkoaineisto. ARVO Journals*. <<https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2268678>>. Luettu 4.4.2024.
- 31 Mahajan, Deepti & Votruba, Marcela. 2017. A novel NR2E3 gene mutation in autosomal recessive retinitis pigmentosa with cystic maculopathy. *Acta Ophthalmologica*. Volume 96. Issue 4. 2017. s. e535–e536.
- 32 NR2E3 nuclear receptor subfamily 2 group E member 3. [Homo sapiens (human)]. *Verkkoaineisto. National library of medicine*. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/10002>>. Luettu 9.4.2024.
- 33 NR2E3 nuclear receptor subfamily 2 group E member 3 [Canis lupus familiaris (dog)]. *Verkkoaineisto. National Library of Medicine*. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=Canis+lupus+familiaris+NR2E3>>. Luettu 9.4.2024.
- 34 Tavasoli, Mahtab; Lahire, Sarah; Reid, Taryn; Brodovsky, Maren & McMaster, Christopher R. 2020. Genetic diseases of the Kennedy pathways for membrane synthesis. *Journal of Biological Chemistry*. Volume 295. Issue 51. 2020. s. 17877–17886.
- 35 Gibellini, F. & Smith, T. K. 2010. The Kennedy pathway—De novo synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. *IUBMB Life*, 62, s. 414–428.
- 36 Shuai, Wen; Zuo, Zhuang; Li, Nianyi; Garces, Sofia; Jelloul, Fatima Zahra; Ok, Chi Young; Li, Shaoying; Xu, Jie; You, M. James; Wang, Wei; Rehder, Catherine; Jabbour, Elias J.; Patel, Keyur P.; Medeiros, L Jeffrey & Yin, C Cameron. 2023. ETNK1 mutation occurs in a wide spectrum of myeloid neoplasms and is not specific for atypical chronic myeloid leukemia. *Cancer*. 2023 Mar 15;129(6):878–889.

- 37 ETNK1 ethanolamine kinase 1 [Homo sapiens (human)]. Verkkoaineisto. National Library of Medicine. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/55500>>. Luettu 9.4.2024.
- 38 ETNK1 ethanolamine kinase 1 [Canis lupus familiaris (dog)]. Verkkoaineisto. National Library of Medicine. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=Canis+lupus+familiaris+ETNK1>>. Luettu 9.4.2024.
- 39 ETNK1 Gene - Ethanolamine Kinase 1. Verkkoaineisto. Genecards. The human Gene Database. <<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ETNK1#orthologs>>. Luettu 10.4.2024.
- 40 OMIA – Online Mendelian Inheritance in Animals. 2024. University of Sydney. <<https://omia.org/OMIA001298/9615/>>. Luettu 23.4.2024.

Tutkittavat koirarodut

australiankarjakoira	espanjanvesikoira	norfolkinterrieri
amerikankarvatonterrieri	harmaanorjanhirkko	papillon
alaskanmalamuutti	irlanninterrieri	phalène
australianpaimenkoira	irlanninsetteri	picardienpaimenkoira
airedalenterrieri	islanninlammaskoira	perunkarvatonkoira
australiankelpie	jämtlanninpystykorva	mäyräkoira pitkäkarvainen
barbet	kiinanharjakoira	mäyräkoira, kääpiö, lk*
basenji	mäyräkoira, kk**	pomeranian
bordercollie	kiharakarvainen noutaja	polski owczarek niziny
havannankoira	villakoira, keskikokoinen	portugalinpodengo
bolognese	kultainen noutaja	portugalinvesikoira
belgianpaimenkoira, laekenois	kromfohländer	staffordshiren bullterrieri
belgianpaimenkoira, tervueren	kääpiösnautseri	schipperke
coton de tuléar	kleinspitz	siperianhusky
chihuahua	lagotto romagnolo	shetlanninlammaskoira
cockerspanieli	labradorinnoutaja	saksanmetsästysterrieri
collie, pitkäkarvainen	länsigöötanmaanpystykorva	sarloos wolfhond
cairninterrieri	mäyräkoira, lyhytkarvainen	tiibetinmastiffi
dreeveri	löwchen	tiibetinspanieli
englanninkääpiöterrieri	lapinporokoira	vanhanenglanninlammaskoira
englanninsetteri	mittelspitz	valkoinenpaimenkoira
englanninspringerspanieli	novascotiannoutaja	walesinterrieri

*lk = lyhytkarvainen, **kk = karkeakarvainen