

# Abschlussberichte von Forschungsprojekten, die von der GKF gefördert wurden

## ■ Populations- und molekulargenetische Untersuchungen der primären Katarakt beim einfarbigen und mehrfarbigen Englischen Cocker Spaniel und rauhaarigen Kromforländer

*A. Engelhardt, Y. Marschall, K.F. Stock, O. Distl, Hannover*

## ■ MDR1-Defekt beim Hund: Betroffene Rassen und pharmakologische Relevanz

*J. Geyer, Gießen*

# Populations- und molekulargenetische Untersuchung der primären Katarakt beim einfarbigen und mehrfarbigen Englischen Cocker Spaniel und rauhaarigen Kromfohlrländer

*A. Engelhardt, Y. Marschall , K.F. Stock, O. Distl*

## Die primäre Katarakt

Die primäre Katarakt (grauer Star) gilt bei mehr als 120 Hunderassen als die häufigste erbliche Augenerkrankung und führt häufig zur Erblindung. Die Transparenz der Linse geht infolge von Veränderungen der Linsenfasern oder Strukturveränderungen der Linsenkapsel verloren (Abb. 1). Eine pri-

märe Katarakt entwickelt sich nicht im Zusammenhang mit anderen Augenerkrankungen oder als Folge von allgemeinen Erkrankungen, wie z.B. Diabetes mellitus. Erbliche primäre Katarakte sind durch eine typische Erscheinungsform der Linsentrübung, ein rassetypisches Manifestationsalter und einen charakteristischen Verlauf gekennzeichnet. Der Nachweis der Erblichkeit erfolgt



Abbildung 1 Katarakt beim Hund ([www.tieraugen.at](http://www.tieraugen.at))

über Familienanalysen (Segregationsanalysen) und Heritabilitätsschätzungen.

In dem von der GKF geförderten Forschungsprojekt sollten beim Englischen Cocker Spaniel und Kromfohrländer mittels Kandidatengen-assoziiierter Marker Gene identifiziert werden, die für primäre Katarakte von Bedeutung sind. In diesen Genen sollte anschließend nach Mutationen ge-

sucht werden, die primäre Katarakte verursachen. Beim Englischen Cocker Spaniel sollten zudem populationsgenetische Analysen Aufschluss über die Art des Erbgangs und die Höhe der Heritabilität geben.

### Populationsgenetische Analysen beim Englischen Cocker Spaniel

Beim Englischen Cocker Spaniel (ECS, Abb. 2) manifestiert sich die primäre Katarakt in verschiedenen Formen. Eine Form der primären Katarakt beim ECS betrifft vor allem die Linsenrinde, wobei die vorderen (anterioren) oder hinteren (posterioren) Anteile von der Trübung erfasst werden. Diese Form der Katarakt kann entweder bei sehr jungen oder erst bei älteren Tieren auftreten. Der Verlauf ist meist langsam progressiv. Eine weitere Form der Katarakt zeigt sich ab einem Alter von zwei Jahren.

**Tabelle 1** Prävalenzen (%), mittleres Alter bei der Diagnose (in Jahren) und Heritabilitäten für primäre Katarakte (früh- und spätmanifest), persistierende Pupillarmembran, Distichiasis und progressive Retinaatrophie (PRA) beim Englischen Cocker Spaniel (ECS)

Augenerkrankung	Einfarbige ECS (n=615)			Mehrfarbige ECS (n=617)		
	Prävalenz	Diagnosealter (Jahre)	Heritabilität (%)	Prävalenz	Diagnosealter (Jahre)	Heritabilität (%)
Frühmanifeste Katarakt	6,67%	1,87	33,5	2,11%	2,02	12,9
Spätmanifeste Katarakt	8,29%	5,08	16,0	3,40%	5,91	13,8
Persistierende Pupillarmembran	24,55%	2,91	35,7	5,02%	2,77	10,7
Distichiasis	56,26%	3,09	61,8	56,73%	3,12	63,2
PRA	1,30%	5,29	-	3,57%	4,79	-

**Tabelle 2** Untersuchte Kandidatengene für primäre Katarakt beim Englischen Cocker Spaniel und Kromfohlränder

Hunde-chromosom	Kandidatengene	Anzahl genetischer Marker
1	<i>LIM2</i> (lens intrinsic membrane protein 2), <i>FTL</i> (ferritin, light polypeptide), <i>SIX5</i> (homolog of Drosophila sine oculis homeobox 5)	16
4	<i>SPARC</i> (secreted protein acidic cysteine-rich, osteonectin)	1
5	<i>CRYAB</i> ( $\alpha$ B-crystallin), <i>HSF4</i> (heat shock transcription factor 4), <i>MAF</i> (avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog)	15
8	<i>CHX10</i> (ceh-10 homeodomain containing homolog (C. elegans))	1
9	<i>CRYBA1</i> ( $\beta$ A1-crystallin)	2
10	<i>MIP</i> (major intrinsic protein of lens fiber)	2
15	<i>FOXE3</i> (forkhead Box E3)	2
17	<i>GJA 8</i> (gap junction protein, alpha 8, 50 kDa, connexin 50)	1
18	<i>PAX6</i> (paired-box 6 transcription factor)	2
20	<i>TRNT1</i> (tRNA nucleotidyl transferase, CCA-adding, 1)	2
22	<i>SOX1</i> (sex-determining region, SRY-box 1)	1
23	<i>BFSP2</i> (beaded filament structural protein 2)	2
24	<i>BFSP1</i> (beaded filament structural protein 1, filensin), <i>CHMP4B</i> (chromatin modifying protein 4B)	4
25	<i>GJA3</i> (gap junction protein, alpha 3, 46 kDa, connexin 46)	2
26	<i>CRYBA4</i> ( $\beta$ A4-crystallin), <i>CRYBB1</i> ( $\beta$ B1-crystallin), <i>CRYBB2</i> ( $\beta$ B2-crystallin), <i>CRYBB3</i> ( $\beta$ B3-crystallin)	4
28	<i>PITX3</i> (paired-like homeodomain transcription factor 3)	1
29	<i>EYA1</i> (homolog of Drosophila eyes absent1)	1
30	<i>SORD</i> (sorbitol dehydrogenase)	2
31	<i>CRYAA</i> ( $\alpha$ A-crystallin)	6
34	<i>CRYGS</i> ( $\gamma$ S-crystallin)	1
35	<i>GCNT2</i> (glucosaminyl (N-acetyl) transferase 2, I-branching enzyme)	2
37	<i>CRYBA2</i> ( $\beta$ A2-crystallin), <i>CRYGA</i> ( $\gamma$ A-crystallin), <i>CRYGB</i> ( $\gamma$ B-crystallin), <i>CRYGC</i> ( $\gamma$ C-crystallin), <i>CRYGD</i> ( $\gamma$ D-crystallin)	6
Gesamt	34 Kandidatengene	76 Marker

Bei dieser Kataraktform kommt es zu einer Trübung des Linsenkerns, der dann glaswollartige und fibrilläre Strukturen aufweist. Die Analysen wurden getrennt für ein- und mehrfarbige ECS durchgeführt, da diese beiden Farbschläge seit mehr als 30 Jahren weitgehend getrennt sind. Weiterhin

wurde zwischen den früh- und spätmanifesten Katarakten unterschieden. Zusätzlich zu den primären Katarakten wurden alle Fälle von persistierender Pupillarmembran (PPM), Distichiasis (doppelte Wimpernreihe) und Progressiver Retinaatrophie (PRA) erfasst und in die populationsgene-



**Abbildung 2** Englischer Cocker Spaniel  
([www.jagdspaniel-klub.de](http://www.jagdspaniel-klub.de), Dr. Beyersdorf)

tischen Analysen aufgenommen. In den Prävalenzen von Katarakten, persistierender Pupillarmembran und PRA unterschieden sich die beiden Farbvarianten der Englischen Cocker Spaniel sehr deutlich. Primäre Katarakte und persistierende Pupillarmembran waren beim einfarbigen ECS häufiger als beim mehrfarbigen ECS. PRA hingegen trat deutlich häufiger beim mehrfarbigen ECS auf. Für alle diese Augenerkrankungen mit Ausnahme der PRA wurden Heritabilitäten beim ein- und mehrfarbigen Englischen Cocker Spaniel geschätzt (Tab. 1). Auffallend hohe Heritabilitäten zeigten sich für die Distichiasis. Katarakte und persistierende Pupillarmembran wiesen Heritabilitäten im mittleren Bereich auf. Die genetischen Korrelationen zwischen der früh- und spätmanifesten Form der Katarakt lassen mit hoher Wahrscheinlichkeit darauf schließen, dass diese beiden Kataraktformen genetisch unterschiedliche Formen darstellen.

Die Analyse des Pedigrees zeigte die familiären Zusammenhänge für die primären Katarakte und damit die erbliche Grundlage für diese Augenerkrankung. Beim einfarbi-

gen ECS spielt die Inzucht eine signifikante Rolle für das Auftreten der primären Katarakt. Von primärer Katarakt betroffene Hunde hatten Inzuchtkoeffizienten von 4,6%, während Katarakt-freie Hunde deutlich niedrigere Inzuchtkoeffizienten in der Höhe von 2,9% hatten. Bei den mehrfarbigen ECS zeigten sich ähnliche Tendenzen. Bei den ein- und mehrfarbigen ECS dürften mehrere verschiedene Gene eine Rolle bei der Entstehung der primären Katarakte spielen. Dominante Hauptgene erschienen hierbei als unwahrscheinlich. Ein rezessives Hauptgen erscheint bei den einfarbigen ECS als sehr wahrscheinlich.

### **Molekulargenetische Untersuchungen der primären Katarakt beim Englischen Cocker Spaniel**

Die molekulargenetische Analyse basierte auf insgesamt 76, weitgehend innerhalb der Kandidatengene lokalisierten Markern. Mittels dieser Marker wurden die bei Mensch und Maus bekannten Gene für primäre Katarakt auf ihre Bedeutung beim Englischen Cocker Spaniel und Kromfohlländer überprüft. Diese Analysen beruhten auf 3 Familien einfarbiger ECS mit insgesamt 23 von primärer Katarakt betroffenen und 32 katarakt-freien Hunden. Für die mehrfarbigen ECS eignete sich eine Familie mit zwei von primärer Katarakt betroffenen und drei katarakt-freien Hunden. Die Zuchtbuchdaten wurden dankenswerterweise vom Jagdspaniel-Klub e.V. und die ophthalmologischen Untersuchungsergebnissen von der nationalen Erfassungsstelle des Dortmunder Kreises (DOK) zur Verfügung gestellt. Die in dieser Studie berücksichtigten ECS hat-

ten Trübungen in der hinteren Kapsel oder Rinde der Linse (52%) oder im Linsenkern (48%). Die von primärer Katarakt freien Tiere waren bei der letzten Augenuntersuchung mindestens 5 Jahre alt.

Für die Untersuchungen wurden alle bei Mensch und Maus molekulargenetisch charakterisierten Kandidatengene für primäre Katarakte herausgesucht (Tab. 2). Um herauszufinden, ob diese Kandidatengene im Zusammenhang mit der primären Katarakt beim ECS stehen, wurden insgesamt 54 in diesen Kandidatengenen lokalisierte und 22 in der nahen Umgebung dieser Gene liegende Marker (Mikrosatelliten) untersucht. Mittels Kopplungsanalyse wurde der Zusammenhang zwischen den Markern und dem Auftreten von primärer Katarakt überprüft. Eine Region auf dem Hundechromosom 5 zeigte hierbei einen signifikanten Zusammenhang. In dieser Region sind die beiden Kandidatengene *MAF* (v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog) und *HSF4* (heat-shock transcription factor 4) lokalisiert.

In dem Gen *HSF4* sind mehrere Mutationen bekannt, die bei Mensch und Maus erbliche primäre Katarakte verursachen. Außerdem wurde im *HSF4* Gen eine Mutation identifiziert, die beim Staffordshire Bull Terrier und Boston Terrier mit einer rezessiven Kataraktform im Zusammenhang steht. Beim ECS konnte das *HSF4* Gen als Kandidat für die primäre Katarakt ausgeschlossen werden, da die Marker im *HSF4* Gen weder eine Kopplung noch eine Assoziation zur primären Katarakt beim ECS aufwiesen. Im Gegensatz zu *HSF4* konnte *MAF* als Kandidat für die primäre Katarakt beim ECS nicht ausgeschlossen werden, da die Assoziationsanalysen einen signifikanten Zusam-



**Abbildung 3** Rauhaarige Kromfohländer  
([www.igrk-kromfohrlaender.de](http://www.igrk-kromfohrlaender.de))

menhang zwischen Markern in *MAF* und der primären Katarakt beim ECS bestätigten. Deshalb sind weitere Untersuchungen lohnenswert, um die genaue Rolle von *MAF* für die Kataraktentwicklung zu überprüfen. Die Gene *CRYAA* (CFA31) und *SORD* (CFA30) sind ebenfalls als Kandidaten für die primäre Katarakt beim ECS anzusehen, da Marker in diesen Genen mit der primären Katarakt beim ECS assoziiert waren. Für diese drei Gene zeigt Tab. 3 die Allel-Kombinationen, die signifikant häufiger bei den betroffenen bzw. freien ECS auftraten.

### Molekulargenetische Untersuchung der primären Katarakt beim rauhaarigen Kromfohländer

Der Kromfohländer ist eine der jüngsten deutschen Hunderassen und seit 1955 international anerkannt (Abb. 3). Zu den Stammeltern des Kromfohländers zählen der Foxterrier und der Griffon Vendéen. Es gibt zwei verschiedene Varietäten, die durch die Haarart bestimmt werden: Rauhaar und Glatthaar. Die primäre Katarakt

beim Kromfohlränder entspricht der beim Foxterrier beschriebenen Form. Diese Kataraktform beim Foxterrier beginnt in den hinteren Bereichen der Linse und tritt mit drei Jahren in Erscheinung. Die Trübung der Linse nimmt stetig zu und im Alter von vier bis fünf Jahren ist die komplette Linse eingetrübt. Außerdem wird beim Foxterrier noch eine weitere früher auftretende Form der primären Katarakt beschrieben, die bereits zu einer vollständig getrübt Linse im Alter von einem Jahr führt. Der Erbgang der primären Katarakt beim Foxterrier ist nicht bekannt. Für die Kopplungsanalyse konnte eine Familie von rauhaarigen Kromfohlrändern mit insgesamt 110 Hunden zusammengestellt werden. In dieser Familie waren 13 Hunde von primärer Katarakt betroffen und 61 Hunde als frei von primärer Katarakt befundet. Das Mindestalter bei der letzten Augenuntersuchung betrug 4 Jahre, so dass eine möglichst hohe Sicherheit der Diagnose gewährleistet wurde. Für 36 rauhaarige Kromfohlränder waren keine Ergebnisse einer ophthalmologischen Untersuchung vom Dortmunder Kreis verfügbar.

Mit primärer Katarakt gekoppelte Marker wurden auf den Hundechromosomen 18, 26, 31 und 37 identifiziert. Diese Marker waren innerhalb folgender Kandidatengene lokalisiert: *PAX6* (CFA18), *CRYBB1* (CFA26), *CRYBA4* (CFA26), *CRYBB2* (CFA26), *CRYAA* (CFA31) und *CRYBA2* (CFA37). In weitergehenden Assoziationsanalysen konnten für die Kandidatengene *CRYAA* (CFA31) und *CRYBA1* (CFA9) sowohl Allele und Allel-Kombinationen gefunden werden, die mit primärer Katarakt in Zusammenhang standen (Tab. 3).

Die Kristallingene *CRYBB1*, *CRYBA4*, *CRYBB2*, *CRYAA* und *CRYBA2* kodieren Kristallinpro-

teine, die Hauptstrukturkomponenten der Augenlinse. Hierbei wird zwischen den  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Kristallinen unterschieden, wobei die  $\alpha$ -Kristalline und die  $\beta$ -/ $\gamma$ -Kristalline je eine Proteinfamilie bilden. In den Genen der Kristalline *CRYAA*, *CRYBB1*, *CRYBB2* und *CRYBA4* wurde nach Mutationen (Änderungen in der Abfolge der Basenbausteine der DNS) in den Exons (Abschnitte der DNS, die das entsprechende Protein kodieren) gesucht. Es wurden insgesamt neun Einzelbasenaustausche (SNPs) gefunden. Jedoch zeigte keiner dieser Einzelbasenaustausche einen signifikanten Zusammenhang mit der primären Katarakt beim rauhaarigen Kromfohlränder.

*PAX6* (paired-box gene) ist eines der zentralen Gene in der Entwicklung des Auges und ist bei der Expression verschiedener Kristalline beteiligt. Die Strukturanalyse des Gens *PAX6* zeigte eine Übereinstimmung von 91% bis 99% zwischen Mensch und Hund. Bei den Untersuchungen zeigte sich, dass *PAX6* des Hundes im Gegensatz zum menschlichen Gen kein Exon 6 enthält. Die Exons 1 bis 5, 7, 9 bis 13 und große Teile von Exon 14 wurden sequenziert. Bisher konnten noch keine Sequenzvariationen in diesem Kandidatengen gefunden werden, die mit dem Auftreten von primärer Katarakt perfekt koregrieren.

## Schlussfolgerungen

Für den Englischen Cocker Spaniel konnte *MAF* als signifikanter Kandidat für primäre Katarakt über Kopplungs- und Assoziationsanalysen bestätigt werden. Zwei weitere Kandidatengene, *CRYAA* und *SORD*, spielen ebenfalls für die Entwicklung von primärer

**Tabelle 3** Allel-Kombinationen, die bei den Englischen Cocker Spaniel und den rauhaarigen Kromfohländern signifikant häufiger bei den mit primärer Katarakt betroffenen bzw. freien Tieren vorkamen

Gen	Frequenz der Allel-Kombination				
	Allel-Kombination	frei	betroffen	$\chi^2$	P
Englische Cocker Spaniel					
CRYAA	170-327	0,000	0,065	4,71	0,030
	180-325	0,087	0,335	10,43	0,001
	180-336	0,283	0,121	3,70	0,055
MAF	351-307	0,424	0,217	4,58	0,032
	355-303	0,214	0,477	7,09	0,008
	359-307	0,152	0,022	5,09	0,024
SORD	137-202	0,283	0,087	5,84	0,016
Rauhaarige Kromfohländer					
CRYAA	180-332-2	0,458	0,692	4,07	0,044
CRYBA1	150-202	0,111	0,393	8,91	0,003
$\chi^2$ : Teststatistik · P: Irrtumswahrscheinlichkeit					

Katarakt beim ECS eine Rolle. Dagegen konnte bei beiden Rassen *HSF4* als ursächlich für die primäre Katarakt ausgeschlossen werden. Beim rauhaarigen Kromfohländer sind die Gene *CRYAA* und *CRYBA1* aussichtsreiche Kandidatengene, da ein deutlicher Zusammenhang zwischen intragenischen Markern und primärer Katarakt bestand. Somit konnten sowohl für den Englischen Cocker Spaniel als auch den rauhaarigen Kromfohländer mit primärer Katarakt assoziierte Kandidatengene nachgewiesen werden. Diese Arbeiten ermöglichen jetzt für diese beiden Rassen die Entwicklung von Gentests für primäre Katarakt.

Für die große Unterstützung durch die Züchter, die Rassehundezuchtvereine und die gkf bedanken wir uns an dieser Stelle sehr herzlich.

*Prof. Dr. Ottmar Distl, Anja Engelhardt,  
Dr. Yvonne Marschall, Dr. Kathrin Friederike  
Stock*

*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*