

## **Molekulargenetische Aufklärung der Hüftgelenkdysplasie beim Deutschen Schäferhund**

Prof. Dr. Ottmar Distl, Dr. Kathrin Friederike Stock, Dr. Yvonne Marschall

Institut für Tierzucht und Vererbungsforschung

Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

Bünteweg 17p

30559 Hannover

Korrespondenz:

Prof. Dr. O. Distl

Tel.: 0511-953-8875

FAX: 0511-953-8582

E-mail: ottmar.distl@tiho-hannover.de

### **Hüftgelenkdysplasie beim Hund**

Die Hüftgelenkdysplasie (HD) gehört zu den wichtigsten Skeletterkrankungen bei sehr vielen Hunderassen. Nur ganz wenige Rassen sind davon selten betroffen. Kennzeichen der HD sind eine Inkongruenz zwischen der Gelenkpfanne der Hüfte (Acetabulum) und dem Kopf des Oberschenkels (Femurkopf) sowie eine Lockerung der Bänder im Hüftgelenk. Die Folgen sind degenerative Um- und Abbauprozesse im Hüftgelenk beim noch wachsenden oder gerade erst erwachsenen Hund. Besonders bei größeren und schnell wachsenden Rassen besteht eine hohe genetische Disposition zur HD. Die Diagnose der HD wird anhand der röntgenologisch erkennbaren strukturellen Veränderungen des Hüftgelenks (Gelenkinkongruenz, Deformationen von Hüftpfanne und Oberschenkelkopf) gestellt. Nach wie vor bereitet die systematische Bekämpfung der HD erhebliche Schwierigkeiten.

### **Vererbung der Hüftgelenkdysplasie**

Bei der HD des Hundes kann von einem multifaktoriellen Erbgang unter Beteiligung von Einzelgenen und Heritabilitäten vorwiegend im Bereich von  $h^2 = 0,20$  bis  $0,40$  ausgegangen werden. Bei einer multifaktoriellen Vererbung spielen umweltbedingte Ursachen und genetische Faktoren eine Rolle bei der Ausprägung der HD. Für die genetischen Faktoren sind sowohl eine geringe Zahl von Genen mit großer Wirkung auf die Ausprägung der HD als auch eine größere Anzahl von Genen mit geringer bis sehr geringer Wirkung bedeutsam. Somit entsteht die genetisch bedingte Veranlagung zu HD sowohl durch das

Zusammenwirken einer bestimmten Anzahl von Genen mit geringer Wirkung und von einzelnen Genen mit einem durchschlagenden Effekt. In neueren Untersuchungen mit Tiermodellen konnte zwischen dem additiv-genetischen Effekt des Tieres sowie den permanenten Umwelteffekten des Zwingers, der Mutter und des Wurfes differenziert werden, während in älteren Untersuchungen die genetischen Komponenten teilweise mit Zwinger- und Wurfeffekten vermischt waren. So betrug die durch den Wurfeffekt erklärte Varianz nur zwischen 3 und 5% der phänotypischen Varianz und war damit deutlich kleiner als die additiv-genetische Varianz. Alle weiteren systematischen Effekte wie Geschlecht des Hundes, Alter beim Röntgen, Röntgentierarzt, Wurfgröße, Prozentsatz der geröntgten Hunde pro Wurf, männliche und weibliche Gründertiere erklärten ebenfalls nur einen sehr geringen Anteil der Varianz, so dass nach den neueren Untersuchungsergebnissen den genetischen Faktoren die größte Bedeutung an der Ausprägung der HD zu kommt.

Mittels Erbgangsanalysen konnte beim Deutschen Schäferhund erstmals das Vorkommen eines dominanten Hauptgens neben weiteren polygenen Komponenten für HD nachgewiesen werden. Das bedeutet, dass es bereits mit statistischen Methoden möglich ist, ein Gen mit einer großen Wirkung auf das Entstehen von HD zu identifizieren. Somit ist das früher angenommene Vererbungsmodell, das von einer unendlich großen Anzahl von Genen mit äußerst geringen Effekten des einzelnen Gens ausging, zu revidieren. Beobachtungen aus der Praxis zeigen öfters ein Aufspalten eines Wurfes in HD freie Tiere und bis zu leicht oder sogar schwer HD belasteten Tieren. Dieses Phänomen kann mit einer dominanten Hauptgenwirkung wesentlich besser erklärt werden als mit dem polygenen Vererbungsmodell. Zugleich bestehen damit wesentlich verbesserte Möglichkeiten über molekulargenetische Ansätze bedeutsame Gene (Hauptgenorte mit großem Einfluss auf die Merkmalsausprägung, Quantitative Trait Loci = QTL) für HD in Familien zu identifizieren.

### **Genomscan für Hüftgelenkdysplasie**

Für den Hund ist die Erbsubstanz (DNA) in ihrer Abfolge weitgehend bekannt und über Datenbanken öffentlich zugänglich. Die gesamte Erbsubstanz umfasst beim Hund ca. 2.700 Mio. Basenbausteine. Weiterhin steht eine sehr große Anzahl von Markern zur Verfügung, mit denen die genetischen Ursachen erblicher Krankheiten aufgeklärt werden können. Somit stehen ausreichend große und informative Markersets für das Auffinden von QTL für HD beim Hund zur Verfügung.

Für die genetische Aufklärung der HD beim Deutschen Schäferhund wurden 11 väterliche Halbgeschwisterfamilien verwendet. Für alle väterlichen Halbgeschwister, deren Väter und

Mütter standen die HD-Befunde sowie EDTA-Blutproben zur Verfügung. Das Familienmaterial umfasste einschließlich der Väter und Mütter insgesamt 459 Hunde. Diese Tiere stammten aus den Geburtsjahrgängen von 1985 bis 2003. Eine Übersicht über die 11 Familien gibt Tab. 1. Dieses weltweit einmalige Material wurde aus dem HD-Datenbestand des Vereins für Deutsche Schäferhunde (SV) zusammengestellt.

Für diese Familien wurden 261 hochinformativ Marker (Mikrosatelliten) genotypisiert. Diese hochpolymorphen Mikrosatelliten wurden aus den bereits publizierten Markersets für den Hund so ausgewählt, dass sie das gesamte Genom möglichst gleichmäßig abdecken. Für die Abdeckung des Genoms wurde eine mittlere Markerdichte von einem Marker pro 12 cM (entspricht etwa 12 Mio. Basenbausteinen) erreicht und der weitestmögliche Abstand eines Genes für HD beträgt dann im Mittel für flankierende Marker etwa 6 cM. Mit dieser Information ist es dann möglich, die Genombereiche (QTL) zu identifizieren, in denen die für HD verantwortlichen Gene liegen. Bei dem gewählten Stichprobenumfang sollten dann QTL für HD mit einem Vertrauensintervall von 5 bis 10 cM identifiziert werden können. Das von uns verwendete Markerset war so informativ, dass das gesamte Genom mit einer hohen Genauigkeit auf mit HD gekoppelte Genombereiche abgefragt werden konnte. Die anschließenden Auswertungen ergaben insgesamt 19 verschiedene Genomregionen, in denen mit hoher Wahrscheinlichkeit Gene mit Einfluss auf das Auftreten von HD liegen. Eine Übersicht über die Lokalisation der Genombereiche für die HD beim Deutschen Schäferhund zeigt Abb. 1. Die besonders bedeutsamen QTL mit Genen für die HD des Schäferhundes liegen auf den Chromosomen 1, 3, 4, 8, 9, 16, 19, 26 und 33. Diese Bereiche konnten auf eine Größe von im Mittel 5 Mb (5 Mio. Basenbausteine) eingegrenzt werden und sind damit deutlich kleiner als wir erwartet haben. Dadurch sind wir jetzt in der Lage, diese wichtigen Genombereiche für HD nach Mutationen (Veränderungen in der Erbsubstanz, die weitervererbt werden) zu durchsuchen, die eine signifikante Beziehung (Assoziation) zur HD aufweisen.

### **Genomische Zuchtwerte für HD**

Die Kenntnis der QTL für HD eröffnet die Möglichkeit, diese Genombereiche weiter molekulargenetisch aufzuklären und in diesen eng umgrenzten Bereichen für die Zuchtpraxis brauchbare Marker für die HD zu entwickeln. Eine wesentliche Hilfe sind hier die zahlreich im Genom vorkommenden Mutationen, die nur einen einzigen Basenbaustein betreffen und deshalb „Single Nucleotide Polymorphisms“ (SNPs, Einzelbasenaustausche) genannt werden. Diese SNPs kommen im Mittel alle 1000 Basenbausteine vor. Beim Hund wurden im Rahmen

der Genomaufklärung mehr als 1 Million solcher SNPs gefunden. Diese SNPs sind über Datenbanken zugänglich. Da die meisten SNPs nur zwei Varianten (Allele) aufweisen, gibt es demzufolge dann nur drei verschiedene Genotypen für den jeweiligen SNP. Allerdings sind diese Untersuchungen sehr aufwendig und teuer, da auch in einem engen Genombereich von ca. 5 Mb eine hohe Anzahl von Genen lokalisiert ist und bei diesen 30-50 potenziellen Kandidaten solche Mutationen gefunden werden müssen, die mit dem jeweiligen kausalen Gen in enger Beziehung stehen. Diese Untersuchungen werden an umfangreichen Stichproben, die repräsentativ für die jeweilige Population sind, durchgeführt. Mit Hilfe dieser sehr eng zu einem kausalen Gen gekoppelten Markern können dann Selektionsverfahren auf der Basis von „genomischen Zuchtwerten“ für die Zuchtpraxis entwickelt werden. Mit diesen genomischen Zuchtwerten kann die bisherige Zuchtwertschätzung oder Selektion auf der Basis von Phänotypinformationen deutlich verbessert werden. Zum einen kann der genomische Zuchtwert wesentlich präziser geschätzt werden, da mögliche Effekte durch Vorselektion zum Röntgen ausgeschaltet werden. Zum anderen ist es möglich, bereits bei den Welpen den genomischen Zuchtwert für die HD zu bestimmen. Nachdem die mit den jeweiligen kausalen Genen enggekoppelten Markerinformationen vorliegen und an der jeweiligen Population verifiziert wurden, wird für die Bestimmung des genomischen Zuchtwertes lediglich eine EDTA-Blutprobe benötigt.

Für die Entwicklung der genomischen Zuchtwerte für HD haben wir eine sehr große Anzahl von SNPs aus den Genombereichen der QTL entwickelt. Wir haben für dieses Projekt ca. 240.000 Basenbausteine für jeweils 24 bis 48 Hunde sequenziert, um geeignete SNPs für die HD zu finden. Am Ende erwiesen sich etwas mehr als 110 SNPs als informativ für die HD beim Deutschen Schäferhund. Da wir möglichst im kausalen Gen liegende SNPs in den genomischen Zuchtwert aufnehmen wollten, wurden letztendlich nur 17 SNPs in 11 verschiedenen QTL ausgewählt. Diese 17 SNPs sind sehr zuverlässig für ihre Aussagekraft bezüglich HD beim Deutschen Schäferhund. Diese 17 SNPs wurden an ca. 800 Hunden, die für die aktuelle Population der Deutschen Schäferhunde repräsentativ sind, verifiziert. Diese Marker eignen sich für die Schätzung von genomischen Zuchtwerten für die HD, da sie unabhängig von weiteren Informationen von verwandten Tieren eine enge Beziehung zur HD aufweisen und demnach mit den jeweils kausalen Genen in enger Kopplungsbeziehung stehen. Mittels dieser HD-Marker haben wir bereits genomische Zuchtwerte für den Deutschen Schäferhund entwickelt, die bei Welpen Vorhersagen zum Auftreten der HD im späteren Leben erlauben und die Anpaarungsplanung für die Eltern verbessern. Dazu haben wir Referenzkurven für den Zusammenhang zwischen den genomischen Zuchtwerten, die aus

den individuellen Genotypen der Hunde abgeleitet werden, und dem Risiko für HD erstellt (Abb. 2). Für den Welpen kann anhand dieser Kurven das durch den individuellen Genotyp bedingte Risiko für HD auf einer Skala von -0,5 bis 0,5 bewertet werden. Für die spätere Zucht sagt der genomische Zuchtwert aus, wieviele mit HD assoziierte Genvarianten (Allele) der Hund trägt und weitervererben kann. Die genomischen Zuchtwerte können damit für die Anpaarungsplanung verwendet werden, um das mittlere Risiko für die Nachkommen wie auch den best- und schlechtestmöglichen Fall berechnen zu können. Mit einem entsprechenden Paarungspartner kann die Anzahl der mit HD-assoziierten Genvarianten (Allele) deutlich vermindert werden. Wir konnten auch zeigen, dass der genomische Zuchtwert für das HD-Risiko ansteigt, wenn die Anzahl HD-assoziiertes Genvarianten pro Tier zunimmt (Abb. 3).

#### Unterschiede zwischen HD-Graden

Unsere Untersuchungen zeigten sehr eindeutig, dass es in den Genwirkungen keine Unterschiede zwischen den einzelnen HD-Graden gibt (Abb. 4). Werden die Verteilungen der genomischen Zuchtwerte nach HD-Graden getrennt dargestellt, so differenzieren sich die Verteilungen der genomischen Zuchtwerte zwischen den HD-Graden C (leichte HD) bis E (schwere HD) nicht mehr. Über statistische Berechnungen wurde dies ebenfalls nachgewiesen. Hier zeigte sich, dass nur ein geringer zusätzlicher Varianzanteil durch die Tiere mit mittlerer HD (HD-Grad D) und/oder schwerer (HD-Grad E) HD erklärt werden konnte. Hunde mit der HD-Übergangsform (HD-B) wurden nicht die Erstellung der genomischen Referenzkurve miteinbezogen, da hier keine klare Trennung zwischen HD-frei und von HD-betroffen vorliegt. Für diese Hunde erfolgt die Bewertung anhand der genomischen Referenzwerte der HD-freien und eindeutig HD-betroffenen Tiere. Somit schafft das genomische Verfahren hier eine klare Trennung für HD-Disposition und HD-Freiheit, was bisher nicht möglich war.

#### Vorhersagegenauigkeit für zukünftige Welpen und neugeborene Welpen

Mit welcher Genauigkeit der HD-Befund eines Tieres anhand seines genomischen Zuchtwertes vorhergesagt werden kann, lässt sich mit statistischen Verfahren ermitteln. Für die bisher entwickelten 17 SNPs kann eine Zuverlässigkeit von 35% und damit eine Genauigkeit von 0,59 erreicht werden (Tab. 2). Im Vergleich dazu beträgt die Heritabilität für HD beim Deutschen Schäferhund 25%. Diese Heritabilität von 25% besagt, dass mit einer Zuverlässigkeit von 25% auf den genetisch bedingten Anteil der HD geschlossen werden

kann, sofern der phänotypische Merkmalswert bekannt ist. Beim genomischen Zuchtwert wird der phänotypische Merkmalswert nicht mehr benötigt, vielmehr wird hier anhand des aus den SNPs abgeleiteten genomischen Zuchtwertes auf den zukünftigen Merkmalswert der HD des jeweiligen Hundes geschlossen. Bei einem Vergleich der Vorhersagegenauigkeit für den späteren HD-Befund des Hundes war die Überlegenheit der genomischen Selektion über das konventionelle Zuchtwertschätzverfahren sehr deutlich zu sehen. Bei der konventionellen Zuchtwertschätzung können Zuverlässigkeiten für die Vorhersage in einem Bereich von 3 bis maximal 15% für zukünftige Tiere, für die noch keine HD-Befunde vorliegen, erreicht werden. Diese Werte haben wir nach Analyse mehrerer Datensätze von verschiedenen Rassen nachgewiesen. Aus diesen Analysen ergibt sich somit, dass die konventionelle Zuchtwertschätzung nur geringe Erfolgchancen in einem Zuchtprogramm bietet und von der genomischen Selektion möglichst schnell abgelöst werden sollte.

Die Robustheit der HD-Befunde haben wir mehrfach überprüft. So konnten wir an mehreren unabhängigen Datenmaterialien zeigen, dass wir identische Ergebnisse für die genomischen Zuchtwerte erhielten, unabhängig von der Auswahl unterschiedlicher Stichproben von Hunden. Weiterhin waren alle Ergebnisse der Kopplungsanalyse mittels der Assoziationsanalysen anhand der SNPs wiederholbar. Für die Kopplungsanalyse wurden 11 väterliche Halbgeschwisterfamilien verwendet, während für die Entwicklung der genomischen Zuchtwerte eine Stichprobe von Hunden aus der gesamten Population gezogen wurde, die möglichst geringe Verwandtschaftsgrade aufwies. An früheren Analysen konnte bereits gezeigt werden, dass der Einfluss des Röntgentierarztes sehr gering ist und die Zwischen-Beurteiler Varianz gegen Null geht.

Das von uns entwickelte Verfahren ist nicht mehr abhängig von der Anzahl der geröntgten Nachkommen und der zum Röntgen ausgewählten Tiere. Daraus ergibt sich ein weiterer wichtiger Gesichtspunkt. Der genomische Zuchtwert für HD hat bei allen Tieren die gleiche Genauigkeit und kann sofort nach der Geburt bestimmt werden, da sich der genomische Zuchtwert direkt aus den HD-assoziierten Genvarianten ergibt. Dieses Verfahren stellt einen Quantensprung in der HD-Bekämpfung dar. Aus diesen Gründen wurde dieses Verfahren zum Patent angemeldet.

Die genomische Aufklärung der HD beim Deutschen Schäferhund ist ein wesentlicher Schritt zur Vereinfachung der Bekämpfung der HD und eröffnet auch die Perspektive, die Häufigkeit dieser Gelenkerkrankung in kürzerer Zeit, als dies bisher jemals möglich war, deutlich zu vermindern. Weiterhin können diese Erkenntnisse beim Deutschen Schäferhund auf ihre Übertragbarkeit und Gültigkeit für andere Rassen mit nicht allzu großem Aufwand überprüft

werden, wenn die erforderlichen Daten und Blutproben zur Verfügung gestellt werden. Hierfür werden zunächst ca. 200 bis 500 Hunde mit Pedigree, HD-Befunden und Blutproben benötigt. Pro Hund sollten 3-5 ml EDTA-Blut zur Verfügung gestellt werden. Die Auswahl der Tiere erfolgt aufgrund der Pedigrees und sollte möglichst repräsentativ für die jeweilige Rasse bzw. Population sein. Diese Stichprobe sollte ca. 50 % HD-freie und ca. 50 % Hunde mit leichter bis schwerer HD umfassen. Die erfolgreichen Arbeiten beim Deutschen Schäferhund machen es den anderen Rassen auch wesentlich leichter, ein derartiges genomisches HD-Bekämpfungsverfahren zu entwickeln, da sie auf einem bewährten Modell aufbauen und diese Vorkenntnisse auch für ihre Rasse einsetzen können.

### **Literatur**

Hamann H, Kirchhoff T, Distl O. 2003: Bayesian analysis of heritability of canine hip dysplasia in German shepherd dogs. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 120, 258-268.

Janutta V, Hamann H, Distl O. 2006: Complex segregation analysis of hip dysplasia in German shepherd dogs. *Journal of Heredity* 97, 13-20.

Marschall Y, Distl O. 2007: Mapping quantitative trait loci for canine hip dysplasia in German shepherd dogs. *Mammalian Genome* 18, 861-870.

### **Danksagung**

An dieser Stelle danken wir der Gesellschaft zur Förderung kynologischer Forschung e.V. (GKF), Bonn, und dem Verein für Deutsche Schäferhunde (SV), Augsburg, sehr herzlich für die Unterstützung unserer Forschungsarbeiten und hoffen, dass wir mit den hier vorgelegten Ergebnissen unserer Arbeit die Hundezucht unterstützen können.

Tabelle 1. Familienstruktur der untersuchten Hunde im HD-Projekt des Deutschen Schäferhundes

Familie	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Gesamt
Anzahl Nachkommen	15	21	18	23	24	54	30	28	24	23	25	285
Männliche Nachkommen	5	7	9	10	6	29	12	11	15	9	10	123
Weibliche Nachkommen	10	14	9	13	18	25	18	17	9	14	15	162
Anzahl Mütter	13	13	15	16	11	30	11	15	13	13	13	163
Nachkommen frei von HD (%)	6,7	23,8	38,9	21,7	37,5	20,4	40,0	39,3	41,7	21,7	36,0	29,8
Nachkommen mit HD-Übergangsform (%)	20,0	23,8	27,8	21,7	16,7	18,5	16,7	17,9	8,3	30,4	8,0	18,6
Nachkommen mit leichter HD (%)	66,7	47,6	27,8	39,1	37,5	55,5	43,3	42,9	41,7	34,8	44,0	44,6
Nachkommen mit mittlerer HD (%)	6,7	4,8	0	17,4	8,3	5,6	0	0	8,3	13,0	12,0	6,7
Nachkommen mit schwerer HD (%)	0	0	5,6	0	0	0	0	0	0	0	0	0,4



Tabelle 2. Zuverlässigkeit der genomischen HD-Zuchtwerte, ermittelt anhand der erklärten Varianz durch die genomischen HD-Zuchtwerte an der gesamten phänotypischen Varianz der HD

Genomischer HD-Zuchtwert	Anteil erklärter Varianz	
	additive Effekte	additive und Dominanzeffekte
alle HD-Befunde (C bis E)	33%	35%
nur Tiere mit HD-C (leichte HD)	30%	31%
nur Tiere mit HD-D (mittlere HD)	25%	26%
nur Tiere HD-D/E	28%	28%

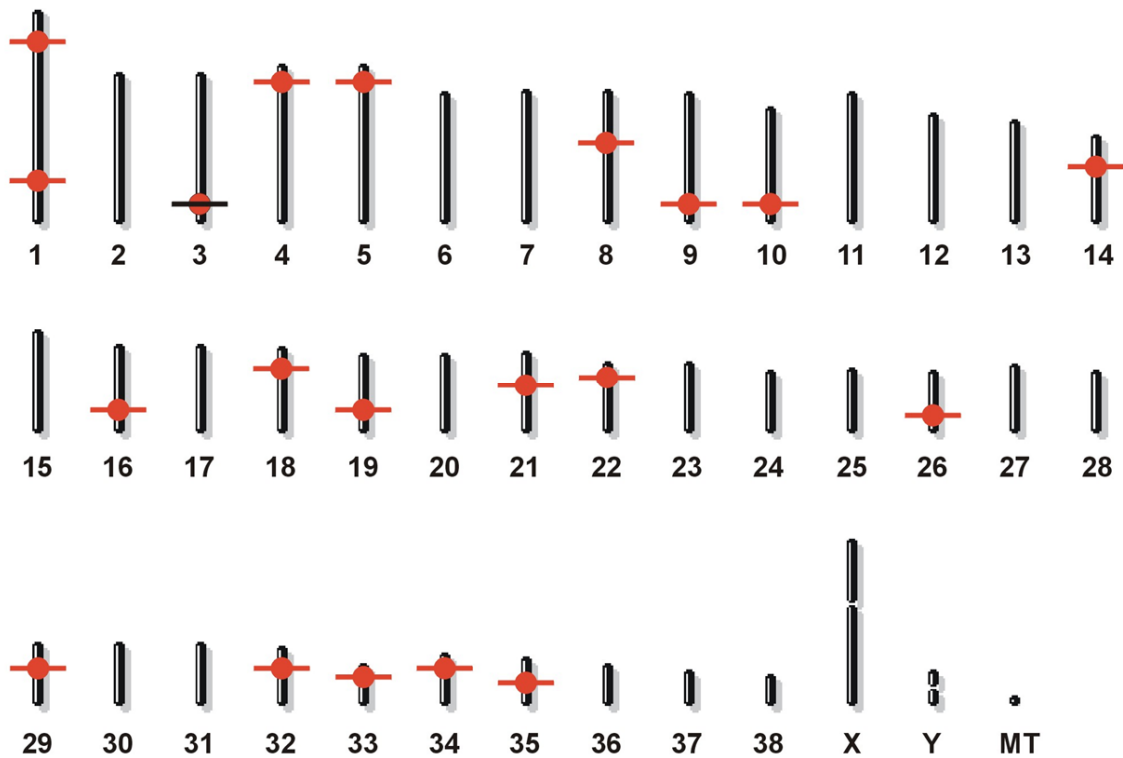


Abb. 1: Verteilung der QTL für HD beim Deutschen Schäferhund auf dem Hundegenom

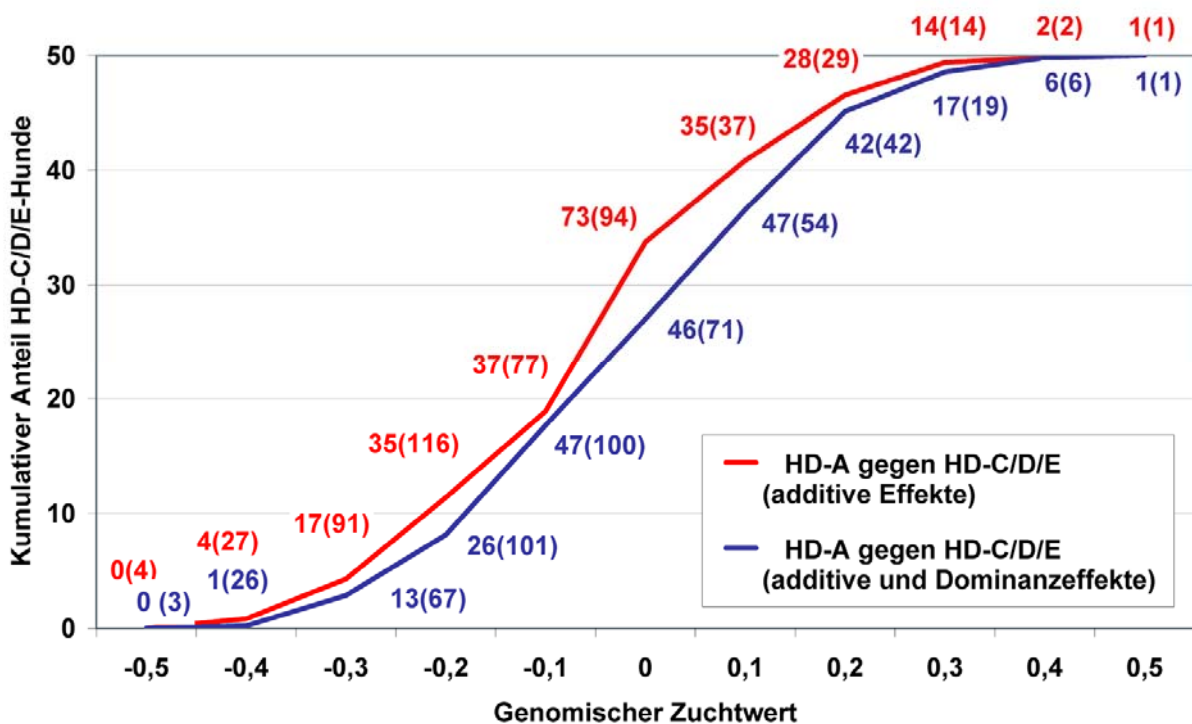


Abb. 2: Zusammenhang zwischen der Höhe der genomischen Zuchtwerte (Skala von -0,5 bis 0,5) und dem Auftreten von HD (leichte bis schwere HD, HD-C bis HD-E). Die Auswertung umfasste genau 50% von HD-C bis HD-E betroffene Hunde, weswegen der maximale kumulative Anteil von HD betroffenen Hunden 50% beträgt.

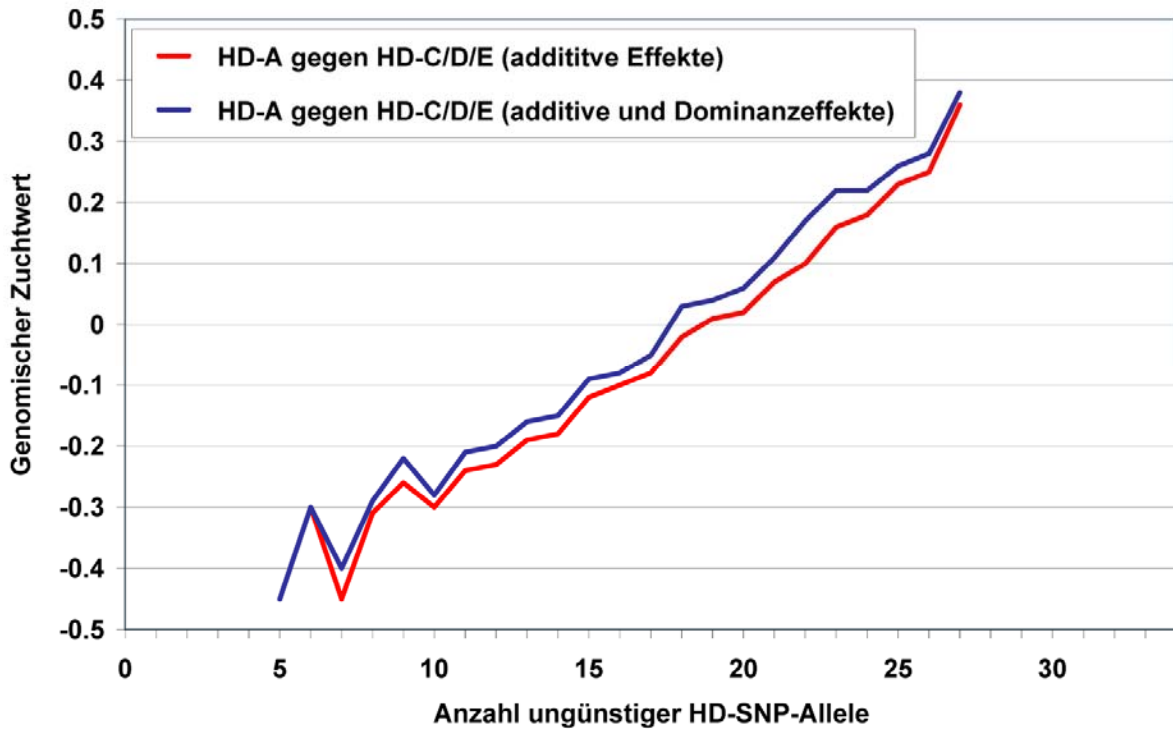


Abb. 3: Zusammenhang zwischen der Anzahl der pro Tier mit HD assoziierten Genvarianten (Allele) und der Höhe der genomischen Zuchtwerte auf einer Skala von -0,5 bis 0,5.

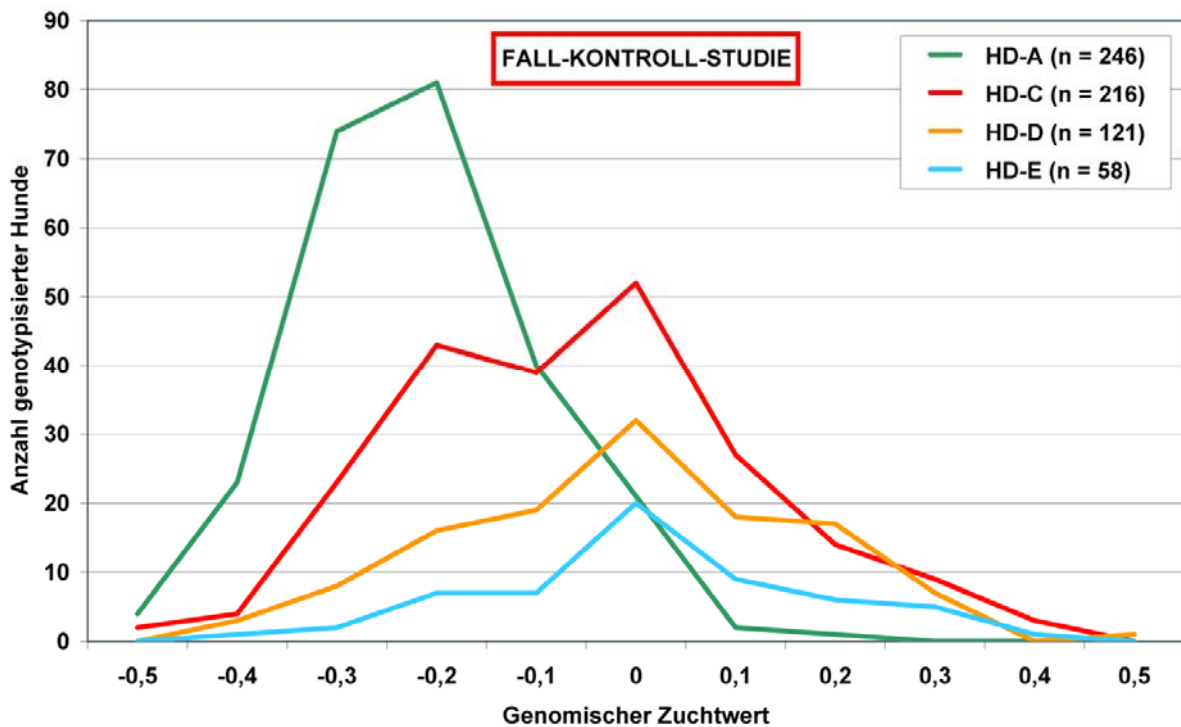


Abb. 4: Verteilung der genomischen HD-Zuchtwerte nach der phänotypischen Ausprägung der HD