

## **Molekulargenetische Untersuchungen und Ermittlung von Zuchtwerten zur idiopathischen Epilepsie beim Border Collie in Deutschland**

Gitte Anders

Dies ist der Titel einer Forschungsarbeit, die sich aus den Reihen der ABCD e.V. heraus gebildet hat und deren Grundlage die sehr gut dokumentierten Daten unseres Zuchtbuches sind.

An der Forschung beteiligt sind Gitte Anders als betreuende Tierärztin, Prof. Dr. Dr. habil Gerald Reiner für den Bereich Tierzucht und Genetik und PD Dr. Martin Schmidt als Neurologe, die beide im Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität in Gießen lehren und forschen. Zusätzlich sind noch Dr. Viola Hebler als Kontakt zur ISDS und Doris Brand als Computerfachfrau und durch Bereitstellung ihrer ISDS-Zuchtbücher maßgeblich beteiligt.

Warum Epilepsie?

Als eine der am stärksten von der idiopathischen Epilepsie betroffenen Rassen leidet der Border Collie häufig an einer therapieresistenten Form, die mit nur kurzer Überlebenszeit einhergeht. Die Erbllichkeit von Epilepsie beim Border Collie konnte bereits nachgewiesen werden (Hülsmeier, 2009). Der aktuelle Stand der Forschung geht von einem komplexen, polygenetisch multifaktoriellen Erbgang aus (Hülsmeier 2009, Neff 2014). Aus statistischen Auswertungen von Neurologen geht hervor, dass bei ca. 90 % der von ihnen ausdiagnostizierten Hunde die Ausschlussdiagnose erbliche Epilepsie gestellt wird.

Die Forschungsarbeit besteht aus 2 verschiedenen Teilen:

- 1) Zuchtwertschätzung
- 2) molekulargenetische Untersuchungen

Wie funktioniert Vererbung?

Dies ist eine kleine Wiederholung des Artikels "Grundlagen angewandter Genetik für die Hundezucht" von Dr. Viola Hebler, der sich auf der ABCD-Homepage unter dem Bereich "Zucht" finden lässt und dessen Lektüre jedem noch mal ans Herz gelegt wird.

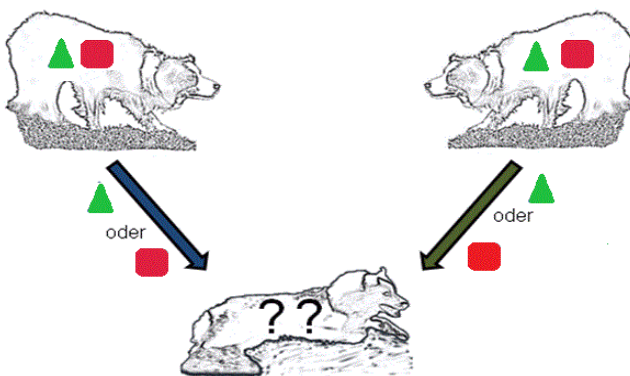
Die Erbanlagen, die in Form von Genen verschlüsselt auf der DNA liegen, bewirken die Ausbildung aller körpereigenen Merkmale, sie sind quasi der Bauplan des Körpers. Jedes Gen kommt zweimal vor; eines wurde vom Vater und eines von der Mutter vererbt. Man spricht von zwei Allelen. Ein Tier kann zweimal das gleiche Allel tragen und ist dann homozygot oder reinerbig, oder es kann zwei verschiedene Allele eines Gens tragen, dann ist es heterozygot oder mischerbig. Setzt sich die Wirkung eines Allels über die des anderen durch, so verhält sich ersteres dominant, letzteres rezessiv. Ist beispielsweise eines der Allele eine Defektmutante, kann es das gewünschte Protein nicht bilden. Das Tier hat dann nur die Hälfte der normalen Menge (über das gesunde Allel). Die meisten Merkmale werden additiv vererbt, d.h. der Phänotyp ist dann halb so stark wie bei reinerbig normalen Tieren. Reicht die Hälfte an Protein aus, das Merkmal vollends auszubilden, so ist das

normale Allel dominant; wird das Merkmal hingegen nicht ausgebildet, ist es rezessiv. Vielen Erkrankungen liegt eine rezessive Vererbung zugrunde, das heißt, die rezessiven Allele sind für den Auftritt einer Erkrankung verantwortlich. Das Problem liegt darin, dass sich solche rezessive Allele unbemerkt in der Population ausbreiten können, weil ja die Wirkung des dominanten Allels ausreicht, den normalen Phänotyp auszubilden. Erst wenn ein Tier das defekte, rezessive Allel sowohl vom Vater, als auch von der Mutter erbt, zeigt sich der kranke Phänotyp.

Bei einem monogenen rezessiven Erbgang gibt es für einen Hund 3 verschiedene Möglichkeiten, wie sein Erbgut aussehen kann. Er kann reinerbig sein für das dominante Allel, also frei oder Normal. Er kann mischerbig sein, das heißt, es liegt ein dominantes und ein rezessives Allel vor, dies nennt man Träger oder Carrier. Und der Hund kann reinerbig sein für die rezessiven Allele und wäre somit erkrankt oder auch Affected. Hierbei käme es dann zur Ausprägung der Erkrankung, während die mischerbigen selbst gesund sind, das rezessive Allel aber tragen und weitervererben können.

In den nachfolgenden Bildern ist das dominante, stärkere Allel, das nicht für die Erkrankung verantwortlich ist, als grünes Dreieck dargestellt, während das rezessive Allel als rotes Viereck dargestellt wird.

## Wie funktioniert Vererbung?



- Jedes Elternteil gibt eine Erbanlage für jedes Merkmal (insgesamt etwa 100.000, von denen 99,9 % bei allen Hunden gleich sind) an den Nachwuchs. So hat jeder Hund 2 Erbanlagen, von jedem Elternteil eins.

- Diese sogenannten Allele sind meist nicht gleichwertig, sondern in der Regel ist eine stärker als die andere (dominant ▲, / rezessiv ■).

Dies ist die Vererbung, wenn eine Krankheit nur von einem Gen verursacht wird. Bei Epilepsie gehen wir jedoch von einem polygenen, multifaktoriellen Erbgang aus. Das heißt, hier sind neben Umwelteinflüssen auch noch mehrere (= poly) Gene an der Ausprägung beteiligt.

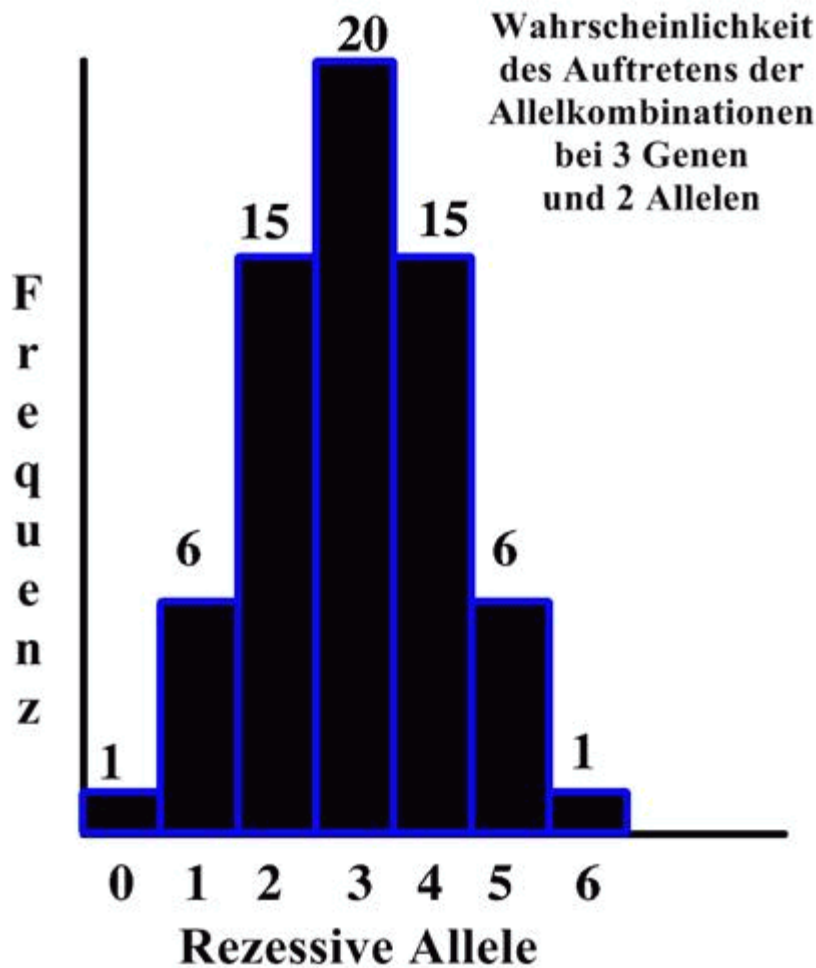
Hier müssen mehrere Gene reinerbig für das schwächere, rezessive Allel sein, bis es zum Überschreiten eines Schwellenwertes kommt und damit zur Ausprägung der Erkrankung.

verantwortlich sind viele Gene, die jeweils in einer dominanten oder rezessiven Form vorliegen können. Bei HD als Beispiel geht man von 10 aus.

Treffen sich genügend rezessive Genpaare, ist der sogenannte Schwellenwert überschritten und die Krankheit bildet sich aus.



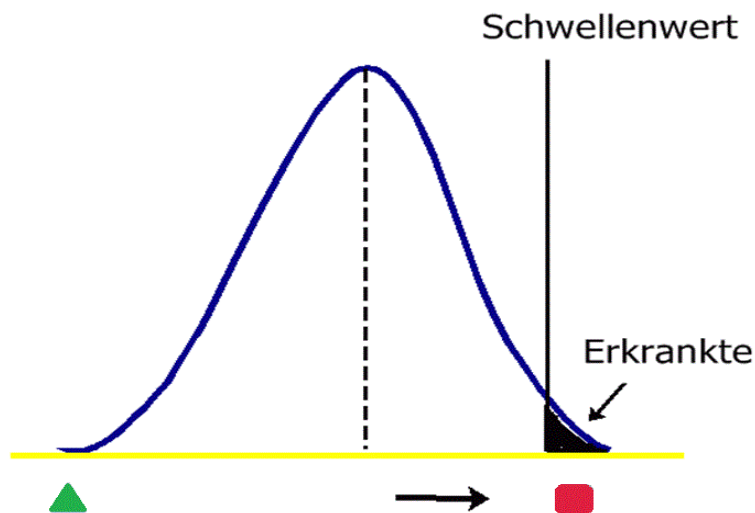
Gab es bei einem Erbgang mit einem Gen noch 3 verschiedene Möglichkeiten, so steigt die Möglichkeit der Genverteilung exponential zur Anzahl der Gene, die an der Merkmalsausprägung beteiligt sind.



Bei 10 Genpaaren gibt es  $2^{10}$  Verteilungsmöglichkeiten für jedes Elternteil. Das sind

1024 pro Elternteil. Für Nachkommen gibt es dann  $1024 \times 1024$ , also über eine Million verschiedene Möglichkeiten von Allelkombinationen. Das kann man nicht mehr in Stufen darstellen, sondern in einer Kurve.

Verteilungsmuster von genetisch freien, belasteten und klinisch erkrankten Hunden bei polygen additiver Vererbung



Im ganz linken Bereich der Kurve sind die Hunde zu finden, die nur die „gesunden“, dominanten Allele vererbt bekommen haben. Ganz rechts der Kurve sind die Hunde zu sehen, die genug rezessive Allele geerbt haben, um den Schwellenwert zu überschreiten, also zu erkranken. Prozentual gesehen dürften beide Gruppen, also die Hunde mit möglichst reinerbig dominanten "gesunden" Allelen und die mit zu vielen reinerbigen, rezessiven Allelen (Erkrankte) ungefähr gleiche Anteile in der Population ausmachen. Bei einer angenommenen Prävalenz von Epilepsie in unserer Population von 2,8 % wären also auch nur ca. 2,8 % vollkommen reinerbig für die dominanten Allele, also umgangssprachlich frei. Der Rest der Population, fast 95 %, wären damit Träger mehr oder weniger rezessiver Allele.

Die bisherigen Empfehlungen lauteten, keine Wiederholungswürfe zu machen aus Verpaarungen, in denen Epilepsie in der Nachzucht vorkam. Ein höheres Eintrittsalter in die Zucht empfiehlt sich, um eine eigene Erkrankung des Zuchthundes weitestgehend ausschließen zu können. Und es wird empfohlen, keine Träger miteinander zu verpaaren. Doch wer ist ein Träger und vor allem- wie viele Gene genau trägt der Hund? Angesichts von nur 2,8 % freien Hunden dürfte es fast unmöglich sein, zwei komplett freie Hunde aneinander anpaaren zu können. Hier soll die Zuchtwertschätzung helfen.

### Zuchtwertschätzung

Wenn wir unsere Zuchthunde ansehen, können wir immer nur die äußerlichen Merkmale feststellen. Diese werden Phänotyp genannt. Selbst das Röntgenbild einer Hüfte zeigt nur die äußerlichen Merkmale, nicht aber, was in den Genen eines Hundes versteckt ist und damit auch an die Nachkommen weitergegeben werden kann.

Die Zuchtwertschätzung bietet eine Instrument, anhand der Phänotypen, also der äußeren

Merkmale eines Tieres und seiner Verwandtschaft, den Genotyp schätzen zu können. Ein gutes Beispiel ist ein schwarz-weißer Hund. Schwarz-weiß ist dominant über Dreifarbigkeit. Man kann einem schwarz-weißen Hund von außen nur seine eigene Farbe ansehen, nämlich schwarz-weiß. Vielleicht kann der Hund aber trotzdem auch dreifarbige Nachzucht bringen, weil er das rezessive Gen in seinem Erbgut trägt. Ist einer seiner Eltern dreifarbig, so ist sicher, dass der Hund ebenfalls das Gen für Dreifarbigkeit trägt. Sind beide Eltern aber schwarz-weiß, so muss man weiter zurückgehen in der Verwandtschaft (Geschwister, Großeltern, etc), um auszurechnen, wie hoch die Wahrscheinlichkeit ist, dass dieser Hund Dreifarbigkeit vererben wird.

Zuchtwertschätzung ist also die Ermittlung eines Wertes, der die Wirkung der Erbanlagen auf ein Merkmal (Epilepsie) beschreibt, und bei dem der Genotyp anhand des Phänotypes eines Tieres und seiner Verwandtschaft geschätzt wird.

In den Zuchtwert eines Hundes fließen Informationen über seine Eltern, Geschwister und Nachkommen ein, außerdem die Informationen aller weiteren mit dem jeweiligen Hund verwandten Tiere. Zuchtwerte unterliegen dementsprechend einer Dynamik. Durch neue Informationen verändern sich auch die Zuchtwerte der Verwandtschaft.

Für eine einfachere Anwendung durch die Züchter werden die Zuchtwerte in relative Zuchtwerte umgewandelt. Eine dem Rassedurchschnitt entsprechende Vererbung wird mit dem Wert 100 gleichgesetzt. Lässt ein Zuchttier die Verstärkung eines Merkmales erwarten, liegt sein Zuchtwert über 100 und umgekehrt. Der Kombinationswert beider Eltern sollte 100 nicht überschreiten, wenn man auf das Merkmal Epilepsie selektieren möchte, weil dann die Chance auf Epilepsie bei den Nachkommen nicht höher wird als im Populationsdurchschnitt.

Ziel der Zuchtwertschätzung ist es, zukünftig Anpaarungen zu vermeiden, die zu Epilepsie führen würden, aber gleichzeitig Trägertiere mit ihren anderen, für die Population wertvollen Genvarianten und somit die genetische Vielfalt in der Zucht halten zu können.

Ein Zuchtausschluss für Hunde mit Zuchtwerten über 100 ist also aus mehreren Gründen nicht anzuraten:

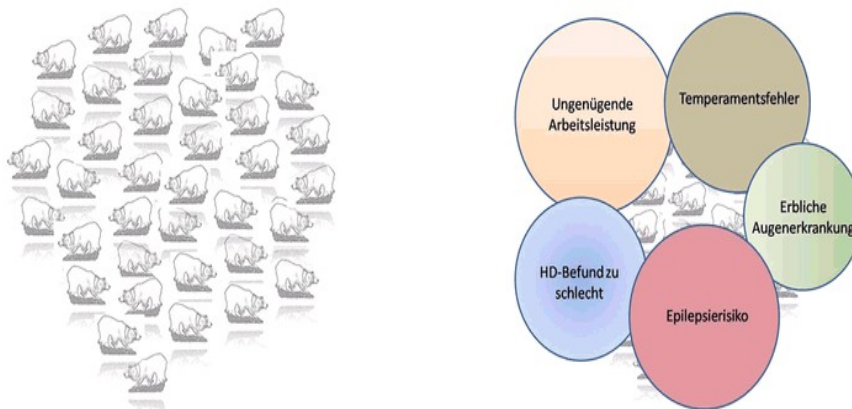
Geschlossene Hundepopulationen (hier: ISDS-Zuchtbuch) sind immer klein, und ein Anstieg des Verwandtschaftsgrades ist unausweichlich. In unserer Population liegt der durchschnittliche Verwandtschaftsgrad bei 7 % auf 6 Generationen. Bei Einbeziehung noch weiterer Generationen liegt der Verwandtschaftsgrad doppelt so hoch. Pro Generation erfolgt ein Anstieg um 0,25-0,5 %.

Alle Lebewesen sind Träger zahlreicher Erbdefekte. Durch Zunahme des Verwandtschaftsgrades steigt nun die Wahrscheinlichkeit, dass rezessive Defektgene sowohl von der Vater- als auch von der Mutterseite eingebracht werden (weil beide das Gen beispielsweise vom Ur-Ur-Großvater geerbt haben). Nun kommt der Defekt zum Ausbruch. Besonders betroffen sind Fruchtbarkeit, Vitalität, Krankheitsresistenz, weil gerade diese Merkmale durch das Zusammenwirken sehr vieler Gene zustande kommen, von denen dann eben eines ausfällt. Eine möglichst große Heterozygotie (das Tier ist an möglichst vielen Genorten mischerbig, hat also für alle Merkmale zwei Allele bereit) ist die Grundlage jeder gesunden und anpassungsfähigen Population.

Je mehr Hunde aufgrund unserer verschiedenen Selektionskriterien aus der Zucht ausgeschlossen werden, desto kleiner wird der Genpool.

## Einfluß verschiedener Selektionskriterien auf die Populationsgröße

Gesamtzahl der theoretisch zur Verfügung stehenden Zuchtpartner... ...und der Rest, nach Ausschluß aller potentiellen Carrier:



Wissenschaftlich gesehen ist der einzige Ausweg aus dieser Misere die Anwendung von Anpaarungsstrategien, bei denen möglichst viele Individuen im Genpool erhalten bleiben und gleichzeitig das Auftreten erkrankter Nachzucht vermindert wird.

### Warum dann noch Molekulargenetik?

Der polygene Ursprung der Erkrankung macht eine Auftrittsvoraussage schwierig. Der Phänotyp ist bei Epilepsie noch sehr viel schwieriger zu bestimmen als zum Beispiel bei HD. Bei HD wird bei einem über ein Jahr alten Hund ein Röntgenbild angefertigt, das den Phänotyp eindeutig und unwiderruflich darstellt. Bei Epilepsie können Hunde selbst nach bereits erfolgtem Zuchteinsatz noch an idiopathischer Epilepsie erkranken. Die Dynamik der Zuchtwerte, die auf den Informationen über die Verwandtschaft beruhen, kompliziert ebenfalls eine möglichst große Sicherheit der Zuchtwerte. Aus diesen Gründen ist eine molekulargenetische Aufarbeitung der Faktoren unumgänglich.

Bis zum heutigen Zeitpunkt gab es bereits mehrere Forschungsprojekte zum Thema idiopathische Epilepsie beim Border Collie. In Finnland unter Prof. Dr. Hannes Lohi, in den USA unter Dr. Mark Neff, in München unter Prof. Dr. Andrea Fischer und in UK mit dem Animal Health Trust unter Leitung von Dr. Catheryn Mellersh.

Diese bisherigen Forschungen nutzen alle sogenannte DNA-Chips. Sie sind einfach zu nutzen und nicht sehr kostenintensiv, stellen aber nur eng begrenzte Teilbereiche des Genoms dar. Ein weiterer kritischer Punkt der bisherigen Forschungsansätze liegt in der Einbeziehung zu vieler Rassen, Populationen und Anfallstypen. Hierdurch werden zu viele Gene auf einmal mit einbezogen.

Der Border Collie, wie er seit Einführung des FCI-Standards 1976 gezüchtet wird, ist genetisch jedoch so weit entfernt von unseren Arbeitshunden in der ISDS, als würde es sich um eine komplett andere Rasse handeln - wahrscheinlich mit einem großteils anderen Epilepsie-Genet. Zudem können wir die erkrankten Hunde in verschiedene Anfallstypen unterscheiden. Zum einen spielt das Erkrankungsalter eine Rolle. Je früher die Hunde erkranken, desto schlechter ein Ansprechen auf Medikation und desto ungünstiger die

Prognose. Hunde, die bei ihrem ersten Anfall bereits älter als 3 Jahre sind, haben statistisch gesehen eine höhere Wahrscheinlichkeit, besser auf die Medikamente anzusprechen und damit auch eine bessere Prognose. Alle Formen der epileptischen Anfälle gehen mit Bewusstseinsverlust einher, aber man kann zwischen fokalen Anfällen, die nur bestimmte Bereiche des Gehirnes betreffen, und generalisierten Anfällen unterscheiden, bei denen das gesamte Gehirn betroffen ist. Oftmals gehen fokale Anfälle in generalisierte Anfälle über.

Unser Forschungsansatz unterscheidet sich daher von den bisherigen Strategien. Mit DNA-Sequenzierung statt DNA-Chips erreichen wir einen ungleich höheren Informationsgehalt über das Genom der Probanden. Als Probanden wollen wir einen weit engeren Kreis von Familien fassen, in deren Reihen erkrankte Hunde aufgetreten sind. Die Genome Erkrankter und Gesunder aus einem Wurf und die Genome der zugehörigen Eltern werden als Kohorten in die Untersuchung mit einbezogen. Dabei wollen wir uns ausschließlich auf den wichtigsten Anfallstyp konzentrieren. Mit diesen Maßnahmen erwarten wir eine gesteigerte Chance, Hinweise auf die molekulare Basis des wichtigsten Anfallstyps in unserer Kernpopulation zu entdecken. Letztendlich hoffen wir, auf diesem Weg Genmarker erarbeiten zu können, mit deren Hilfe wir gefährliche Träger von Epilepsie-Genen bereits als Welpen erkennen können. Irgendwann wird man so in der Lage sein, das Risiko jeder einzelnen Anpaarung exakt bestimmen zu können und den unsicheren Weg der Selektion auf Phänotypenebene durch direkte Berücksichtigung der genetischen Basis der Epilepsie zu ersetzen.

Die Arbeit wird an der Justus-Liebig-Universität Gießen (Reiner/Schmidt) in Zusammenarbeit mit weiteren Institutionen von Gitte Anders durchgeführt. Zuchtwertschätzung und molekulare Arbeiten sind zeitaufwändig und kostenintensiv. Die von Doris Brand zusammengetragenen Daten sind dabei von unschätzbarem Wert. Finanzielle Unterstützung für die materialintensiven Laborarbeiten ist bislang von Seiten der ABCD und der ISDS und der Familie Hennemann zugesagt. Zusätzlich wird es noch ein kleines Fundraising geben.

Letztlich hängt der Erfolg der Aktion entscheidend vom Beitrag jedes betroffenen Züchters ab. Je genauer die Informationen, die uns erreichen, desto höher die Erfolgschance. Wir wollen das Problem in die Zange nehmen, denn gezielte Anpaarung unter Anwendung möglichst genauer Zuchtwerte und molekularer Marker sind langfristig die einzige Chance, Epilepsie wirksam zu bekämpfen, ohne die Heterozygotie und damit die genetische Gesundheit unserer Border Collies aufs Spiel zu setzen. Jeder Züchter kann betroffen sein, alle müssen mit anpacken.

Wir bitten daher dringend um die Meldung betroffener Hunde ans Zuchtkomitee oder direkt an die betreuende Doktorandin Gitte Anders.