

**Molekulargenetische Untersuchungen beim Hund:
Genomweite Analysen zur generalisierten Progressiven Retina
Atrophie und mitochondriale sowie Y-chromosomale Studien zur
genealogischen Abstammung**

Dissertation zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie und Biotechnologie
an der Internationalen Graduiertenschule Biowissenschaften
der Ruhr-Universität Bochum

angefertigt in der
Humangenetik RUB
Medizinische Fakultät

vorgelegt von
Regina Kropatsch

aus
Herborn

Bochum, Januar 2011

**Molecular genetic investigations in dogs:
Genome-wide analyses for generalized progressive retinal atrophy
as well as mitochondrial and Y-chromosomal studies on
genealogical origins**

Dissertation to obtain the degree
Doctor Rerum Naturalium (Dr. rer. nat.)
at the Faculty of Biology and Biotechnology
Ruhr-University Bochum

International Graduate School of Biosciences
Ruhr-University Bochum

Human Genetics RUB
Faculty of Medicine

submitted by
Regina Kropatsch

from
Herborn, Germany

Bochum, January 2011

Dekan:

Prof. Dr. F. Narberhaus

Erster Gutachter:

Prof. Dr. med. J. T. Epplen

Zweiter Gutachter:

Prof. Dr. Dr. Dr. med. H. Hatt

Tag der mündlichen Prüfung:

11. April 2011

Tag der Promotion:

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VII
Allgemeine Einleitung.....	9
<i>Canis familiaris</i> : Ursprung, Zuchtgeschichte und Modellsystem	9
Modellerkrankung: Generalisierte progressive Retina Atrophie	11
Das canine Genom	15
Strategien zur Identifikation von Krankheitsgenen	18
Zielsetzungen dieser Arbeit.....	21

Kapitel 1

Genealogische Abstammung von Rassehunden – insbesondere von Weimaraner Jagdhunden	23
1.1. Einleitung.....	24
1.2. Material und Methoden.....	25
1.2.1. Proben.....	25
1.2.2. Marker und DNA-Amplifizierung	25
1.2.3. Sequenzanalysen der mitochondrialen DNA	26
1.2.4. Statistische Analysen	26
1.3. Ergebnis	27
1.3.1. Y-chromosomale und mtDNA-Variabilität bei Weimaranern	27
1.3.2. Y-chromosomale und mtDNA-Polymorphismen bei allen 27 Hunderassen.....	28
1.4. Diskussion.....	32
1.4.1. Paternale und maternale Vererbungslinien bei Weimaranern	32
1.4.2. Paternale und maternale Vererbungslinien bei allen 27 Hunderassen	33

Kapitel 2

Genomweite Kopplungsanalysen von Mikrosatellitenmarkern für generalisierte progressive Retina Atrophie in verschiedenen Hunderassen.....	36
2.1. Einleitung.....	37
2.2. Material und Methoden.....	38
2.2.1. DNA-Proben und Diagnose	38
2.2.2. Auswahl von gPRA-Kandidatengenen	38
2.2.3. Marker und Auswahlkriterien	40
2.2.4. Polymerase Kettenreaktion (PCR) und Fragmentanalyse	41
2.2.5. Stammbaumanalysen und Statistische Auswertung	41
2.3. Ergebnis	42
2.3.1. Kopplungsanalyse ausgewählter Kandidatengene	42
2.3.2. Genomweite Kopplungsanalyse in drei Hunderassen	42
2.4. Diskussion.....	44

Kapitel 3

Genomweite SNP-<i>microarray</i> Analysen für generalisierte progressive Retina Atrophie führen zur ursächlichen Deletionsmutation im ADAM9-Gen für Irish Glen of Imaal Terrier	46
3.1. Einleitung.....	47
3.2. Material und Methoden.....	48
3.2.1. Tiere und Diagnose.....	48
3.2.2. SNP- <i>microarray</i> Analysen und Homozygotie-Kartierung.....	49
3.2.3. Feinkartierung homozygoter Kandidatenregionen.....	50
3.2.4. Auswahl und Analyse von Kandidatengenomen.....	51
3.2.5. Analyse der Kandidatenregion auf CFA16 inklusive <i>ADAM9</i> -Gen.....	51
3.2.5.1. Haplotyp- und Statistische Kopplungsanalysen.....	51
3.2.5.2. Mutations- und Genomsequenzanalysen von <i>ADAM9</i>	51
3.2.5.3. cDNA-Analysen.....	52
3.2.5.4. Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) Analysen.....	52
3.2.5.5. Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus (SSCP)-Analysen.....	52
3.2.5.6. Western-Blot-Analysen.....	53
3.2.5.7. Histologie und Immunhistochemie.....	54
3.3. Ergebnis.....	55
3.3.1. Identifizieren von Kandidatenregionen.....	55
3.3.2. Feinkartieren von Kandidatenregionen.....	55
3.3.3. Analyse von Kandidatengenomen.....	57
3.3.4. Mutationsanalyse im Kandidatengenom <i>ADAM9</i>	60
3.3.4.1. Charakterisieren der <i>ADAM9</i> -Deletion.....	60
3.3.4.2. Haplotypanalyse der <i>ADAM9</i> -Genregion.....	60
3.3.4.3. cDNA-Analysen des Kandidatengens <i>ADAM9</i>	61
3.3.4.4. Neu identifizierte DNA-Sequenzen im Intron 3 des <i>ADAM9</i> -Gens.....	61
3.3.4.5. Expressionsstudien anhand von qRT-PCR Analysen.....	61
3.3.4.6. Nachweis der <i>ADAM9</i> -Protein-Expression mittels Western-Blot-Analysen.....	63
3.3.4.7. Histologischer und immunhistochemischer Degenerationsnachweis.....	64
3.4. Diskussion.....	65
3.4.1. Genomweite SNP- <i>microarray</i> Analyse bei Irish Glen of Imaal Terriern.....	65
3.4.1.1. <i>ADAM9</i> : Kandidatengenome für gPRA.....	65
3.4.1.2. Charakterisierung der <i>ADAM9</i> -Mutation auf Genomebene.....	65
3.4.1.3. Untersuchungen zum <i>ADAM9</i> -Protein.....	66
3.4.1.4. Phänotypische Variabilität der gPRA bei Irish Glen of Imaal Terriern.....	67
3.4.2. Genomweite SNP- <i>microarray</i> Analyse bei weiteren Hunderassen.....	68
3.4.3. Ausblick.....	70
Zusammenfassung	71
Summary	73
Literaturverzeichnis	75
Anhang	86
Darstellung des Eigenanteils an den Publikationen	123
Danksagung	124
Erklärung	126
Curriculum vitae	127

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ADAM	<i>a disintegrin and metalloprotease</i>
AK	Antikörper
ar	autosomal rezessiv(er)
ARHGEF17	<i>rho guanine nucleotide exchange factor 17</i>
AS	Aminosäuren
bp, kb, Mb, Gb	Basenpaar(e), Kilo-, Mega-, Giga-
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
ca.	zirka
CCDC66	<i>coiled-coil domain containing 66</i>
cd	<i>cone-degeneration</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CDH23	<i>cadherin 23</i>
cea	<i>collie eye anomaly</i>
CFA	canines Chromosom
CHX10	<i>ceh-10 homeodomain homologue</i>
cM	Centimorgan
CNGB3	<i>cyclic nucleotide gated channel β 3</i>
cord1	<i>cone-rod dystrophy</i> , Typ1
crd/CRD	<i>cone-rod dystrophy</i> (canine Form / humane Form)
CT	<i>cycle threshold</i>
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DOK	Dortmunder Ophthalmologen Kreis
dR	direkte <i>Repeats</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EtOH	Ethanol
erd	<i>early retinal degeneration</i>
ERG	Elektroretinogramm
FCI	<i>Fédération Cynologique Internationale</i>
FGF5	<i>fibroblast growth factor 5</i>
FISH	Fluoreszenz-in-situ Hybridisierung
G	Guanin
GNAT1	<i>g-protein α-transducing activity polypeptide</i>
gPRA	generalisierte progressive Retina Atrophie
HE	Hämatoxilin-Eosin
IBD	<i>identical-by-descent</i>
IVS	<i>intervening sequence</i> = Intron
LRAT	<i>lecithin retinol acyltransferase</i>
K	Tausend (Kilo)
KH	Kurzhaar
LD	<i>linkage disequilibrium</i>
LH	Langhaar
LINE	<i>long interspersed elements</i>
LOD	<i>logarithm of the odds</i>
M, mM, μ M	molar (mol/l), millimolar, mikromolar

MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
mRNA	<i>messenger</i> RNA, Boten-Ribonukleinsäure
MSS-2	<i>Minimal Screening Set 2</i>
mtDNA	mitochondriale DNA
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
<i>NPHP4</i>	<i>nephronophthisis 4</i>
o.g.	oben genannt
<i>PCDH21</i>	<i>protocadherin 21</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pd	<i>photoreceptor dysplasia</i>
<i>PDC</i>	<i>phosducin</i>
<i>PDE6A</i>	<i>rod cGMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase subunit alpha</i>
<i>PDE6B</i>	<i>rod cGMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase subunit beta</i>
<i>PLEKHB1</i>	<i>pleckstrin homology domain retinal protein 1</i>
pmol	pikomol
<i>PIP5K2</i>	<i>diphosphoinositol pentakisphosphate kinase 2</i>
<i>PRCD</i>	<i>progressive rod-cone degeneration</i>
<i>PROM1</i>	<i>prominin 1</i>
<i>PRPF8</i>	<i>precursor mRNA-processing factor 8</i>
<i>PXMP3</i>	<i>peroxisomal membrane protein 3</i>
qRT	<i>quantitative real time</i>
rcd	<i>rod cone dysplasia</i>
<i>RD3</i>	<i>retinal degeneration 3</i>
<i>RGR</i>	<i>retinal G protein-coupled receptor</i>
<i>RHO</i>	<i>rhodopsin</i>
<i>RLBP1</i>	<i>retinaldehyde-binding protein 1</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RP	Retinitis pigmentosa
<i>RP1</i>	<i>retinitis pigmentosa 1-Genomregion</i>
<i>RPGR</i>	<i>RP guanosintriphosphatase regulator</i>
<i>RPGRIP1</i>	<i>RPGR-interacting protein1</i>
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel
<i>SFRP2</i>	<i>secreted frizzled-related protein 2</i>
SINE	<i>short interspersed elements</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
SSCP	<i>single strand conformation polymorphism</i>
T	Thymin
TBE	Tris-Borat-EDTA
<i>TTPA</i>	<i>tocopherol-transfer protein (α)</i>
<i>TULP1</i>	<i>tubby-like protein 1</i>
U	<i>units</i>
u.a.	unter anderem
UpM	Umdrehungen pro Minute
<i>USH2A</i>	<i>usherin</i>
UTR	<i>untranslated region</i>
VDH	Verband für das Deutsche Hundewesen
vgl.	vergleiche
XL-PRA	X-gekoppelte PRA
z.B.	zum Beispiel

Allgemeine Einleitung

Canis familiaris: Ursprung, Zuchtgeschichte und Modellsystem

Domestikation

Der domestizierte Hund (*Canis familiaris*) ist ein in der Geschichte des Menschen einzigartiges genetisches Experiment. Hunde stellen die erste und damit älteste domestizierte Spezies dar, die den Menschen über Jahrhunderte in Eurasien sowie Amerika begleitet hat (Leonard et al. 2002) und ihm seitdem bei unterschiedlichsten Aufgaben behilflich ist, wie z.B. beim Tiere hüten, Jagen oder Schlitten ziehen (Sutter und Ostrander 2004). Kein anderes Säugetier zeigt eine so enge Bindung zum Menschen und das bereits über so viele Jahrhunderte hinweg. Da der Hund somit eine bedeutende Rolle im Umfeld des Menschen einnimmt, sind Fragestellungen nach der Evolution des Hundes, dessen geographischen Ursprungs sowie Rückkreuzungsereignissen mit wilden Caniden seit einiger Zeit teils heiß diskutierte Themen der internationalen Hundeforschung.

Die überwiegende Anzahl dieser Studien basiert auf der Analyse mitochondrialer DNA (mtDNA). mtDNA ist ein ~16 Kilobasen (kb) großes, extranukleäres ‚Plasmid‘ in Mitochondrien, das bei den meisten Tieren rein maternal vererbt wird und sich trotz praktisch fehlender Rekombination evolutionär sehr schnell entwickelt hat. Wegen der hohen Evolutionsrate mitochondrialer Gene, die um das 10fache größer ist als die des nukleären Genoms, ist mtDNA-Sequenz für zeitliche Abschätzungen von relativ zeitnahen evolutionären Ereignissen geeignet (Kim et al. 1998), wie z.B. die Domestikation des Hundes oder phylogenetische Analysen innerhalb einer Spezies (Bruford et al. 2003). Umfassende phylogenetische Studien der mtDNA haben gezeigt, dass der Hund vom grauen Wolf (*Canis lupus*) abstammt und dieses Domestikationsereignis mindestens 15.000 Jahre zurück liegt (Boyko et al. 2009, Leonard et al. 2002, Olsen 1985, Savolainen et al. 2002, Vila et al. 1997, Vila et al. 2005). Vergleichende Analysen mtDNA sowie nukleärer kodierender Sequenzen belegen die enge Verwandtschaft zwischen Hund und seinem Wolfs-Vorfahren, da nur 0,2 % bzw. 0,04 % dieser Sequenzen Unterschiede zwischen beiden Spezies aufweisen (Lindblad-Toh et al. 2005, Wayne 1993). Der Ort des Domestikationsgeschehens konnte bisher noch nicht eindeutig bestimmt werden. Einige mtDNA-Studien vermuten den Ursprung der Domestikation in Ost-Asien (Savolainen et al. 2002) im südlichen China, da dort die größte mtDNA-Haplotypen Diversität identifiziert wurde, die (ausgehend von diesem Domestikationszentrum) mit der Ausbreitung der Hunde progressiv abnahm (Pang et al. 2009). Eine kürzlich erschienene genomweite Analyse von ~50K autosomalen SNP-Loci konnte diese Ursprungsregion nicht bestätigen, sondern vermutet vielmehr eine Domestikation von Wölfen aus dem Mittleren Osten (VonHoldt et al. 2010). Da Analysen mtDNA wegen ihrer ausschließlich maternalen Vererbung lediglich Gründerlinien mütterlicherseits erfassen

(Bruford et al. 2003), vervollständigen Studien des Y-Chromosoms bzw. des paternalbedingten Genflusses die Evolutionsgeschichte des domestizierten Hundes und ermöglichen z.B. Aussagen über geschlechtsspezifische Unterschiede der genetischen Diversität. So wurde gezeigt, dass die genetische Vielfalt bei Rüden vergleichsweise geringer als bei Hündinnen ist, was in einem gewissen Widerspruch zur beobachteten gleichmäßigen Verteilung beider Geschlechter bei Wolfspopulationen steht. Dies ist aber durch den Einsatz von *popular sires* (besonders attraktive Zuchtrüden, die den gewünschten Rassestandards entsprechen) in vielen Rassen erklärbar (Sundqvist et al. 2006).

Der moderne Rassehund

Die heutigen Hunderassen sind höchstens 400 Jahre alt, da sie erst während den Rassegründungen in den letzten Jahrhunderten aufgrund selektiver Züchtungen hinsichtlich ihres Nutzens, Aussehens und Verhaltens durch den Menschen entstanden sind (Parker et al. 2004). Weltweit sind mehr als 400 Rassen bekannt, die sich in phänotypischen Merkmalen, wie z. B. Größe, Form, Fellfarbe und Verhalten unterscheiden, womit der Hund von allen domestizierten Tierspezies die größte morphologische Vielfalt besitzt (Lindblad-Toh et al. 2005, Parker et al. 2004, Sundqvist et al. 2006). Verschiedene Theorien zur Quelle phänotypischer Diversität zwischen Rassen lassen vermuten, dass die Vielfalt aus der Struktur und Instabilität des Hundegenoms hervorgeht, wie z.B. Insertionen von kurzen, eingestreuten Kernsequenzelementen (*short interspersed nuclear elements*, SINEs) in Genen (Kirkness et al. 2003), Gen-assoziierte Mikrosatellitenrepeat-Expansionen (Fondon und Garner 2004), exprimierte Retrogene (Parker et al. 2009) oder CNVs in Genen (*copy number variations*; Chen et al. 2009, Nicholas et al. 2009). So wurden kürzlich 155 genomische Regionen identifiziert, die einer starken künstlichen Selektion ausgesetzt waren und Kandidatengene enthalten, die mit in Rassen variierenden Phänotypen assoziiert sind (Akey et al. 2010).

Die einer Rasse zugehörigen Individuen dagegen sind meist phänotypisch ausgesprochen homogen, sodass die genetische Diversität innerhalb einer Rasse reduziert ist, während zwischen Rassen größere genetische Unterschiede existieren (Parker et al. 2004). Zurückzuführen ist dies bei den meisten Rassen auf nur wenige Gründertiere als Zuchtbasis (Gründereffekt; Mellersh et al. 1997), strikte Zuchtpraktiken zur Reproduktion einer Rasse (meist unter Verwendung von ‚ausgezeichneten Zuchtrüden‘) sowie auf Inzuchtstrategien zur Erhaltung rassetypischer Merkmale. Diese Maßnahmen hatten erhöhte genetische Drift und damit den Verlust der genetischen Vielfalt innerhalb einer Rasse zur Folge. In einigen Rassen wurde diese durch periodisch auftretende Flaschenhalsereignisse (*bottlenecks*) noch zusätzlich minimiert, wie z.B. durch Weltkriege oder wirtschaftliche Depression. Daher sind viele der heutigen Hunderassen isolierte, teils stark ingezüchtete Populationen mit limitier-

tem *Genpool* und Prädispositionen für spezifische Erkrankungen analog zu menschlichen Populationen mit verminderter genetischer Vielfalt infolge ihrer geographischen Isolation, wie z.B. Isländer, Finnen oder Beduinen (Ostrander und Kruglyak 2000). Deshalb wird angenommen, dass die vorhandene genetische Variabilität von Hunden auf die Vielfalt der ursprünglichen Wolfspopulation und nachfolgende nicht-synonyme Mutationen, die seit der Domestikation im Hundegenom stattgefunden haben (Cruz et al. 2008), oder auch auf Rückkreuzungen domestizierter Hunde mit Wölfen (Vila et al. 2005) zurückzuführen ist.

Modellorganismus Hund

Der Rassehund zeigt aufgrund seiner einzigartigen Populationsstruktur hohe Prävalenzen an diversen Krankheiten wie Krebs, Epilepsie, Autoimmun-, Herz- und Augenerkrankungen. Mit über 370 Leiden sind beim Hund, abgesehen vom Menschen, mehr natürlich auftretende, genetische Erkrankungen beschrieben als in irgendeiner anderen Spezies (Ostrander et al. 2000, Patterson 2000, Sargan 2004). Mindestens die Hälfte davon ist auch beim Menschen analog bekannt, die u.a. im klinischen Erscheinungsbild direkt vergleichbar sind. Häufig liegt die Mutation der caninen Erkrankung sogar im selben Gen, das auch als Mutationsort für die homologe humane Erkrankung beschrieben ist. Über 46 % dieser genetischen caninen Erkrankungen sind rassespezifisch und treten nur in einer oder in wenigen Rassen auf (Ostrander et al. 2000, Patterson 2000). Diese hohe Prävalenz spezifischer Erkrankungen in bestimmten Rassen lässt vermuten, dass nur eine begrenzte Anzahl an Loci ursächlich für die entsprechende Erkrankung ist. Auch aufgrund der enorm ähnlichen Physiologie zu der des Menschen ist der Hund ein weit verbreitetes und wichtiges Tiermodell in der Humanmedizin für klinische Studien zur Therapieentwicklung, z.B. für Leber'sche kongenitale Amaurose (Acland et al. 2001, Narfstrom et al. 2003) oder für genetische Analysen menschlicher Erkrankungen (Starkey et al. 2005), wie Retinitis pigmentosa (RP), die größte Gruppe humaner Dystrophien der Netzhaut (Retina).

Modellerkrankung: Generalisierte progressive Retina Atrophie

Hintergrund

Retinale Dystrophien sind häufig die Ursache von Blindheit in caninen Reinzuchtlinien. Die bekannteste Dystrophie ist die generalisierte progressive Retina Atrophie (gPRA), das Äquivalent der RP beim Menschen im Krankheitsverlauf und Erscheinungsbild (Petersen-Jones 2005). Erstmals beschrieben wurde die gPRA 1909 beim Gordon Setter in Schweden (Magnusson 1911). Inzwischen ist sie in vielen Rassen ein zunehmendes Problem der Hunderassezucht (Petersen-Jones 1998) und die Anzahl an betroffenen Rassen nimmt stetig zu (Hertel et al. 2010).

Die gPRA ist eine Erkrankung der caninen Retina, die im hinteren Bereich des Auges lokalisiert ist. Sie ist die innerste Schicht des Augenhintergrunds (Fundus), die u.a. die photorezeptiven Zellen (Stäbchen und Zapfen) enthält, welche für das Sehen bei Dämmerung und Nacht bzw. für das Tag- und Farbsehen verantwortlich sind. Die Photorezeptoren absorbieren das durch die Augenlinse fallende Licht, wandeln es über chemische Prozesse in elektrische Nervenimpulse um (Phototransduktion), die dann über den Sehnerv an das Gehirn übertragen werden.

Die gPRA bezeichnet eine heterogene Gruppe von natürlich auftretenden, vererbbaaren Netzhautdystrophien mit ähnlichem klinischen Erscheinungsbild, nämlich dem fortschreitenden Verlust der Sehkraft, verursacht durch Apoptose der Photorezeptorzellen und nachfolgender Degeneration der Retina bis zur vollständigen Erblindung im Endstadium (Clements et al. 1996, Petersen-Jones 2005, 1998). Eine Differenzierung in unterschiedliche gPRA-Formen bei verschiedenen Hunderassen erfolgt anhand des variablen Krankheitsbeginns (*age of onset*) und der unterschiedlich schnellen Progressionsrate der Photorezeptordegeneration bis zur Erblindung (Petersen-Jones 1998). Die frühe gPRA-Form oder Retina-Dysplasie ist durch eine gestörte Entwicklung der retinalen Photorezeptorzellen vor ihrer endgültigen Zelldifferenzierung im Alter von 42 bis 60 Tagen gekennzeichnet (Clements et al. 1996). Sie manifestiert sich beim erkrankten Welpen bereits in den ersten Lebenswochen durch ophthalmoskopische Veränderungen. Zudem besitzen Dysplasien schnelle Progressionsraten, die jedoch von Rasse zu Rasse variieren (Petersen-Jones 2005). Die frühe Form der gPRA ist bei den Hunderassen Irish Setter (Aguirre 1978), Collie (Wolf et al. 1978), Cardigan Welsh Corgi (Petersen-Jones et al. 1999), Norwegischer Elchhund (Acland und Aguirre 1987), Zwergschnauzer (Zhang et al. 1999), Sloughi (Dekomien et al. 2000), Pit Bull Terrier (Kijas et al. 2004) und Rauhaar-Teckel (Ropstad et al. 2007) beschrieben.

Bei der späten gPRA-Form setzt die Degeneration der Photorezeptoren meist erst nach ihrer vollständigen Ausdifferenzierung ein. Die Progressionsrate von Degenerationen ist im Vergleich zur frühen gPRA-Form langsamer, sodass erst im fortgeschrittenen Alter ophthalmoskopische Symptome zu erkennen sind. Bei späten gPRA-Formen werden auch sekundäre Veränderungen der Augenlinse beobachtet, wie z.B. die Eintrübung der Augenlinse (Katarakt; Petersen-Jones 2005, 1998). Späte gPRA-Formen treten u.a. beim Zwergpudel (Aguirre et al. 1982), Labrador Retriever (Kommonen und Karhunen 1990), Englischen und Amerikanischen Cocker Spaniel (Aguirre und Acland 1988) sowie Schapendoes (Lippmann et al. 2007) auf.

Diagnose und Untersuchungsmethoden

Unabhängig von der Klassifizierung in unterschiedliche Formen ist der klinische gPRA-Verlauf meist ähnlich. Zu Beginn sind hauptsächlich Stäbchen-Photorezeptoren betroffen, resul-

tierend in Einschränkungen beim Dämmerungssehen (Nachtblindheit). Erst im Verlauf der Erkrankung degenerieren auch zunehmend Zapfen, wodurch das Sehvermögen bei Tageslicht beeinträchtigt wird, bis im Endstadium die vollständige Erblindung eintritt.

Die gPRA-Diagnose wird anhand der Symptomatik über zwei verschiedene Untersuchungsmethoden gestellt, die indirekte Ophthalmoskopie und die Elektroretinographie. Bei der indirekten Ophthalmoskopie wird der Fundus auf gPRA-abhängige pathologische Veränderungen untersucht, die im Allgemeinen bei allen gPRA-Formen ähnlich sind (Petersen-Jones 1998) und stets bilateral auftreten. Durch den fortschreitenden Zelltod der Photorezeptorzellen bei gPRA-betroffenen Hunden kommt es zur Ausdünnung der Retina und folglich zur Reduktion der retinalen Blutgefäße im Durchmesser und Verzweigungsgrad bis zur vollständigen Atrophie. Dies führt zur Hyperreflexie des *Tapetum lucidum*, einer reflektierenden Schicht hinter der Retina. Im weiteren Verlauf der Erkrankung kommt es zu Pigment-Veränderungen des nicht-tapetalen Fundus sowie zur Atrophie des Sehnervenkopfes (*Papilla nervi optici*; Clements et al. 1996).

Die Elektroretinographie ist eine sensitive Methode zur Messung der allgemeinen Funktion der Retina und ein nützliches Werkzeug zur Untersuchung retinaler Dystrophien (Clements et al. 1996, Petersen-Jones 2005). In einem Elektroretinogramm (ERG) wird somit die lichtinduzierte elektrische Aktivität der Retina gemessen, die bei unterschiedlichen gPRA-Formen variieren kann und anhand Veränderungen der Wellenform oder Amplitude Auskunft über die betroffenen Netzhautstrukturen bzw. das Ausmaß der retinalen Dysfunktion liefert (Petersen-Jones 2005, 1998). Bei Hunden mit der klinischen Diagnose gPRA zeigt das ERG je nach Krankheitsstadium eine mehr oder weniger starke Reduktion der ursprünglichen Wellenamplitude oder ist sogar vollständig ausgelöscht (Petersen-Jones 2005). Das ERG kann noch vor Auftreten von klinischen Symptomen zur Frühdiagnose der gPRA eingesetzt werden, da elektroretinographische Veränderungen meist vor den ophthalmoskopischen auftreten (Clements et al. 1996).

Vererbung und DNA-Tests

Bei über 70 % der Hunderassen zeigt die überwiegend monogen vererbte gPRA einen autosomal rezessiven (ar) Vererbungsmodus (Clements et al. 1996, Ostrander et al. 2000). Bei der ar Vererbung tritt die gPRA nur dann auf, wenn bei einem Hund zwei mutierte Kopien des Krankheitsgens, je eines von einem Elternteil, vorliegen (homozygot). Elterntiere besitzen in diesem Fall jeweils eine defekte Genkopie und sind somit Anlageträger, welche die Mutation statistisch an die Hälfte ihrer Nachkommen weitergeben, selbst aber klinisch unauffällig sind (heterozygot). Hunde mit zwei normalen Genkopien sind klinisch gesund (homozygot Wildtyp).

In einigen Rassen wird die gPRA nicht ar vererbt. Beispiele sind der Englische Mastiff und Bullmastiff, für die ein autosomal dominanter Erbgang nachgewiesen wurde (Kijas et al. 2003, 2002) sowie der Sibirische Husky und Samojede, bei denen die gPRA einem X-gekoppelten Erbgang folgt (XL-PRA; Acland et al. 1994, Zeiss et al. 2000). Auch für Border Collies wurde anhand von ophthalmoskopischen Untersuchungen und Segregationsanalysen eine X-chromosomale Form der gPRA beschrieben (Vilboux et al. 2008). Allerdings ist die ursächliche Mutation bzw. deren Lokalisation bisher noch unbekannt. Bereits veröffentlichte Mutationen im *RPGR*-Gen, die ursächlich für XL-PRA-Formen beim Sibirischen Husky und Samojeden sind, wurden für Border Collies als Ursache ausgeschlossen. Genetisch gesehen ist die gPRA damit sehr heterogen, da sie in den unterschiedlichen Rassen durch verschiedene Mutationen in einem Gen oder in verschiedenen Genen verursacht wird. Inzwischen sind bereits in 10 verschiedenen Genen 12 Mutationen für mindestens 32 Rassen und einen Mischling beschrieben, die für das Auftreten der gPRA verantwortlich sind und mittlerweile die Entwicklung molekulargenetischer DNA-Tests ermöglicht haben (Tab. 1).

Bei DNA-Tests werden zwei Arten von Tests unterschieden: Der ‚direkte DNA-Test‘ weist die ursächliche Mutation im Gen direkt nach und besitzt daher eine hohe Spezifität. Beim ‚indirekten DNA-Test‘ beruht der Nachweis auf der Kopplung eines genetischen Markers in der Nähe des Krankheitslokus und ist somit aufgrund des möglichen Rekombinationsrisikos zwischen Marker und Krankheitslokus weniger sensitiv (Lin et al. 2002). Wesentlicher Vorteil von DNA-Tests gegenüber konventionellen klinischen Untersuchungsmethoden (indirekte Ophthalmoskopie und Elektroretinographie) ist, gPRA-betroffene Hunde noch vor Auftreten von Symptomen sowie phänotypisch unauffällige Anlageträger prädiktiv zu identifizieren (Lin et al. 2002), da sie bereits im Welpenalter durchgeführt werden können. Ein züchterischer Vorteil ist somit, dass Anlageträger gezielt mit homozygot gesunden Hunden verpaart werden können, damit bei zugrundeliegendem ar Erbgang nach den Mendelschen Vererbungsregeln in der Folgegeneration keine gPRA-erkrankten Nachkommen mehr auftreten und das gPRA-Risiko innerhalb der jeweiligen Rasse ausgeschlossen wird. Auf diese Weise können auch Anlageträger in der Zucht bleiben und zum Erhalt der genetischen Variabilität innerhalb der Rasse beitragen, was besonders für eng gezüchtete Populationen mit nur wenigen Gründertieren und ohne Einkreuzungen essentiell ist.

Y-Chromosomen sowie 76 überwiegend akrozentrischen Autosomen. Erst mit der Entwicklung der Fluoreszenz-in-situ Hybridisierung (FISH), bei der Metaphasechromosomen bzw. DNA-Loci mittels fluoreszenz-markierter Sonden direkt nachgewiesen werden, konnte man die Autosomen eindeutig voneinander unterscheiden (Breen et al. 1999).

Neben der FISH-Technologie hat eine weitere Kartierungsmethode, die Somatische Zell-Hybridisierung, wesentlich zur Identifizierung von genetischen Markern (Mikrosatellitenmarker) im Hundegenom beigetragen. Mikrosatelliten sind DNA-Sequenzen, die aus tandemartig wiederholten, simplen Basenmotiven (1-6 bp) bestehen und bei den meisten Säugetieren zufällig über das Genom verteilt, überwiegend in nicht-kodierenden Bereichen, vorkommen (Hearne et al. 1992). Die allgemeine Funktion von Mikrosatelliten ist nicht vollständig geklärt. Es wird jedoch u.a. auch eine Beteiligung an der Genregulation vermutet (Albanese et al. 2001). Aufgrund ihrer Instabilität und dem daraus resultierenden Längenpolymorphismus von Allelen sind Mikrosatelliten polymorphe Marker und daher u.a. für Kopplungsanalysen geeignet. Sie bilden die Basis zur Erstellung umfangreicher genetischer Karten mit guter genomischer Abdeckung für Mensch (Weissenbach et al. 1992) und Maus (Dietrich et al. 1996). Auch für den Hund stehen inzwischen genomweite Sammlungen polymorpher Mikrosatellitenmarker für Kartierungsanalysen im Hundegenom zur Verfügung (Richman et al. 2001, Guyon et al. 2003, Sargan et al. 2007).

Genomsequenz und ihre Charakteristika

Mit der Identifizierung der caninen Genomsequenz wurde die vollständigste physikalische Genom-Karte für genetische Analysen beim Hund verfügbar. Das Genom des Hundes ist neben Mensch, Maus, Ratte und Schimpanse eines der ersten Säugetiergenome, die fast vollständig sequenziert wurden. In 2003 wurde eine 1,5fache Genomsequenz eines männlichen Standard-Pudels publiziert, die 80 % des Genoms abdeckte (Kirkness et al. 2003). Im Zuge eines zweiten zeitgleich durchgeführten Genomprojekts wurde zwei Jahre später eine 7,5fach assemblierte Gesamtgenom-*shotgun*-Sequenz eines weiblichen Boxers (Rasse mit der vergleichsweise größten genetischen Homogenität von insgesamt 60 getesteten Rassen) veröffentlicht. Diese deckt ~99 % des euchromatischen Hunde-Genoms ab und macht somit viele Charakteristika des caninen Genoms deutlich sowie experimentell zugänglich (Lindblad-Toh et al. 2005). Die Größe des haploiden caninen Genoms wird auf 2,41 Gigabasen (Gb) geschätzt und ist damit um etwa 18 % kleiner als das menschliche Genom (2,9 Gb; Venter et al. 2001). Der Größenunterschied ist teilweise auf den geringeren Anteil repetitiver Sequenzen im Hundegenom von nur 34 % gegenüber 46 % im humanen Genom zurückzuführen. Sequenzvergleiche haben nachgewiesen, dass das Hundegenom eine größere Homologie zum humanen Genom aufweist als dasjenige der Maus (Kirkness et al. 2003, Lindblad-Toh et al. 2005). Fast alle der in der aktuellen Hundegenom-Sequenz

identifizierten Gene sind homolog zu bekannten menschlichen Genen. Außerdem wurden im sequenzierten Boxer-Genom sowie in 6 % der Genome von 10 weiteren Hunderassen Kopplungsungleichgewichte (*linkage disequilibrium*, LD) von mehreren Megabasen (Mb) innerhalb einer Rasse identifiziert, jedoch nur kürzere Abschnitte von wenigen kb zwischen verschiedenen Rassen. Diese bimodale Struktur der LDs bzw. Haplotypen ist auf die Intensität und Dauer der beiden wesentlichen Populationsflaschenhals-Ereignisse (1. frühe Domestikation, 2. relativ zeitnahe Rassegründungen) innerhalb der Entstehungsgeschichte der modernen Hunderassen zurückzuführen (Kirkness et al. 2003, Lindblad-Toh et al. 2005). Durch die Domestikation des grauen Wolfs (vor 7.000-20.000 Generationen) entstanden frühe Hundepopulationen mit kurzen LD-Einheiten. Dagegen sind die Rassegründungen (vor 50 bis 100 Generationen) verantwortlich für die in einzelnen Rassen vorherrschenden langen LD-Strukturen. Durch die intensive Selektion gemäß dem Rassestandard wurde nur eine kleine Teilmenge an Hunden bzw. Chromosomen aus der verfügbaren Population domestizierter Hunde für Reproduktionen ausgewählt. Diese verfügen über lange LD-Einheiten und führen somit zu langen LDs innerhalb von Rassen, die in der kurzen Zeit seit den Rassegründungen noch nicht durch Rekombinationsereignisse zerstört wurden (Karlsson und Lindblad-Toh 2008).

SNPs und canine *microarrays*

Mit Sequenzanalysen des caninen Genoms wurden durch Vergleiche mit 11 verschiedenen Hunderassen genomweit 2,5 Millionen Einzelnukleotidpolymorphismen (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs) identifiziert (Lindblad-Toh et al. 2005). SNPs sind über das gesamte canine Genom verteilte Sequenzvariationen, die eine höhere Dichte als Mikrosatelliten aufweisen, wodurch der geringere Informationsgehalt eines biallelischen SNP-Markers gegenüber einem multiallelischen Mikrosatelliten kompensiert wird. Insgesamt weist die verfügbare SNP-Karte eine hohe Verteilung von ~1 SNP pro 900 bp zwischen Rassen gegenüber ~1 SNP pro 1.500 bp innerhalb einer Rasse auf, weshalb sie für SNP-Kartierungsanalysen auch in verschiedenen Rassen geeignet ist (Lindblad-Toh et al. 2005). Simulationsstudien haben gezeigt, dass für genomweite Assoziationsstudien beim Menschen mehrere 100.000 Marker untersucht werden müssen (Kruglyak 1999). Da LDs beim Hund um das 10 bis 100fache größer sind als beim Menschen, werden für vergleichbare Studien beim Hund weniger als 30.000 Marker benötigt (Karlsson et al. 2007, Lindblad-Toh et al. 2005, Sutter und Ostrander 2004). Außerdem ist aufgrund des vermehrten Auftretens von gemeinsamen Haplotypen zwischen verschiedenen Rassen anzunehmen, dass die Entwicklung eines universellen SNP-Sets für Studien in vielen verschiedenen Rassen ausreicht (Sutter und Ostrander 2004). In 2007 wurde in Kooperation mit Affymetrix der erste genomweite SNP Genotypisierungs-*microarray* mit ausreichender SNP-Abdeckung (n = 27K) für genomweite

Assoziationsstudien in Hunderassen entwickelt (Karlsson et al. 2007). Bis heute sind insgesamt vier verschiedene genomweite SNP-*microarrays* unterschiedlicher Hersteller verfügbar: zwei Affymetrix *microarrays* mit 26.578 (27K) bzw. 49.663 (50K) SNPs sowie zwei illumina *microarrays* mit 22.362 bzw. >170K SNPs. Diese Werkzeuge liefern eine wichtige Basis für Kartierungen verschiedenster Merkmale in unterschiedlichen Hunderassen.

Neben *microarrays* für genomweite SNP-Genotypisierungen stehen für den Hund u.a. auch cDNA-*microarrays* zur Identifizierung krankheitsbedingter Änderungen von Genexpressionsspiegeln in einer oder mehreren Gewebsart(en) zur Verfügung, wie z.B. retinale cDNA-*microarrays* für Retina und Gehirn (Paez et al. 2006). Durch den Vergleich der Genexpressionsprofile bei Erkrankten mit denen bei Gesunden (Kontrollen) lassen sich anhand unter- bzw. überexprimierter Transkripte beim Krankheitsphänotyp Kandidatengene identifizieren, die der Pathophysiologie einer bestimmten Erkrankung zugrunde liegen.

Strategien zur Identifikation von Krankheitsgenen

Um das Auftreten von Erkrankungen bei Hunderassen zu verhindern und geeignete Tiermodelle für Therapieansätze humaner Erbkrankheiten zu finden, ist es notwendig, die zugrundeliegende pathogene Mutation zu lokalisieren und zu identifizieren. Dafür haben sich verschiedene methodische Ansätze durchgesetzt: 1. die Familien-basierte Kopplungsanalyse, die über die Kopplung des Krankheitslokus mit einem bekannten Marker eine grobe Lokalisation desselben im Genom liefert, 2. die funktionelle Kandidatengenanalyse, bei der Mutationen in Krankheits-relevanten Kandidatengenen gesucht werden. Seit wenigen Jahren bieten canine SNP-*microarrays* neben diesen klassischen Methoden ein weiteres wichtiges Werkzeug für genomweite Assoziationsstudien und Homozygotie-Kartierungen zur Suche nach kausalen Mutationen von caninen Erbkrankheiten.

Familien-basierte Kopplungsanalyse

Die Familien-basierte Kopplungsanalyse ist ein Kartierungsverfahren für krankheitsverursachende Gene, deren Lokalisation über die gemeinsame Vererbung polymorpher Marker in einer Chromosomenregion bestimmt wird. Dazu werden zunächst genetische Marker in Mehrgenerationenstammbäumen mit erkrankten Individuen untersucht, um einen Marker zu identifizieren, der mit der Erkrankung kosegregiert bzw. gekoppelt ist. Im Folgenden wird diese Kandidatenregion mit zusätzlichen Markern feinkartiert, um die Auflösung zu erhöhen, sodass schließlich innerhalb dieser eingegrenzten Region entsprechende Kandidatengene, ausgewählt nach Struktur und Funktion, untersucht werden können (Aguirre-Hernandez und Sargan 2005). Aufgrund ihrer einzigartigen Zuchtstruktur weisen Hundepopulationen oft nur ein einziges krankheitsverantwortliches Mutationsallel auf und sind deshalb gut geeignet für genetische Kopplungsanalysen (Ostrander und Kruglyak 2000).

Eine Kopplung zweier Genorte, z.B. Krankheitsgen und Markerloкус, liegt dann vor, wenn sie überzufällig häufig als vermutet miteinander vererbt werden (Lin et al. 2002) und keine Neukombination beider Loci durch Rekombinationsereignisse während der Meiose stattfindet. Je dichter der untersuchte Marker am Krankheitsloкус lokalisiert ist, umso größer ist die Wahrscheinlichkeit einer gemeinsamen Vererbung bzw. Kopplung beider Loci. Der statistische Nachweis einer Kopplung zweier Loci erfolgt über die Berechnung des LOD (*logarithm of the odds*)-Scores. Dabei wird das Verhältnis der Wahrscheinlichkeit, dass beide Loci gekoppelt sind, zu der Wahrscheinlichkeit, dass keine Kopplung vorliegt und sie unabhängig voneinander vererbt werden, bestimmt. Wird dabei ein LOD-Score > 3 ermittelt, kann eine Kopplung dieser Loci als signifikant angenommen werden. Eine Vielzahl Familien-basierter Kopplungsanalysen wurde zur Lokalisierung diverser Krankheiten im Hundegenom bereits erfolgreich durchgeführt, u.a. auch für Augen-Erkrankungen wie *progressive rod cone degeneration* (prcd), *early retinal degeneration* (erd), *cone degeneration* (cd), *collie eye anomaly* (cea), *rod cone dysplasia type 2* (rcd2) und gPRA beim Schapendoes (Acland et al. 1999, 1998, Sidjanin et al. 2002, Lowe et al. 2003, Kukekova et al. 2006, Lippmann et al. 2007).

Funktionelle Kandidatengenanalyse

Die funktionelle Kandidatengenanalyse hat zum Ziel, Mutationen in potentiellen Kandidatengen zu identifizieren, die dann im Hinblick auf mögliche Konsequenzen in Struktur und Funktion sowie deren Pathophysiologie näher analysiert werden können. Entsprechende Kandidatengene sind Gene, die in dem betroffenen Gewebe oder Organ exprimiert werden, in Signalkaskaden der Pathophysiologie der zu untersuchenden Erkrankung involviert oder in anderen Spezies ursächlich für eine Erkrankung mit ähnlichem Phänotyp sind (Aguirre-Hernandez und Sargan 2005). Die Kandidatengenanalyse kann auch im Anschluss an eine zuvor durchgeführte Familien-basierte Kopplungsanalyse samt Feinkartierung des gekoppelten Krankheitsloкус erfolgen, sodass dann ausschließlich die Kandidatengene innerhalb dieser eingegrenzten Haploblock-Region analysiert werden. Eine Vielzahl funktioneller Kandidatengenanalysen zur Mutationsidentifikation retinaler Erkrankungen sind bereits durchgeführt worden, davon konnte allerdings nur in 3,4 % aller Studien die Mutation erfolgreich beschrieben werden. Im überwiegenden Anteil an Kandidatengenanalysen (60,2 %) konnten Gene aufgrund der dort identifizierten Mutationen als Krankheitsursache lediglich ausgeschlossen werden. Der Ausschluss von Kandidatengen erfolgt über intragenische Sequenzvarianten, die anhand ihrer Verteilung bei erkrankten und gesunden Individuen angeben, ob das untersuchte Gen von pathogener Bedeutung für die betreffende Erkrankung ist (Aguirre-Hernandez und Sargan 2005). Bei ar vererbten Krankheitsmerkmalen kann eine heterozygote Allelverteilung für intragenische Sequenzvarianten bei

erkrankten Individuen als Ausschlusskriterium für das untersuchte Gen dienen, da bei einem ar Vererbungsmodus, wie zuvor beschrieben, für Erkrankte homozygote Genotypen zu erwarten sind (Dekomien und Epplen 2000, Lin et al. 2002).

Genomweite Assoziationsstudien

Besonders nützlich haben sich SNP-*microarrays* für genomweite Assoziationsstudien erwiesen, bei denen eine Kohorte erkrankter Hunde mit unverwandten, gesunden Kontrollhunden einer Rasse verglichen werden. Dieser methodische Ansatz eignet sich auch besonders für Analysen eines Merkmals, welches vielen verschiedenen Rassen gemeinsam ist. So konnten in einigen Studien sowohl morphologische Merkmale als auch Krankheitsassoziierte Merkmale erfolgreich kartiert werden, wie die ‚weiße Fellfarbe‘ bei Boxern und Bull Terriern (Karlsson et al. 2007), der Ridgeless-Phänotyp in Rhodesian und Thai Ridgebacks (Salmon Hillbertz et al. 2007), die mit Haarlosigkeit assoziierte canine ektodermale Dysplasie bei Chinesischen Nackthunden (Drögemüller et al. 2008), Fell-Variationen (Cadieu et al. 2009) sowie Chondrodysplasie (Kurzbeinigkeit; Parker et al. 2009) und Brachycephalie (Kurzköpfigkeit; Bannasch et al. 2010) bei verschiedenen Rassen, die Faltenbildung der Haut bei Shar Peis (Akey et al. 2010) sowie die *crd*-gPRA bei Rauhaar-Teckeln (Wiik et al. 2008), die degenerative Myelopathie in verschiedenen Rassen (Awano et al. 2009) und die arrhythmogene rechtsventrikuläre Dysplasie bei Boxern (Meurs et al. 2010).

Homozygotie-Kartierung

Eine ebenso effektive Methode, um das verantwortliche Gen einer seltenen, rezessiven Erkrankung (z.B. gPRA) in konsanguinen Familien zu kartieren, ist die Homozygotie-Kartierung nach Lander und Botstein (1987). Diese Methode basiert auf dem Prinzip, genomische Kandidatenregionen zu definieren, in denen alle oder eine gegebene Anzahl der untersuchten betroffenen Individuen Homozygotie aufweisen.

Bei autosomal rezessiven Erbkrankheiten kann in der Regel angenommen werden, dass ingezüchtete Erkrankte zwei ‚rezessive‘ Kopien des Krankheitsallels von einem gemeinsamen Vorfahren, also identisch-durch-Abstammung (*identical-by-descent*, IBD), erhalten haben. Kurze chromosomale Bereiche werden normalerweise nicht durch Crossing-over-Ereignisse rekombiniert und daher mit hoher Wahrscheinlichkeit als Ganzes vererbt. Daher weisen betroffene Individuen einen homozygoten Genotyp sowohl für die ursächliche Mutation als auch für alle die Mutation flankierenden DNA-Marker auf (Woods et al. 2006), sodass sich Haplotypen in homozygoter Konstellation formulieren lassen. Der wesentliche Vorteil der Homozygotie-Kartierung ist, dass zunächst nur betroffene Individuen genomweit typisiert werden müssen, um Kandidatenregionen zu lokalisieren (Genin et al. 1998). Erst im nachfol-

genden Schritt werden die übrigen (verfügbaren) Familienmitglieder untersucht, jedoch nur für die identifizierten Kandidatenregionen, in denen alle Erkrankten Homozygotie zeigen. Aufgrund der Engzucht in Hunderassen sind diese mit konsanguinen Familien beim Menschen zu vergleichen. Allerdings liegt die Konsanguinität bei Hunderassen normalerweise weiter zurück (meist mehrere Generationen) als beim Menschen, was die statistische Wahrscheinlichkeit von auftretenden Rekombinationsereignissen erhöht. Aus diesem Grund besitzt identifizierte Homozygotie in Erkrankten mit weit zurückliegender Verwandtschaft zum gemeinsamen Vorfahren einen größeren Informationsgehalt (Genin et al. 1998). Da die durchschnittliche Länge der vom gemeinsamen Vorfahren vererbten, homozygoten Region vom Grad der Verwandtschaft abhängig ist, lässt sich der Krankheitslokus in Hunderassen folglich präziser lokalisieren als beim Menschen. Bisher sind beim Hund zwei Studien bekannt, die mittels Homozygotie-Kartierung die Kandidatenregionen und durch weiterführende Analysen die krankheitsverursachenden Mutationen für die Osteogenesis imperfecta (Glasknochenkrankheit) bei Teckeln (Drögemüller et al. 2009) und die Polyneuropathie in Greyhounds (Drögemüller et al. 2010) identifizieren konnten.

Zielsetzungen dieser Arbeit

Zum Verständnis genealogischer Abstammung von Zuchtpopulationen wurden Vererbungslinien einer Kohorte von deutschen Weimaranerrüden untersucht. Dazu wurden mtDNA und Y-chromosomale Marker analysiert, um die minimale Anzahl männlicher und weiblicher Vorfahren dieser Population sowie die Genauigkeit der historischen Stammbücher abzuschätzen. Zum Vergleich wurden für die gleichen Marker zusätzlich 26 weitere Hunderassen aus 9 von 10 FCI-Gruppen und vier Wölfe untersucht (Kapitel 1).

Ein weiteres Ziel war die genetische Ursache der ar vererbten gPRA verschiedener Hunderassen im Hundegenom zu lokalisieren und zu identifizieren. Dazu wurden zunächst Mikrosatellitenmarker-basierte Kopplungsanalysen 15 ausgewählter Kandidatengene, in denen Retinitis pigmentosa verursachende Mutationen beschrieben waren, in Mehrgenerationenstammbäumen fünf verschiedener Hunderassen durchgeführt. Da für keines dieser Gene Markerkopplung mit der gPRA identifiziert werden konnte, erfolgten für drei dieser Rassen systematische Familien-basierte Kopplungsanalysen mit 544 autosomalen Mikrosatellitenmarkern (311 Marker des MSS-2 und 233 ergänzende Marker) im gesamten Hundegenom. Stammbaumanalysen zum Nachweis von Rekombinationsereignissen zwischen Marker- und gPRA-Lokus sowie statistische LOD-Score Abschätzungen dienten zum Ausschluss der analysierten Mikrosatellitenmarker hinsichtlich einer Kopplung mit der gPRA-Region in allen drei untersuchten Hunderassen (Kapitel 2).

Mit der Identifizierung der Hundegenom-Sequenz wurden mehr als 2,5 Millionen SNPs verfügbar, welche die Grundlage zur Entwicklung von caninen SNP-*microarrays* lieferten.

Folglich wurde als zweite Strategie zur Identifikation der gPRA-verursachenden Mutation eine SNP-*microarray* basierte Homozygotie-Kartierung in vier verschiedenen Hunderassen durchgeführt. Die dadurch identifizierten chromosomalen Kandidatenregionen wurden durch Feinkartierungsanalysen zusätzlicher Mikrosatellitenmarker weiter eingegrenzt bzw. aufgrund von Stammbaumanalysen als putative gPRA-Region ausgeschlossen. In eingegrenzten Kandidatenregionen wurden Gene analysiert, die in der Retina exprimiert oder mit humanen retinalen Erkrankungen assoziiert waren. Nach Identifizierung des gPRA-assoziierten Kandidatengens für eine der Rassen wurden weiterführende Mutations-, cDNA-, Protein- sowie immunhistochemische Analysen angeschlossen (Kapitel 3).

Kapitel 1

Genealogische Abstammung von Rassehunden – insbesondere von Weimaraner Jagdhunden

Regina Kropatsch¹, Kathrin Streitberger², Tobias Schulte-Middelmann¹, Gabriele
Dekomien¹, Jörg T. Epplen¹

¹ Humangenetik, Ruhr-Universität, Bochum

² Institut für Spezielle Zoologie und Evolutionsbiologie mit Phyletischem Museum,
Friedrich-Schiller-Universität, Jena

Publiziert im Journal of Animal Breeding and Genetics (2011) 128:64-72

1.1. Einleitung

Rassehunde (*Canis familiaris*) zeigen eine enorme Variabilität phänotypischer Merkmale, wie Größe, Form, Fellfarbe, Felllänge und Verhalten, als Ergebnis zielgerichteter Selektionen während den Rassegründungen in den letzten Jahrhunderten (Lindblad-Toh et al. 2005, Parker et al. 2004, Sundqvist et al. 2006). Tatsächlich sind Hunde die phänotypisch vielfältigste Spezies von allen (domestizierten) Tieren. Mehr als 400 verschiedene Rassen sind weltweit bekannt, davon sind 357 (Stand November 2010) bei der *Fédération Cynologique Internationale* (FCI) als Rassen anerkannt. Diese werden in 10 Gruppen verwandter Rassen entsprechend ihres geographischen Ursprungs, ihrer Morphologie oder ihrer Funktion bei menschlichen Aktivitäten zusammengefasst.

Der Weimaraner, eine Jagdhundrasse, die ursprünglich als Weimaraner Vorstehhund bezeichnet wurde, ist der FCI Gruppe 7 (Vorstehhunde) zugehörig. Diese Gruppe umfasst 36 Rassen von 12 verschiedenen Ländern, entsprechend ihres Rassestandards. Der Weimaraner ist eine vergleichsweise alte Rasse von Jagdhunden mit Ursprung in Deutschland, wo 1878 der Rassestandard zum ersten Mal schriftlich niedergelegt wurde (Schmidt 1989). Diese Rasse besteht aus zwei Varietäten mit unterschiedlicher Fellstruktur (Schrameyer et al. 2005), die gebräuchlichere Kurzhaar- (KH) und die Langhaar-Varietät (LH). Weimaraner werden für viele Zwecke zentraleuropäischer Jäger gezüchtet und dienen als interessantes Modell für genetische Analysen bei Arbeitshunden.

Phylogenetische Studien zeigen, dass Rassehunde von ihrem wilden Vorfahren, dem grauen Wolf (*Canis lupus*), vor mindestens 15.000 Jahren (Boyko et al. 2009, Olsen 1985, Savolainen et al. 2002, Vila et al. 1997) im Süden Chinas (Pang et al. 2009) oder im Mittleren Osten (VonHoldt et al. 2010) domestiziert wurden. Die Spezies Hund wurde aber nicht nur bezüglich ihres geographischen Ursprungs (Leonard et al. 2002, Savolainen et al. 2002), sondern auch hinsichtlich ihrer Evolution (Tsuda et al. 1997, Vila et al. 1997) und erfolgter Rückkreuzungsereignisse mit wilden Caniden (Vila et al. 2005) genetisch analysiert. Diese populationsgenetischen Studien basieren hauptsächlich auf Analysen der mtDNA mit ausschließlich mütterlicher Vererbung, die damit nur Rückschlüsse auf den mütterlichen Genfluss innerhalb und zwischen Hunderassen sowie wilden Caniden erlauben. Ergänzend dazu wurden einige Y-Chromosom-basierende Studien veröffentlicht (Bannasch et al. 2005, Parra et al. 2008, Sundqvist et al. 2006), welche evolutionäre Ereignisse in den väterlichen Linien von Hunderassen widerspiegeln. Kürzliche Studien, die auf der Analyse von autosomalen Mikrosatellitenmarkern basierten, identifizierten einen hohen Grad an Heterogenität in allen untersuchten Rassen, einschließlich den Weimaranern (Irion et al. 2003, Schrameyer et al. 2005). Wegen der vergleichsweise hohen Mutationsrate von autosomalen Mikrosatellitenmarkern sind diese Marker für phylogenetische Studien weniger geeignet (Irion et

al. 2003) und somit auch nicht informativ hinsichtlich der Frage nach männlichen und weiblichen Vorfahren.

Im Gegensatz dazu liefern Analysen von Y-chromosomalen und mtDNA-Haplotypen neben Informationen über die genetische Variabilität innerhalb einer bzw. zwischen Rasse(n) auch Aussagen über die geschlechtsspezifische Verteilung zur Zeit der Rassegründungen. Deshalb wurden die genetischen Verwandtschaften einer Kohorte aus 34 männlichen deutschen Weimaranern, basierend auf mtDNA und Y-chromosomalen Markern, untersucht, um die minimale Anzahl an männlichen und weiblichen Vorfahren abzuschätzen. Gleichzeitig konnte auf diese Weise die Richtigkeit der historischen Zuchtbücher überprüft werden. Zum Vergleich wurde das gleiche Marker-Set in 26 zusätzlichen Hunderassen aus 9 von 10 FCI-Gruppen und in vier Wölfen charakterisiert.

1.2. Material und Methoden

1.2.1. Proben

Die untersuchte Kohorte umfasste 111 männliche Individuen und zwei weibliche Kontrollhunde, zugehörig zu 27 Hunderassen aus 9 von 10 FCI-Gruppen (Gruppe 1: Australian Cattle Dog, Berger des Pyrénées, Kuvasz, Saarloos Wolfhunde, Schapendoes; Gruppe 2: Dobermann, Entlebucher Sennenhund, Tibet Mastiff, Shar Pei, Deutscher Pinscher, Zwergschnauzer, Mittelschnauzer, Riesenschnauzer; Gruppe 3: Airedale Terrier; Gruppe 4: Teckel; Gruppe 5: Chow Chow; Gruppe 7: Irish Setter, Große Münsterländer, Weimaraner; Gruppe 8: Cocker Spaniel, Golden Retriever, Labrador Retriever; Gruppe 9: Zwergpudel, Tibet Terrier; Gruppe 10: Barsoi, Saluki, Sloughi), sowie vier graue Wölfe aus einer freilebenden Population in Rumänien.

Im Einzelnen wurden 34 männliche Weimaraner (11 KH und 23 LH) verschiedener deutscher Stammbaumlinien einer zuvor durchgeführten Studie (Schrameyer et al. 2005) und 77 Rüden aus 26 Rassen (durchschnittlich drei Individuen pro Rasse) sowie vier Wölfe für Y-chromosomale Marker und mtDNA charakterisiert. Dazu wurde die genomische DNA aus peripheren Blutzellen und Muskelgewebe nach Standardprotokollen isoliert (Miller et al. 1988). Die Blutproben wurden in Kooperation mit den entsprechenden Zuchtvereinen von den Hundebesitzern und die Muskelproben der Wölfe von Forschern aus Rumänien zur Verfügung gestellt.

1.2.2. Marker und DNA-Amplifizierung

Insgesamt wurden neun Marker des caninen Y-Chromosoms ausgewählt. Fünf Einzel-nukleotidpolymorphismen (SNPs; Natanaelsson et al. 2006) und vier Mikrosatellitenmarker (Bannasch et al. 2005, Natanaelsson et al. 2006) wurden mit entsprechenden PCR-Primern (Tab. A1) in einem Thermocycler (Biometra) bei *Annealing*-Temperaturen von 59 bis 60°C

amplifiziert. Detaillierte Beschreibungen der Mikrosatelliten- bzw. SNP-Analyse sind in Kapitel 2 und 3 zu finden. Die verwendeten Enzyme für die Restriktion der SNPs sind Tab. A1 zu entnehmen.

1.2.3. Sequenzanalysen der mitochondrialen DNA

Für die Sequenzierung der mtDNA wurden neben der hoch variablen *D-Loop*-Region auch konservierte, kodierende Bereiche des Mitochondriums untersucht, zum einen als interne Kontrolle, zum anderen, um regionsabhängige Substitutionsraten zu bestätigen. Dazu wurde ein Fragment der caninen mtDNA (NCBI Accession: U96639; 1.947 bp), welches das *ATP synthase subunit 6* Gen, ein Segment des 3'-Endes des *ATP synthase subunit 8* Gens, einen Teil des 5'-Endes des *cytochrome c oxidase subunit 3* Gens, einen Bereich des *cytochrome b* Gens einschließlich des 3'-Endes und einen Teil der caninen mt *D-Loop*-Sequenz (15.458-16.124 bp) umfasst, mit verschiedenen Primerpaaren amplifiziert (Tab. A2) und auf dem Kapillarsequenzierer (MegaBACE 1000, GE Healthcare) analysiert. Für die Amplifikation der *D-Loop*-Region wurden die Primersequenzen von Parra et al. (2008) verwendet. Die identifizierten mtDNA-Sequenzen wurden mit bereits veröffentlichten Daten der NCBI-Datenbank (*National Center for Biotechnology Information*; www.ncbi.nlm.nih.gov/) verglichen.

1.2.4. Statistische Analysen

Um genealogische Verwandtschaftsbeziehungen von 27 Rassen und vier Wölfen abzuschätzen, wurden Y-chromosomale und mtDNA-Haplotypen nach den Algorithmen der Maximum-Parsimonie-Methode (Templeton et al. 1992) mit dem Programm TCS 1.21 (Clement et al. 2000) zu statistischen Netzwerk-Darstellungen verrechnet. Für die Konstruktion dieser Parsimonie-Netzwerke verwendet das Programm das Prinzip der ‚logischen Sparsamkeit‘ als Bewertungskriterium. Dabei wird diejenige Topologie eines Netzwerks gesucht, zu deren Erstellung die geringste Anzahl an Mutationsschritten erforderlich ist. Als Schwellenwert für die statistische Abschätzung wurde der vorgegebene Standardwert von 0,95 verwendet, der die maximale Anzahl an Mutationsschritten zwischen DNA-Sequenzen unter Berücksichtigung des Parsimonie-Kriteriums (Templeton et al. 1992) erlaubt. Die Berechnung des so genannten Außengruppengewichts des ursprünglichsten Haplotypen erfolgte vom TCS Programm nach dem Prinzip der Koaleszenztheorie (Castelloe und Templeton 1994). Dabei wird die Herkunft einer Population von Genen bzw. DNA-Sequenzen theoretisch abgeschätzt, indem diese (entgegen der Zeit im Familienstammbaum) bis zu dem Zeitpunkt zurück verfolgt werden, an dem sie nur noch einen gemeinsamen Vorfahren haben (Kingman 2000).

1.3. Ergebnis

1.3.1. Y-chromosomale und mtDNA-Variabilität bei Weimaranern

Um die Genauigkeit der historischen Stammbuch-Informationen der derzeitigen Weimaraner-Population in Deutschland zu überprüfen, wurden Y-chromosomale Polymorphismen und mtDNA-Sequenzen untersucht. Die Analyse der Y-chromosomalen Marker zeigte, dass drei der neun Marker in allen 34 Weimaranerrüden monomorph waren. Mit den verbleibenden sechs informativen Markern konnten vier Y-chromosomale Haplotypen bzw. väterliche Vererbungslinien identifiziert werden, wobei Haplotyp Y2 bei allen Weimaranern am häufigsten auftrat (50 %; Tab. 1.1), Haplotypen Y1 und Y3 dagegen nur bei KH-Weimaranern vorkamen. Außerdem wurden in der Weimaraner-Population drei verschiedene mtDNA-Haplotypen bzw. mütterliche Vererbungslinien identifiziert. Davon wurden zwei Haplotypen (M1, M2) nur bei Weimaranern beobachtet, wovon M1 mit 67,7 % der häufigste Haplotyp in dieser Rasse war (Tab. 1.1). Der dritte Haplotyp M3 unterscheidet sich von M2 nur in einer einzigen Position (Nukleotid 8.479) im *ATP synthase subunit 6* Gen. Intensive Datenbank-Recherchen zeigten, dass dieser Austausch spezifisch für Weimaraner ist. In Bezug auf die Korrektheit der alten Weimaraner Stammbuch-Informationen wurden Unstimmigkeiten in einigen wenigen Mütter- und Väterlinien nachgewiesen, bei denen die historischen Einträge bzw. Verwandtschaftsbeziehungen anhand von Y-chromosomalen und mtDNA-Daten nicht bestätigt werden konnten.

Tabelle 1.1 Haplotypen Verteilung von Y-chromosomalen Markern und mtDNA-Sequenzen in der untersuchten Weimaraner-Population. Y-chromosomale Haplotypen bestehen aus der Marker-Kombination *Ydog28-Ydog21-Ydog20-41B-MS650-MS466*.

Haplotyp	Y-chromosomal (%)	mtDNA (%)
Y1	7 (20,6)	
Y2	17 (50,0)	
Y3	3 (8,8)	
Y4	7 (20,6)	
M1		23 (67,7)
M2		6 (17,6)
M3		5 (14,7)
Σ Individuen	34	34

Vergleiche der mit *D-Loop*-Sequenzen von in dieser Studie untersuchten Vorstehhunderassen (Weimaraner, Große Münsterländer) mit einigen Vorstehhunderassen aus Spanien (Deutsch Kurzhaar-Pointer, Deutsch Drahthaar, Epagneul Breton, English Pointer, English Setter; Parra et al. 2008) zeigten verschiedene Haplotypen, wobei insgesamt 25 polymorphe Sequenzpositionen gefunden wurden, die beiden Studien gemeinsam sind (Tab. A3). Vierzehn der in dieser Studie identifizierten Nukleotidvariationen der mit *D-Loop*-Sequenzen sind nicht für die Vorstehhunderassen aus Spanien beschrieben. Dagegen waren fünf variable Positionen, die in spanischen Vorstehhunderassen nachgewiesen wurden (Parra et al. 2008), nicht für die beiden in dieser Studie untersuchten deutschen Vorstehhunderassen nachweisbar.

1.3.2. Y-chromosomale und mtDNA-Polymorphismen bei allen 27 Hunderassen

Die Analyse der sechs Y-chromosomalen Marker ergab für die untersuchten 27 Hunderassen insgesamt 18 verschiedene Haplotypen sowie allgemeine Diversität Y-chromosomaler Haplotypen (Tab. 1.2). Diese wurde auch für Rassen der gleichen FCI-Gruppe nachgewiesen, und zwar jeweils sieben unterschiedliche Haplotypen (38,9 %) in FCI-Gruppe 2 (acht Rassen) und FCI-Gruppe 7 (drei Rassen; Tab. 1.2). Zusätzlich gab es auch Y-chromosomale Haplotypen, die Rassen unterschiedlicher FCI-Gruppen gemeinsam waren. Haplotyp Y2 wurde in acht Rassen von fünf verschiedenen FCI-Gruppen nachgewiesen (Tab. 1.2). Im Gegensatz dazu wurden auch einige Y-chromosomale Haplotypen gefunden, die spezifisch für eine einzige Rasse waren. Insgesamt zeigten acht Rassen (Berger des Pyrénées, Dobermann, Tibet Mastiff, Shar Pei, Große Münsterländer, Weimaraner, Tibet Terrier, Saluki) 10 einzigartige Haplotypen (56 % aller Haplotypen), ebenso wie die vier untersuchten Wölfe mit zwei eigenen Haplotypen (Tab. 1.2).

Parsimonische Netzwerk-Analysen, basierend auf Y-chromosomalen Haplotypen, lieferten ein unaufgelöstes Netzwerk mit drei Schleifen (*loops*), da mehrere mögliche Verbindungen (Homoplasien) parallel dargestellt wurden. Zudem wies das Netzwerk mehrere Knotenpunkte mit mehr als drei Ästen auf (Multifurkationen; Abb. 1.1A). Haplotyp Y2 wurde als Wurzel mit dem höchsten Außengruppengewicht errechnet. Dieser Haplotyp wurde zudem als der häufigste Haplotyp bei verschiedenen Rassen identifiziert, gefolgt von Haplotypen Y12 und Y13.

Tabelle 1.2 Verteilung der mtDNA- und Y-chromosomalen Haplotypen von vier Wölfen und 27 Hunderassen entsprechend ihrer FCI-Gruppen-Zugehörigkeit. Rasse-spezifische Haplotypen sind durch fettgedruckte und die häufigsten Haplotypen verschiedener FCI-Gruppen durch unterstrichene und/oder kursive Beschriftungen gekennzeichnet.

FCI-Gruppen	Hunderassen (n=111) / Wölfe (n=4)	mtDNA-Haplotypen	Y-chromosomale Haplotypen
1	Australian Cattle Dog (AC, n=2)	<u>M7</u> , M14	Y5
	Berger des Pyrénées (BDP, n=3)	<i>M5</i> , M16 , M17	Y6
	Kuvasz (Ku, n=3)	M27 , M28 , M29	<u>Y2</u> , Y4
	Saarloos Wolfhund (Sa, n=6)	M4 , M39	Y8
	Schapendoes (SD, n=3)	M13, M41 , M42	<u>Y2</u> , Y15
2	Dobermann (Do, n=2)	M22 , M23	Y9
	Entlebucher Sennenhund (En, n=3)	<u>M6</u>	Y10
	Tibet Mastiff (MT, n=1)	M37	Y14
	Shar Pei (Sh, n=5)	M43 , M44 , M45 , M46 , M47	Y16
	Deutscher Pinscher (Pin, n=3)	M11, M13, M38	Y12
	Zwergschnauzer (MSZ, n=4)	M8, M10, M32 , M33	Y12, Y13
	Mittelschnauzer (MS, n=5)	M3, M34 , M35 , M36	Y13
	Riesenschnauzer (MSR, n=2)	<u>M7</u> , M12	Y4, Y13
3	Airedale Terrier (AT, n=2)	M8, M12	<u>Y2</u>
4	Teckel (Te, n=3)	<u>M6</u> , M10, M51	Y10, Y15
5	Chow Chow (Ch, n=5)	M9, M19 , M20 , M21	Y5
7	Irish Setter (IRS, n=2)	M25 , M26	Y12, Y13
	Großer Münsterländer (GM, n=6)	<u>M7</u> , M8, M24	<u>Y2</u> , Y11
	Weimaraner (W, n=34)	M1 , M2 , M3	Y1 , <u>Y2</u> , Y3 , Y4
8	Cocker Spaniel (C, n=1)	M18	Y8
	Golden Retriever (Lg, n=2)	<i>M5</i> , M30	Y12
	Labrador Retriever (LR, n=1)	M31	Y8
9	Zwergpudel (ZP, n=3)	M9, M11, M59	<u>Y2</u>
	Tibet Terrier (TT, n=3)	M52 M53 M54	Y17 , Y18
10	Barsoi (Bar, n=2)	<u>M6</u> , M15	<u>Y2</u>
	Saluki (Sal, n=2)	<i>M5</i> , M40	Y7
	Sloughi (Sl, n=3)	M48 M49 , M50	<u>Y2</u>
	Wolf (n=4)	M55 , M56 , M57 , M58	Y19 , Y20

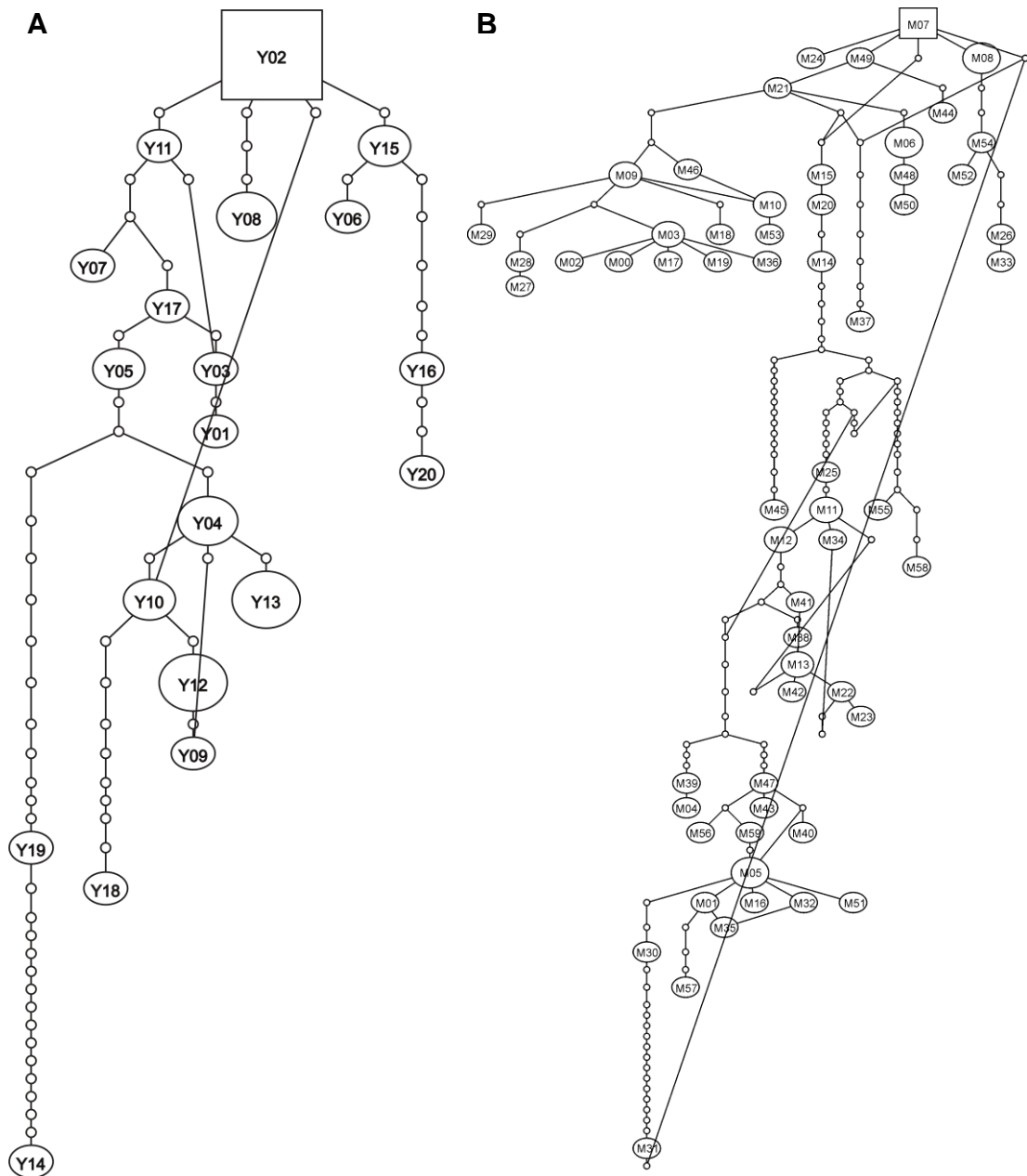


Abbildung 1.1 Maximum Parsimonie-Netzwerke der genealogischen Beziehungen von Y-chromosomalen (A) und mtDNA-Haplotypen (B) von 27 Hunderassen und vier Wölfen. Jede Verbindung entspricht einem Mutationsschritt und kleine Kreise stehen für hypothetische Zwischenstufen. Die Größe jedes Ovals ist proportional zur Haplotypfrequenz in verschiedenen Rassen. Deshalb wurden Haplotypen, die in mehr als einem Individuum der gleichen Rasse auftraten, nur einmal gezählt. Haplotyp Y02 bzw. M07 wurden als Außengruppe ermittelt (Quadrat) und als Wurzel gesetzt. Haplotyp M00 entspricht der Referenzsequenz von Kim et al. (1998).

Die Sequenzierung der mtDNA lieferte 84 variable Positionen in 1.947 bp (Abb. A1-A3), resultierend in 55 verschiedenen Haplotypen für alle untersuchten Hunderassen (im Durchschnitt zwei pro Rasse). Davon waren 82 % (identifiziert in 65 % aller untersuchten Hunde) spezifisch für eine einzige Rasse (Tab. 1.2). Eine große genetische Vielfalt an mtDNA-Sequenzen (30 variable Positionen) wurde auch für die vier Wölfe mit vier verschiedenen mtDNA-Haplotypen identifiziert. Davon waren 13 Sequenzvariationen ausschließlich bei Wölfen und nicht bei einer der untersuchten Rassen zu finden.

Des Weiteren wurden auch mtDNA-Haplotypen beobachtet, die bei vielen Rassen unterschiedlicher FCI-Gruppen auftraten. Die häufigsten mtDNA-Haplotypen waren M5, M6 und M7 in jeweils drei verschiedenen FCI-Gruppen (Tab. 1.2). Parsimonische Netzwerkanalysen, basierend auf mtDNA-Haplotypen, ergaben ein Netzwerk mit sieben Schleifen und vielen Multifurkationen (Abb. 1.1B). Haplotyp M7 wurde als Wurzel mit dem höchsten Außengruppengewicht bestimmt. Zusätzlich wurden mehrere *subcluster* von Haplotypen für Hunde verschiedener Rassen und unabhängig der FCI-Gruppierung identifiziert. Haplotyp M3 der Weimaraner, zugehörig zur FCI-Gruppe 7, beispielsweise gruppierte zusammen mit Haplotypen M17, M19 und M36, gefunden in Berger des Pyrénées, Chow Chow und Mittelschnauzern, zugehörig zu FCI-Gruppen 1, 5 und 2.

1.4. Diskussion

1.4.1. Paternale und maternale Vererbungslinien bei Weimaranern

Die Y-chromosomalen und mtDNA-Daten dieser Studie zeigen, dass vier männliche und drei weibliche Vorfahren in der heutigen deutschen Weimaraner-Population präsent sind. Dies sind natürlich nur Minimum-Abschätzungen, da beispielsweise verschiedene Weimaranerrüden mit dem gleichen Y-chromosomalen Haplotyp als Gründerväter einbezogen sein können. Darüber hinaus wurde nur ein Teil des mt Genoms untersucht, was zur Unterschätzung der tatsächlichen Anzahl weiblicher Gründertiere führen kann (Pang et al. 2009). Dennoch ist es überraschend, dass alle untersuchten 34 Weimaranerrüden relativ einheitliche Haplotypen aufweisen, was auf eine begrenzte genetische Variabilität hindeutet. In einer Studie zur Evolution von 12 verschiedenen Hunderassen wurde nämlich anhand von autosomalen Mikrosatellitenmarkern u.a. auch für Weimaraner eine relativ hohe genetische Diversität nachgewiesen (Streitberger et al., eingereicht).

Für einige lebende Weimaranerrüden konnten die entsprechenden Aufzeichnungen der historischen Stammbaumdaten durch die genetischen Analysen der männlichen und weiblichen Vererbungslinien nicht bestätigt werden. Dies lässt demzufolge auf falsche Vaterschaftsdokumentationen während der mehr als 130jährigen Zuchtgeschichte schließen. Die Diskrepanzen könnten durch Verwechslungen von Welpen, gezielte Manipulationen oder Mehrfachverpaarungen zu erklären sein. Bei Weimaranern wurden zwei rassespezifische Y-chromosomale Haplotypen (Y1, Y3) ausschließlich bei der KH-Varietät gefunden. Ein Erklärungsgrund für das Fehlen dieser Haplotypen bei LH-Weimaranern könnte sein, dass entsprechende Väterlinien diese Haplotypen nie mit der rezessiv vererbten LH-Disposition, eine Missense-Mutation im *FGF5*-Gen (Housley und Venta 2006), übertragen haben. Haplotyp Y2 war als häufigster Haplotyp bei Weimaranern und auch in sieben anderen Rassen (Kuvasz, Schapendoes, Airedale Terrier, Große Münsterländer, Zwergpudel, Barsoi und Sloughi) zu finden. Auch Haplotyp Y4 wurde bei zwei weiteren Rassen (Kuvasz und Riesenschnauzer) gefunden, was nahelegt, dass Y2 und Y4 ursprüngliche Haplotypen von gemeinsamen Vorfahren sind.

Im Gegensatz dazu sind zwei (M1, M2) der insgesamt drei mtDNA-Haplotypen innerhalb der Weimaraner spezifisch für diese Rasse. Haplotyp M2 unterscheidet sich von M3 nur durch eine einzige Nukleotidvariation im *ATP Synthase Untereinheit 6* Gen, die bei keiner anderen untersuchten Rasse gefunden wurde. Allen bereits veröffentlichten Daten zufolge fehlt diese Variation in anderen Rassen, was bedeutet, dass die identifizierte Sequenzvariation nicht vor den Rassegründungen entstanden sein kann oder aber mit der Zeit in ihrer Frequenz in anderen Rassen reduziert wurde, z.B. durch genetische Drift (Vila et al. 1999). Vergleiche der mt *D-Loop*-Sequenzen zeigten keine gemeinsamen mtDNA-Haplotypen zwischen verschiedenen Pointer-Rassen aus Spanien (Parra et al. 2008) und den in dieser

Studie untersuchten Weimaranern sowie Großen Münsterländern. Folglich haben diese Jagdhunderassen keine gemeinsamen, mütterlichen Vorfahren. Das Fehlen gemeinsamer mtDNA-Haplotypen bei diesen Jagdhunden ist aufgrund der Tatsache überraschend, dass domestizierte Hunde einen gemeinsamen *Genpool* besitzen und mehr als 300 Hunden aus Europa vier der in Eurasien identifizierten 10 Haplogruppen gemeinsam sind (Pang et al. 2009). Eine mögliche Erklärung könnte in den unterschiedlichen genetischen Strukturen von Rassen aus verschiedenen geographischen Regionen zu finden sein, was mit vormaligen Ergebnissen von ausschließlich regionsspezifisch auftretenden mtDNA-Haplogruppen übereinstimmt (Pang et al. 2009).

1.4.2. Paternale und maternale Vererbungslinien bei allen 27 Hunderassen

In Vergleichen mit anderen Studienergebnissen (Okumura et al. 1996, Savolainen et al. 2002, Takahasi et al. 2002, Tsuda et al. 1997, Wetton et al. 2003) wurden identische *D-Loop*-Haplotypen mit weiteren Hunderassen gefunden, was auf gemeinsame weibliche Vorfahren dieser Rassen schließen lässt. Allgemein war in dieser Untersuchung eine genetische Differenzierung aufgrund rassespezifischer Y-chromosomaler Haplotypen zu beobachten, die jeweils in verschiedenen Rassen zu finden waren. Insgesamt wurden 56 % aller Haplotypen ausschließlich in einer einzigen Rasse identifiziert, ähnlich dem Ergebnis einer größeren Studie mit 40 % rassespezifischen Haplotypen in 50 Hunderassen (Bannasch et al. 2005). Rassespezifische Haplotypen wurden sowohl für das Y-Chromosom wie auch für mtDNA identifiziert. Dennoch konnte die Rassezugehörigkeit, mit Ausnahme von drei Rassen (11,1 % aller Rassen), aufgrund identischer Haplotypen nicht bestimmt werden. In den meisten Rassen waren zwei oder mehr verschiedene Haplotypen zu finden, obwohl teilweise nur weniger als sechs Individuen pro Rasse untersucht worden waren. Daher ist es auf dieser Basis nicht möglich, Rassen eindeutig voneinander zu unterscheiden (Bannasch et al. 2005, Parra et al. 2008).

Die Einteilung von Rassen anhand identifizierter mtDNA-Haplotypen schlug aufgrund des relativ großen Anteils an gemeinsamen Haplotypen zwischen sehr verschiedenen Rassen (18,2 %) fehl. Andererseits existierte innerhalb von Rassen auch eine hohe Diversität an unterschiedlichen Haplotypen (81,8 %). Unzureichende Unterscheidungsmöglichkeiten zwischen verschiedenen Rassen anhand von mtDNA-Haplotypen wurden auch in vorherigen Studien beschrieben (Okumura et al. 1996, Parra et al. 2008, Savolainen et al. 2002, Tsuda et al. 1997, Vila et al. 1997). Das Fehlen mitochondrialer DNA-Unterschiede zwischen Rassen könnte auch die Folge einer zum Zeitpunkt der Rassegründungen größeren Anzahl an Gründertieren als ursprünglich angenommen (Parker und Ostrander 2005, Vila et al. 1999) sein. Andere Erklärungsversuche berücksichtigen die Möglichkeit nachträglicher Einkreuzungen fremder Hunde in bereits etablierte Rassen oder die Tatsache, dass die Evolution der

mtDNA, bezogen auf die Zeit, seitdem moderne Rassen existieren, zu langsam verläuft (Bannasch et al. 2005, Parker et al. 2004, Sundqvist et al. 2006).

Der graue Wolf ist der Vorfahre von allen Hunderassen (Olsen 1985, Vila et al. 1997). Vergleiche von nukleärer DNA belegen, dass Wolf und Hund sich nur in 0,04 % der Nukleotidsequenzen voneinander unterscheiden (Lindblad-Toh et al. 2005). Zudem sind mtDNA-Haplotypen von Hunden ähnlich zu denen, die bei Wölfen gefunden wurden, eine Folge nachträglicher Rückkreuzungsereignisse, die zu einer größeren Variabilität innerhalb von Hunderassen führte (Leonard et al. 2002, Vila et al. 1997, Vila et al. 2005). In dieser Studie wurde bei den untersuchten Wölfen überraschend große mtDNA-Vielfalt beobachtet. Im Gegensatz zu früheren Studien wurden keine gemeinsamen Haplotypen mit Hunderassen identifiziert, was auf eine zu kleine Stichprobe zurückzuführen sein könnte. Alle vier untersuchten Wölfe entstammten einer Population aus Rumänien, wo möglicherweise nur wenige Rückkreuzungsereignisse zwischen dieser speziellen Wolfspopulation und den hier untersuchten Hunderassen stattgefunden haben. Diese Annahme wird durch veröffentlichte Daten von Wolfspopulationen des östlichen Europas unterstützt, die trotz offensichtlich fehlender physikalischer Barrieren nur regionspezifische Haplotypenverteilung zeigen (Pilot et al. 2006). Darüber hinaus wurde bereits eine geographische Spezifität von Wolfs-Haplotypen beschrieben, die einzigartig für eine bestimmte Region sind (Vila et al. 1997). Möglicherweise könnte das Fehlen von gemeinsamen Haplotypen zwischen Hunden und Wölfen auch den Verlust von Wolf-spezifischen Haplotypen im Zuge der Rassegründungen reflektieren. Unter der Annahme, dass das Fehlen von Rasse-spezifischen mtDNA-Haplotypen ein Ergebnis von Gründungsereignissen und genetischen Drifteffekten darstellt, sind die identifizierten Haplotypen alt. Deshalb könnten ausgewählte Matadorrüden und -hündinnen auch bei der Entwicklung der frühen Hunde im Domestikationsprozess lange vor der Gründung der heutigen Hunderassen wesentlich beteiligt gewesen sein.

Analysen von autosomalen Mikrosatellitenmarkern haben gezeigt, dass verschiedene Hunderassen genetisch differenziert werden können und Individuen der gleichen Rasse ähnliche Genotypen besitzen (Koskinen 2003, Parker et al. 2004, Sundqvist et al. 2006, Zajc und Sampson 1999). Folglich stellte sich die Frage, ob verschiedene Hunderassen auch in männlichen und weiblichen Vorfahren genetische Variation zeigen. Einige der mtDNA und Y-chromosomalen Haplotypen traten bei unterschiedlichen Rassen aus verschiedenen FCI-Gruppen auf, was auf einen gemeinsamen Ursprung hindeutet (Bannasch et al. 2005). Die Parsimonie-Netzwerke, basierend auf mtDNA und Y-chromosomalen Haplotypen, demonstrierten für die untersuchten Rassen und Wölfe Haplotypen-Gruppierungen von Rassen unterschiedlicher FCI-Gruppen. Haplotypen Y2 und M7 wurden als Außengruppen ermittelt, was vermuten lässt, dass diese die ursprünglichsten aller untersuchten Haplotypen sind. Nach der Koaleszenztheorie könnten diese beiden Haplotypen in den letzten gemeinsamen

Vorfahren aller in dieser Studie identifizierten Haplotypen vertreten gewesen sein. Die Ergebnisse zu Haplotyp Y2, der sowohl der ursprünglichste wie auch häufigste Haplotyp bei verschiedenen Rassen ist, deuten darauf hin, dass Hunde allgemein auch einen gemeinsamen Y-chromosomalen *Pool* besitzen, wie es bereits für das mt Genom bestimmt worden war (Pang et al. 2009). Letztendlich divergieren diese Ergebnisse von der Klassifizierung der Rassen in FCI-Gruppen, die entsprechend morphologischer und funktioneller Charakteristika eingeteilt werden, da sehr unterschiedliche Rassen, wie z.B. Berger des Pyrénées, Chow Chow, Mittelschnauzer und Weimaraner, zusammen *clustern*.

Kapitel 2

Genomweite Kopplungsanalysen von Mikrosatellitenmarkern für generalisierte progressive Retina Atrophie in verschiedenen Hunderassen

Regina Kropatsch, Gabriele Dekomien, Jörg T. Epplen

Humangenetik, Ruhr Universität, Bochum

2.1. Einleitung

Generalisierte progressive Retina Atrophie (gPRA) ist die häufigste Ursache von hereditärer Blindheit beim Hund (*Canis familiaris*), die in über 100 verschiedenen Rassen auftritt (Petersen-Jones 1998). Hunderassen sind wegen ihres genetischen Hintergrunds isolierte Populationen, in denen Krankheiten aufgrund der Gründungsereignisse meist nur ein Krankheitsallel pro Rasse aufweisen. Zudem existieren in caninen Rassen als Folge der hochgradig selektionierenden Zuchtstrategien große Haplotypblöcke von mehreren Mb im Genom (Lindblad-Toh et al. 2005). Hunderassen bilden deshalb eine gute Voraussetzung, um mittels genomweiter Kopplungsanalysen die kausalen Mutationen für hereditäre Erkrankungen, wie z.B. gPRA, im Genom zu lokalisieren.

Erfolgreiche Kopplungsstudien beim Hund setzen ein geeignetes Set polymorpher Marker mit vollständiger Genomabdeckung voraus. Das *Minimal Screening Set-2* (MSS-2; Breen et al. 2004, Guyon et al. 2003) ist eine Sammlung von Mikrosatellitenmarkern, die für genomweite Kopplungsanalysen geeignet ist und in einer Studie bei Schapendoes bereits erfolgreich zur Lokalisation des gPRA-Lokus geführt hat (Lippmann et al. 2007). Das MSS-2 umfasst 325 Mikrosatellitenmarker (171 Tetra-, 151 Di- und 3 Trinukleotidrepeat Marker), die einen durchschnittlichen Abstand von 9 Mb (~9 cM) und keinen größer als 17,1 Mb aufweisen (Guyon et al. 2003). Simulationsstudien zufolge entspricht dies einer ausreichenden genomischen Dichte, da selbst Markerabstände von 10 bis 20 cM für einen Kopplungsnachweis zwischen Marker und Mutation noch ausreichend sind (Holmans und Craddock 1997). In späteren Simulationsanalysen (Evans und Cardon 2004) wurde derartigen Marker-Sets allerdings lediglich ein Informationsgehalt von ~70 % zugeschrieben, der aber durch Erweiterung von zusätzlichen Markern erhöht werden kann.

Die gPRA ist homolog zur RP, der am weitesten verbreiteten Gruppe hereditärer Retinopathien beim Menschen (Petersen-Jones 2005). Daher sind Gene, für die beim Menschen bereits RP-ursächliche Mutationen beschrieben sind, aussichtsreiche Kandidaten für die canine gPRA. Um den gPRA-Lokus für die fünf Hunderassen Airedale Terrier (AT), Irish Glen of Imaal Terrier (GIT), Löwchen (Lö), Coton de Tuléar (CdT) und Saarloos Wolfhunde (Sa) zu identifizieren, wurden zunächst Mikrosatellitenmarker-basierende Kopplungsanalysen für ausgewählte gPRA-Kandidatengene durchgeführt. Da keines dieser Gene eine Kopplung mit den untersuchten Markern aufwies, wurde das gPRA-*Screening* für die drei erstgenannten Rassen auf das gesamte Hundegenom ausgeweitet. In diesem Kapitel soll diskutiert werden, weshalb mittels Mikrosatellitenmarker-basierten Kopplungsanalysen trotz Erweiterung des Mikrosatellitenmarker-Sets für keine der untersuchten Rassen eine gPRA-gekoppelte Region identifiziert werden konnte.

2.2. Material und Methoden

2.2.1. DNA-Proben und Diagnose

Für Kopplungsanalysen in den vier Hunderassen AT, GIT, Lö und CdT wurden in Zusammenarbeit mit verschiedenen Zuchtverbänden und Züchtern EDTA-Blutproben von Hunden aus gPRA-informativen Familienstammbäumen sowie einigen unverwandten Hunden gesammelt (Abb. 2.1). Zum Zeitpunkt des Projektbeginns im Mai 2007 standen 11 Stammbäume mit 63 Individuen zur Verfügung, wovon 26 gPRA-erkrankt waren (AT: n = 7, GIT: n = 8, Lö: n = 5, CdT: n = 6).

Für Kopplungsanalysen ausgewählter Kandidatengene wurden außerdem 30 Hunde (n = 12 gPRA-erkrankt) aus zwei Familienstammbäumen der Sa untersucht (Abb. 2.1). Für diese Rasse wurde bereits eine genomweite Kopplungsanalyse durchgeführt, allerdings konnte kein gPRA-gekoppelter Locus identifiziert werden (Lippmann 2006b).

Die Diagnose gPRA wurde durch ophthalmoskopische Augenuntersuchungen von erfahrenen, speziell geschulten Veterinärmedizinern des Dortmunder Kreises (DOK, Gesellschaft für Diagnostik genetisch bedingter Augenerkrankungen) festgestellt und in Befundbögen dokumentiert. Bis auf Sa zeigten alle o.g. Rassen eine progressive Form der gPRA mit spätem Manifestationsalter. Die bei Sa beobachtete späte gPRA-Form zeigte dagegen nur eine geringe oder keine Progression. Anhand von Stammbaumanalysen der gPRA-Hunde wurde für die untersuchten Rassen ein ar Erbgang der gPRA angenommen. Die Isolierung der genomischen DNA erfolgte wie in Kapitel 1 beschrieben.

2.2.2. Auswahl von gPRA-Kandidatengenen

Aufgrund der Homologie zwischen Hund und Mensch sind Gene, in denen beim Menschen RP-Mutationen beschrieben oder die Retina- bzw. Photorezeptor-spezifisch exprimiert sind, gute Kandidatengene für die canine gPRA. Daher wurden für Kopplungsanalysen ausgewählter Kandidatengene 15 RP-assoziierte und Retina-spezifische Gene (*CDH23*, *CHX10*, *CNGB3*, *LRAT*, *PCDH21*, *PROM1*, *PRPF8*, *RGR*, *RLBP1*, *RP1*, *RPGRIP1*, *SFRP2*, *TTPA*, *TULP1* und *USH2A*) aus der Datenbank *Retinal Information Network* (RetNet) ausgewählt, die bisher noch nicht mittels Kandidatengenanalysen als gPRA-Ursache für die zu untersuchenden Rassen ausgeschlossen worden waren.

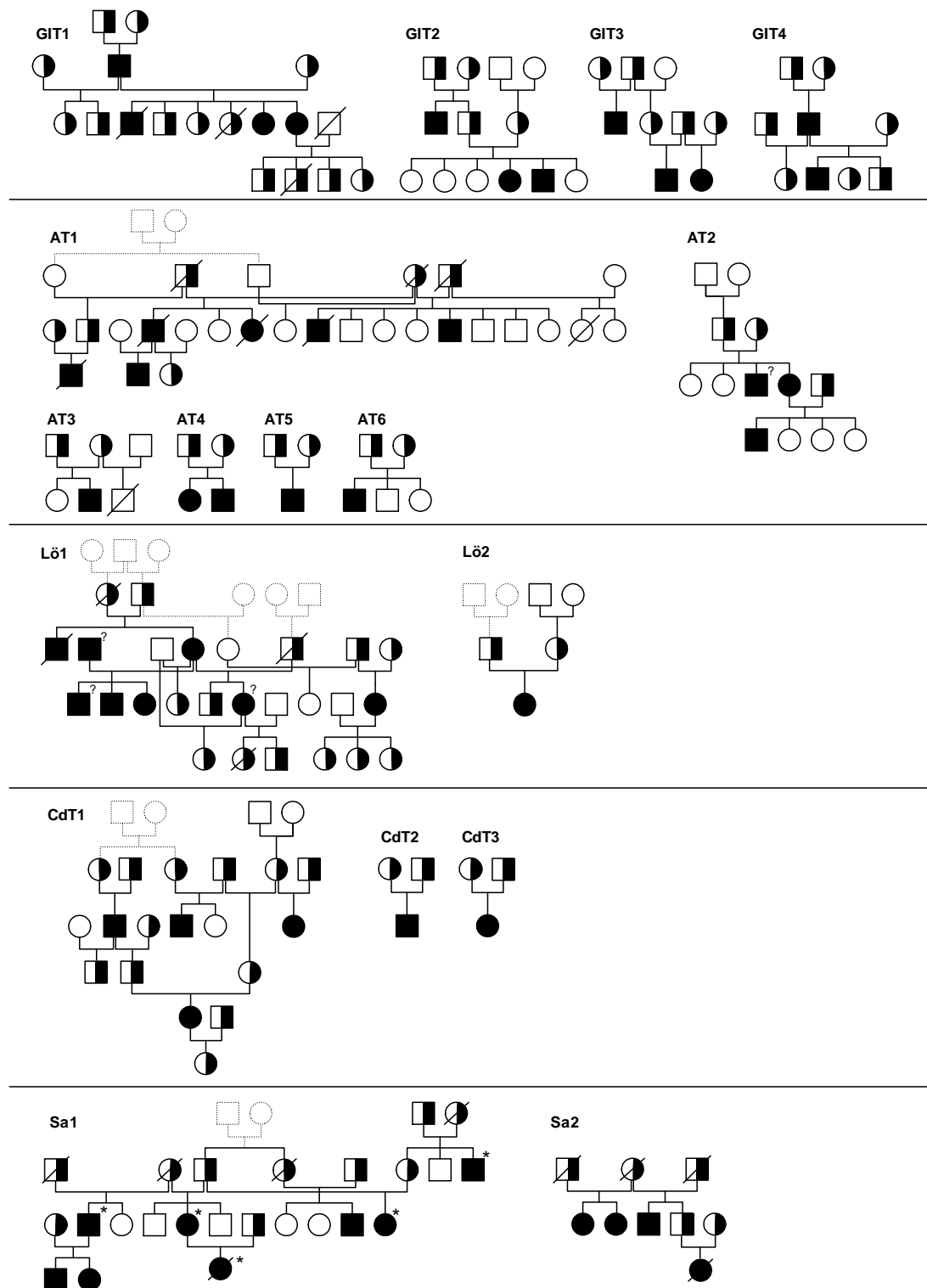


Abbildung 2.1 Mehrgenerationenstammbäume von gPRA-informativen Familien der untersuchten Rassen Irish Glen of Imaal Terrier (GIT), Airedale Terrier (AT), Löwchen (Lö), Coton de Tuléar (CdT) und Saarloos Wolfhund (Sa; Stand November 2010). Kreise repräsentieren Hündinnen und Quadrate symbolisieren Rüden, nicht-ausgefüllte Symbole stehen für homozygot gesunde, ausgefüllte für homozygot gPRA-erkrankte Hunde und halbausgefüllte für heterozygote Trägertiere. Durchgestrichene Symbole repräsentieren verstorbene und gepunktete Symbole stehen für nicht verfügbare Individuen. Hunde, bei denen der gPRA-Phänotyp nicht zuverlässig ermittelt werden konnte, wurden zusätzlich mit '?' markiert. In Sa-Stammbäumen wurden Hunde, die an einer gPRA-Form ohne Progression erkrankt sind, mit Sternchen gekennzeichnet. Obwohl für GITs vier separate Stammbäume dargestellt sind, stellen diese Familien Teile eines wesentlich größeren Stammbaumes dar.

2.2.3. Marker und Auswahlkriterien

Für Kopplungsanalysen mit 15 ausgewählten RP-assoziierten und spezifisch exprimierten Kandidatengen wurden 26 Mikrosatellitenmarker untersucht. Davon stammten 13 Marker aus dem bereits vorliegenden MSS-2 mit insgesamt 325 hoch-informativen Markern (Breen et al. 2004, Guyon et al. 2003). Die anderen 13 Marker wurden aus der Hundegenom-Datenbank (UCSC *Genome Bioinformatics website*, www.genome.ucsc.edu/, Hunde Genomsequenz, Stand: Mai 2005) im Hinblick auf eine MSS-2-Erweiterung jeweils 1 - 2 Mb vor oder nach den entsprechenden Kandidatengen ausgewählt.

Für genomweite Kopplungsanalysen wurden die 311 autosomalen Marker des MSS-2 mit einem durchschnittlichen Markerabstand von 9 Mb verwendet, da für die zu untersuchenden Rassen eine ar vererbte Form der gPRA angenommen wurde. Die Genotypisierung X-chromosomaler Marker war demnach nicht erforderlich. Primer und PCR Bedingungen sowie Heterozygotieraten der verwendeten MSS-2-Marker sind veröffentlicht in Guyon et al. (2003). Um die Erfolgsrate der Kopplungsanalysen für die zu untersuchenden Rassen zu erhöhen und den Informationsgehalt der Genom-Kartierungen zu optimieren, wurde das MSS-2 um 175 zusätzliche, speziell ausgewählte Marker aus der Hundegenom-Datenbank UCSC (Stand 2005) erweitert. Dadurch sollten besonders große Markerabstände im MSS-2 auf durchschnittlich 5 Mb (~5 cM) verringert und nicht genügend polymorphe bzw. nicht-informative MSS-2-Marker ersetzt werden. Außerdem sollten dadurch weitere Regionen von Retina-assoziierten Genen, die in den Datenbanken RetNet und GeneAtlas (Université René Descartes, Paris) erfasst sowie in der Literatur beschrieben sind (Bolz 2005), abgedeckt werden. Zusätzlich wurden Marker (n = 45) in einigen chromosomalen Regionen ausgewählt, die als gPRA Kandidatenregion für die untersuchten Rassen durch zuvor getestete Marker nicht eindeutig ausgeschlossen werden konnten. Die Oligonukleotide aller 233 verwendeten Ergänzungsmarker wurden mit Hilfe der Primer Express Software (PE Biosystems) ausgewählt (Tab. A4).

Bei der Auswahl zusätzlicher Mikrosatellitenmarker wurde darauf geachtet, dass die Marker ausreichenden Informationsgehalt und geringe bis moderate Mutationsraten besaßen. Daher wurden überwiegend Mikrosatellitenmarker ausgewählt, die eine möglichst hohe Anzahl identischer Dinukleotid- oder Tetranukleotid-Wiederholungen (15 - 30 Kopien), hohe sequenzspezifische Übereinstimmung (90 - 99 %), aber auch in geringem Maße (≤ 5 %) Deletionen bzw. Insertionen aufwiesen. Als ergänzende Marker wurden bevorzugt Tetranukleotidrepeats ausgewählt, da diese im Allgemeinen eine geringere Mutationsfrequenz als Dinukleotidrepeats besitzen (Chakraborty et al 1997). Darüber hinaus sollten im Sequenzbereich um den Mikrosatelliten möglichst keine SINE- (*short interspersed elements*) und LINE-Elemente (*long interspersed elements*) oder ‚Poly-T‘- bzw. ‚Poly-A-Wiederholungen‘

vorkommen, um unspezifische PCR-Amplifikate durch Lokus-unspezifische Oligonukleotid-Bindestellen oder *Slippage* der Taq-Polymerase zu vermeiden.

2.2.4. Polymerase Kettenreaktion (PCR) und Fragmentanalyse

Für die Amplifikation der Mikrosatellitenmarker wurde die ‚tailed Primer PCR‘ Methode mit drei Oligonukleotiden nach Jagiello et al. (2004) eingesetzt: ein Vorwärts-Primer mit am 5'Ende angefügter Universalsequenz (*tailed* F-Primer), ein Rückwärts-Primer und ein Fluoreszenz-markierter Primer (markierter F-Primer), welcher komplementär zur Universalsequenz des *tailed* F-Primers ist. Alle PCRs wurden unter Standard-PCR-Bedingungen (Dekomien und Eppelen 2002) mit 1 × PCR Puffer (GeneCraft, Münster), 0,2 mM je dNTP, 3 - 4 mM MgCl₂, 0,2 pmol *tailed* F-Primer, 2,5 pmol Rückwärts-Primer und markiertem F-Primer, 0,5 U BioTherm™ DNA-Polymerase (GeneCraft) und 50 ng DNA bei einer *Annealing* Temperatur von 54 - 58°C und 40 Zyklen in einem Thermocycler (Biometra, Göttingen) durchgeführt.

Die elektrophoretische Fragmentanalyse der Fluoreszenz-markierten PCR-Produkte erfolgte nach Standard-Protokollen mit dem automatischen 96 Kapillarsequenzierer MegaBACE 1000 (GE Healthcare, Freiburg). Dazu wurden die PCR-Produkte von zwei Markern mit unterschiedlicher Fluoreszenzmarkierung jeweils 1:10 verdünnt, gepoolt und 2 µl dieser Verdünnung mit 0,4 µl MegaBACE™ ET-R Größenstandard und 2,6 µl *Loading Solution* (70 % Formamid, 1 mM EDTA) gemischt. Die Auswertung der Rohdaten erfolgte mit der Software MegaBACE Fragment Profiler Version 1.2 (GE Healthcare), die erhaltenen Genotypen wurden tabellarisch dargestellt.

2.2.5. Stammbaumanalysen und Statistische Auswertung

Um den Aufwand der statistischen Auswertung von mehr als 500 Mikrosatellitenmarkern so gering wie möglich zu halten, wurden die Allelverteilungen der untersuchten Mikrosatellitenmarker innerhalb der Familienstammbäume, getrennt nach Rasse, auf Verwandtschaftsverhältnisse überprüft und ausgewertet. Ein entscheidendes Beurteilungskriterium für die Auswertung von Mikrosatellitenmarkern war der Anteil an heterozygot typisierten Hunden unter den gPRA-Erkrankten. Unter der Annahme, dass gPRA-ursächliche Mutationen durch ‚Gründertiere‘ zu Beginn der Rassenbildung eingeführt und durch In- bzw. Engzucht in der Rasse verbreitet wurden, kann ein Marker, der bei gPRA-erkrankten Hunden einen heterozygoten Zustand zeigt, für eine gPRA-Kopplung ausgeschlossen werden. Die Kopplung eines Markers mit der ar vererbten gPRA setzt homozygote Genotypen voraus. Ein weiteres Ausschlusskriterium war das Auftreten von unterschiedlichen Allelen im homozygoten Zustand bei den Erkrankten. Dies basiert auf der Annahme, dass Hunderassen genetisch isolierte Populationen darstellen und darin auftretende Erkrankungen

durch den ‚Gründer-Effekt‘ sowie rassespezifische Zuchtstrategien in der Population verbreitet wurden, sodass normalerweise nur ein Krankheitsallel vorherrscht (Dekomien und Epplen 2000).

Für Mikrosatellitenmarker, die mittels Stammbaumanalyse nicht ausgeschlossen werden konnten, wurde der LOD-Score als statistisches Maß für eine Kopplung bestimmt. Dessen Berechnung erfolgte mit der Superlink-online 1.0 Software (<http://bioinfo.cs.technion.ac.il/superlink-online/>; Silberstein et al. 2006) in Form von Zwei-Punkt-Analysen zwischen untersuchtem Marker und gPRA-Lokus. Für die Bestimmung des LOD-Scores wurde ein ar Vererbungsmodus mit vollständiger Penetranz angenommen.

2.3. Ergebnis

2.3.1. Kopplungsanalyse ausgewählter Kandidatengene

Da die *prcd*-PRA, die ursächlich für gPRA in mindestens 32 Rassen ist, für AT, GIT, Lö, CdT und Sa ausgeschlossen werden konnte (unveröffentlichte Ergebnisse), wurden Kopplungsanalysen für die 15 ausgewählten RP-assoziierten und Retina-spezifischen Kandidatengene durchgeführt. Bei den Kopplungsanalysen dieser Gene wurde für keines in den untersuchten fünf Rassen signifikante Markerkopplung nachgewiesen, weshalb sie als Mutationsort für gPRA ausgeschlossen werden konnten.

2.3.2. Genomweite Kopplungsanalyse in drei Hunderassen

Nachdem für die untersuchten Kandidatengene keine Markerkopplung nachgewiesen werden konnte, wurde die Suche nach gPRA-Loci ausgeweitet und es wurden systematische Genom-*Screenings* für die Rassen AT, GIT und Lö durchgeführt.

Für keinen der insgesamt 544 typisierten Mikrosatellitenmarker der genomweiten Kopplungsanalysen konnte eine Allelverteilung gefunden werden, die anhand eines hohen LOD-Scores für eine der drei untersuchten Rassen eindeutig mit der gPRA gekoppelt war. Insgesamt waren 451 der 544 Marker (~83 %) für alle drei untersuchten Rassen gleichermaßen informativ (Abb. 2.2), während ~10 % (n = 54) nur in einigen dieser Rassen genügend polymorph waren. Die verbleibenden 39 Marker lieferten für keine der Rassen eine Aussage, da sie monomorph waren, d.h. dass für alle untersuchten Hunde ein Fragment der gleichen Größe amplifiziert worden war.

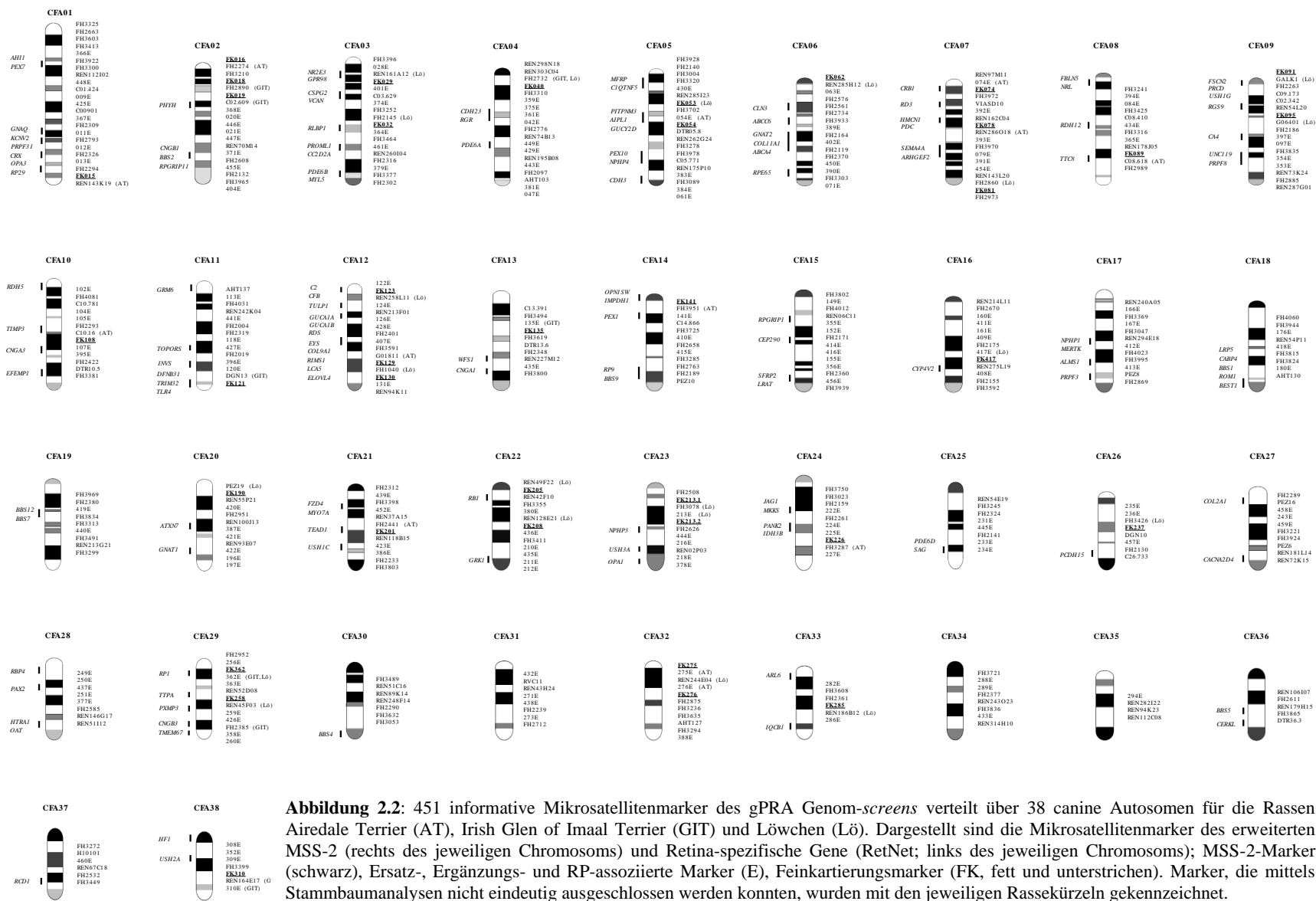


Abbildung 2.2: 451 informative Mikrosatellitenmarker des gPRA Genom-screens verteilt über 38 canine Autosomen für die Rassen Airedale Terrier (AT), Irish Glen of Imaal Terrier (GIT) und Löwchen (Lö). Dargestellt sind die Mikrosatellitenmarker des erweiterten MSS-2 (rechts des jeweiligen Chromosoms) und Retina-spezifische Gene (RetNet; links des jeweiligen Chromosoms); MSS-2-Marker (schwarz), Ersatz-, Ergänzungs- und RP-assoziierte Marker (E) (schwarz), Feinkartierungsmarker (FK, fett und unterstrichen). Marker, die mittels Stammbaumanalysen nicht eindeutig ausgeschlossen werden konnten, wurden mit den jeweiligen Rassekürzeln gekennzeichnet.

Insgesamt konnten 357 Marker (~65 %) entweder aufgrund ihrer Allelverteilung mit mindestens zwei heterozygot typisierten Individuen oder wegen der Identifizierung von unterschiedlichen Allelen im homozygoten Zustand bei den Erkrankten für eine gPRA-Kopplung ausgeschlossen werden. Für 42 chromosomale Regionen (jeweils 11 bis 22 pro Hunderasse) war dies nicht möglich, sodass in diesen Kandidatenregionen 45 weitere Marker untersucht wurden. Diese konnten mittels Stammbaumanalysen für eine gPRA-Kopplung ebenfalls ausgeschlossen werden.

2.4. Diskussion

Um die gPRA-Region in den Rassen AT, GIT, Lö, CdT und Sa zu lokalisieren, wurden zunächst Kopplungsanalysen für ausgewählte Kandidatengene durchgeführt. In keinem dieser Gene konnten über die Kopplung eines untersuchten Markers die gPRA-Loci eindeutig identifiziert werden. Dies lässt vermuten, dass keines dieser Gene die kausale Mutation für gPRA in o.g. Rassen enthält, was zumindest für GITs bestätigt werden konnte (Kapitel 3).

Demzufolge wurde für ATs, GITs und Lö, aufbauend auf Erfahrungswerten der gPRA-Kopplungsstudie für Schapendoes (Lippmann et al. 2007) sowie weiteren publizierten genomweiten Kopplungsanalysen, bei denen gPRA-Loci im Hundegenom erfolgreich kartiert worden waren (*prcd*, Acland et al. 1998; *erd*, Acland et al. 1999; *rcd2*, Kukekova et al. 2006), eine systematische Suche des gesamten Hundegenoms vorgenommen. Analog zur Vorgehensweise bei der Schapendoes-Studie wurde ein Genom-Screen mit dem zur Verfügung stehenden MSS-2, bestehend aus 311 autosomalen Mikrosatellitenmarkern (Guyon et al. 2003), durchgeführt. Um die simulierte Erfolgsrate von 70 % eines mit dem MSS-2 vergleichbaren Sets von Mikrosatellitenmarkern (Evans und Cardon 2004) sowie den Informationsgehalt der genomweiten Kopplungsanalysen für die zu untersuchenden Rassen zu erhöhen, wurden 233 zusätzliche Marker untersucht. Obwohl durch die erhöhte Markerdichte der durchschnittliche Markerabstand des MSS-2 von 9 Mb auf ~5 Mb und damit auch die Rekombinationswahrscheinlichkeit reduziert wurden, konnte dennoch für keinen der insgesamt 544 typisierten Marker in einer der drei untersuchten Rassen eindeutig eine gPRA-Kopplung nachgewiesen werden. Dies lässt vermuten, dass die Haplotypblöcke in einigen chromosomalen Regionen, entgegen den Ergebnissen von Simulationsstudien, kleiner als angenommen sind und Rekombinationen zwischen untersuchtem Marker und Mutationsort stattgefunden haben. Bisher wurde davon ausgegangen, dass beim Hund aufgrund der Rassegeschichte um eine krankheitsverursachende Mutation relativ große Haplotypblöcke von über 5 bis 10 cM bzw. Mb existieren (Ostrander und Kruglyak 2000). Insofern waren die Markerabstände anscheinend noch zu groß, um die gPRA-Region in den untersuchten Rassen lokalisieren zu können. Insbesondere ältere Mutationen, die noch vor

den Rassegründungen entstanden sind, werden infolge zu großer Markerabstände übersehen, da sie kein starkes Kopplungsungleichgewicht mit einem Marker aufweisen können (Sargan et al. 2007).

Teilweise waren Marker bei einigen Rassen nicht informativ für die Kopplungsanalyse, da sie für alle Hunde der jeweiligen Familienstammbäume einer Rasse im homozygoten Zustand für ein Allel (monomorph) typisiert worden waren. Bei anderen Rassen dagegen wiesen sie mehrere Allele auf und waren somit ausreichend polymorph. Möglicherweise ist das Auftreten monomorpher Marker u.a. auch auf das Vorhandensein so genannter ‚Null-Allele‘ zurückzuführen, also Allele, die sich mittels PCR nicht amplifizieren ließen, z.B. aufgrund von Punktmutationen innerhalb der Primerbindestellen. Häufig werden kürzere Allellängen mittels PCR effizienter vervielfältigt als größere. Auf diese Weise kann ein Individuum mit ursprünglich heterozygotem Genotyp einen homozygoten Zustand für den untersuchten Mikrosatellitenmarker aufweisen, was zur Identifizierung von Falsch-Homozygoten führt (Dakin und Avise 2004).

Im Gegensatz dazu kann die kritische gPRA-Region auch aufgrund zu polymorpher Marker mit einer hohen Mutationsrate ausgeschlossen und so übersehen worden sein. Dies kann auf Rekombinationsereignisse oder Fehler bei der Replikation (*slippage* der DNA-Polymerase) zurückgeführt werden (Bhargava und Fuentes 2010).

Für eine größere Aussagekraft der genomweiten Kartierungsstudien in den untersuchten Hunderassen ist es notwendig, durch noch weitere Minimierung des Markerabstands (<5 Mb) die genomische Markerabdeckung zu optimieren. Dazu eignen sich insbesondere canine SNP-*microarrays*, die eine höhere Markerdichte als Mikrosatellitenmarker-Sets aufweisen.

Kapitel 3

Genomweite SNP-*microarray* Analysen für generalisierte progressive Retina Atrophie führen zur ursächlichen Deletionsmutation im ADAM9-Gen für Irish Glen of Imaal Terrier

Regina Kropatsch¹, Elisabeth Petrasch-Parwez², Dominik Seelow³, Annegrit Schlichting²,
Wanda M. Gerding¹, Denis A. Akkad¹, Joerg T. Epplen¹, Gabriele Dekomien¹

¹ Humangenetik, Ruhr Universität, Bochum

² Neuroanatomie und Molekulare Hirnforschung, Ruhr Universität, Bochum

³ NeuroCure Clinical Research Centre, Charité - Universitätsmedizin Berlin

Publiziert in *Molecular and Cellular Probes* (2010) 24:357-363

und weitere unveröffentlichte Daten

3.1. Einleitung

Generalisierte progressive Retina Atrophie (gPRA) umfasst eine Gruppe genetisch heterogener, retinaler Erkrankungen bei domestizierten Tieren, u.a. beim Haushund (Petersen-Jones 1998). Bis heute sind 10 Gene und eine genetische Region beschrieben, die mit der gPRA in verschiedenen Hunderassen assoziiert sind (Acland et al. 1999, Clements et al. 1993, Dekomien et al. 2009, 2000, Kijas et al. 2003, 2002, Kukekova et al. 2009, Mellersh et al. 2006, Petersen-Jones et al. 1999, Wiik et al. 2008, Zangerl et al. 2006, Zhang et al. 2002, 1998). Bis vor wenigen Jahren wurden ausschließlich Mikrosatellitenmarker zur Durchführung genomweiter Kopplungsstudien beim Hund verwendet. Seit aber mit der Identifizierung des Hundegenoms (Lindblad-Toh et al. 2005) auch über 2,5 Millionen SNPs zur Verfügung stehen, finden aufgrund technischer Fortschritte nun zunehmend SNP-basierte *microarrays* Anwendung für die Suche nach der ursächlichen Mutation von Erbkrankheiten.

Simulationsstudien haben gezeigt, dass eine aus mehreren tausend biallelischen SNP-Markern bestehende genetische Karte größeren Informationsgehalt für Kopplungsstudien besitzt als verfügbare Systeme mit 300 bis 400 Mikrosatellitenmarkern (Evans und Cardon 2004). Durch entsprechende SNP-Sets (SNP pro ≤ 10 kb) lässt sich die Effizienz genomweiter Analysen erhöhen und die Lokalisation des entsprechenden Merkmalslokus genauer präzisieren (John et al. 2004). Darüber hinaus weisen SNPs eine geringere Genotypisierungsfehlerrate als Mikrosatelliten auf (Kennedy et al. 2003).

Da heutige Hunderassen ingezüchtete, geschlossene Populationen als Konsequenz strenger Züchtungsstrategien und periodisch aufgetretener Populations-Flaschenhälse darstellen (Sutter und Ostrander 2004), ist anzunehmen, dass alle gPRA-erkrankten Hunde die ursächliche Mutation sowie flankierende Chromosomenabschnitte von einem gemeinsamen Vorfahren, d.h. identisch durch Abstammung (*identical-by-descent*, IBD), erhalten haben. Aus diesem Grund wurde für die Kartierung der gPRA-Region im Hundegenom die Homozygotie-Kartierung nach Lander und Botstein (1987) verwendet. Da die Effizienz eines Homozygotie-*Screenings* u.a. mit dem Markerabstand korreliert, ist Voraussetzung für eine erfolgreiche *microarray* basierte SNP-Genotypisierung, dass der *microarray* über eine hohe Markerdichte und damit eine ausreichende Genomabdeckung verfügt. Der größte verfügbare canine Affymetrix SNP-*microarray* umfasst 50.000 SNPs, was einem durchschnittlichen Markerabstand von ~ 48 kb (also ~ 20 SNPs pro Megabase) entspricht. Damit ist das Genom bis zu 20fach besser abgedeckt als ein Marker-Set einer Simulationsstudie, bei der eine Homozygotie-Kartierung von 10 betroffenen, konsanguinen Nachkommen unter Verwendung eines Marker-Sets mit durchschnittlichem Markerabstand von 1 cM (~ 1 Mb) eine 82 %ige Effizienz erreichte (Genin et al. 1998). Demnach ist anzunehmen, dass canine SNP-*microarray* basierte Homozygotie-Kartierungen eine höhere Effizienz als die simulierten 82 % aufweisen und eine gute Eingrenzung des Krankheitslokus ermöglichen.

Da die gPRA-ursächlichen Mutationen für die Rassen AT, GIT, Lö und Sa bisher noch unbekannt waren, wurden Kartierungsanalysen mit SNP-*microarrays* und anschließende Homozygotie-Screenings zur Identifizierung homozygoter Kandidatenregionen durchgeführt. Durch weiterführende Feinkartierungsanalysen mit Mikrosatelliten- und SNP-Markern wurden diese chromosomalen Regionen auf mögliche gPRA-Kopplung überprüft und gleichzeitig auf einen minimalen Haplotypblock eingegrenzt. In diesem Kapitel wird gezeigt, dass der gPRA-Lokus für GITs (Abb. 3.1A) in einer Region auf Chromosom (CFA) 16 lokalisiert ist, die Syntenie zum menschlichen Chromosom 8 (8p11.22) zeigt und das Gen *a disintegrin and metalloprotease domain 9 (ADAM9)* der multifunktionellen ADAM-Proteinfamilie enthält. In diesem Gen sind beim Menschen bereits Mutationen beschrieben, welche die Zapfen-Stäbchen Dystrophie (*cone-rod dystrophy, CRD*), eine die Photorezeptorfunktion betreffende retinale Dystrophie, verursachen (Parry et al. 2009). Außerdem soll diskutiert werden, weshalb in den (durch SNP-*microarray* basierende Homozygotie-Kartierungen) identifizierten, homozygoten Kandidatenregionen für keine der übrigen drei Rassen das Kandidatengen mit der gPRA-verursachenden Mutation gefunden werden konnte.

3.2. Material und Methoden

3.2.1. Tiere und Diagnose

Alle Hunde entstammen der Zuchtpopulation von reingezüchteten GIT, AT, Lö und Sa, bei denen die gPRA ar vererbt wird. Der gPRA Status von erkrankten und gesunden Hunden wurde von erfahrenen Tierärzten mittels Ophthalmoskopie festgestellt und in Augenbefundbögen dokumentiert. In allen vier Rassen ist die gPRA durch einen späten Krankheitsbeginn charakterisiert.

Für genomweite SNP-*microarray* Analysen dieser Rassen wurden insgesamt 33 gPRA betroffene Tiere (GIT: n = 12, AT: n = 7, Lö: n = 6, Sa: n = 8) aus den vorliegenden Stammbäumen verwendet (Abb. 2.1). Als Kontrollen wurden insgesamt 12 gPRA-erkrankte Hunde verschiedener Rassen ausgewählt: acht davon aus Rassen mit bekannter gPRA Mutation (Schapendoes: n = 5, Sloughi: n = 1, Kuvasz: n = 1, Entlebucher Sennenhund: n = 1) und vier aus Rassen mit noch unbekannter Mutation (für GIT und Sa: je zwei AT und Lö; für AT: je zwei GIT und Lö; für Lö: je zwei AT und GIT). Die auf diese Weise identifizierten homozygoten Kandidatenregionen wurden für GITs mit 32 Hunden (davon 10 gPRA-erkrankt) und für AT, Lö und Sa mit jeweils 22 Hunden (davon entsprechend neun, sechs bzw. sieben gPRA-erkrankt) aus den Stammbäumen (Abb. 2.1) feinkartiert.

Für die Mutationsanalyse bei GITs wurden Blutproben einer größeren Kohorte (n = 138, davon 14 gPRA-erkrankte GITs), überwiegend aus einem großen Stammbaum mit multiplen Inzuchtereignissen, genutzt. Außerdem wurden Blutproben von 383 gesunden Hunden aus 34 Rassen, von 60 gPRA-betroffenen Hunden aus 28 Rassen (Lippmann et al. 2006a) sowie

Muskelgewebe von zwei Wölfen (vgl. Kapitel 1) verwendet. Die Blutproben wurden in Zusammenarbeit mit den entsprechenden Zuchtvereinen von den Hundebesitzern zur Verfügung gestellt. Die Isolierung der genomischen DNA erfolgte wie in Kapitel 1 beschrieben.

Für cDNA-, qRT-PCR-, Western-Blot- und immunhistochemische Analysen wurden Augen und Muskel von einem gPRA-erkrankten, 10,5 Jahre alten GIT (mit diagnostizierter Nachtblindheit und stark eingeschränktem Sehvermögen bei Tageslicht) sowie von einem gesunden Saarloos Wolfhund (als Kontrolle) von Veterinärmedizinern zur Verfügung gestellt. Diese mussten wegen einer anderen schwerwiegenden Erkrankung eingeschläfert werden. Zusätzlich wurden Augen von einem Menschen mit unbekannter ophthalmologischer Erkrankung *post mortem* aus dem Institut für Anatomie der RUB gemäß der ethischen Richtlinien der örtlichen Ethik-Kommission der RUB (Nr. 3386-09) verwendet.

3.2.2. SNP-*microarray* Analysen und Homozygotie-Kartierung

Für die genomweite SNP-Genotypisierung der vier o.g. Hunderassen wurde der Canine Genome 2.0 Array „Platinum Panel“ (Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA, USA) mit 49.663 SNP-Markern verwendet und gemäß dem Protokoll für humane 500K *microarrays* (Mapping 500K Assay Manual; www.affymetrix.com) durchgeführt (Karlsson et al. 2007): 250 ng DNA wurden mit dem Enzym *StyI* verdaut. An die *sticky-ends* der verdauten DNA wurden *StyI*-Adapter ligiert, die in der anschließenden PCR als Erkennungssequenz für den allgemeinen PCR-Primer fungierten. Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte, abweichend vom 500K *microarray*-Protokoll, mit magnetischen Beads (Agencourt® AMPure® XP, Beckman Coulter, Krefeld). Dazu wurden dem PCR-Produkt gemäß den Herstellerangaben 1,8 µl AMPure pro 1 µl PCR-Produkt zugefügt, resuspendiert und nach 10-minütiger Inkubation bei RT für 3 min bei 16.000 UpM zentrifugiert. Die Proben wurden auf einen Magnetständer (MagnaRack, Invitrogen, Karlsruhe) gestellt, der Überstand verworfen und das Pellet mit 75 %igem EtOH gewaschen. Nach dreiminütiger Zentrifugation bei 16.000 pM wurden die Proben erneut auf den Magnetständer gestellt, der Überstand verworfen und für 15 min an der Luft trocknen gelassen. Danach wurde das Pellet in 57 µl Elution Puffer (Quiagen, Hilden) für 10 min auf einem Schüttler (Scientific Industries, NY, USA) resuspendiert, anschließend 5 min bei 16.000 UpM zentrifugiert, auf den Magnetständer platziert und nach 30 min 55 µl des Eluats in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach wiederholtem Zentrifugationsschritt und Platzierung auf dem Magnetständer wurden 53 µl des Eluats entnommen und für die Quantifizierung sowie Normalisierung verwendet. Insgesamt wurden 90 µg des gereinigten PCR-Produkts mit DNase I fragmentiert, mit Biotin endmarkiert und für 18 h bei 49°C und 60 UpM rotierend im Hybridisierungssofen (GeneChip® Hybridization Oven 645, Affymetrix) auf dem *microarray* hybridisiert. Nach der Hybridisierung wurden die

microarrays in der GeneChip® Fluidics Station 450 (Affymetrix) gewaschen und mit Streptavidin-Phycoerythrin gefärbt. Zur Signalverstärkung wurde durch einen biotinylierten Anti-Streptavidin Antikörper (AK) zusätzliches Streptavidin-Phycoerythrin gebunden. Die Fluoreszenzsignale der *microarrays* wurden mit dem GeneChip® Scanner (Affymetrix) erfasst und als CEL-Files ausgegeben. Die Erzeugung der SNP-Genotypen erfolgte mit der DOS-basierten Affymetrix-Software atp-geno-qc. Analog zur Vorgehensweise einer veröffentlichten Studie (Parker et al. 2009) wurden SNPs, die in mehr als 60 % der Individuen einen heterozygoten Genotyp zeigten, von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Die verbleibenden 42.950 informativen SNPs wurden in die Homozygotie-Kartierung einbezogen.

Für das Homozygotie-*Screening* wurde das Programm *HomozygosityMapper* (Seelow et al. 2009) verwendet, um Regionen zu identifizieren, in denen alle gPRA-erkrankten Hunde einer Rasse homozygote Genotypen aufweisen. Gleiche Genotypen auch in Kontrollhunden dienten als Ausschluss-Kriterium, sodass diese Regionen für die Feinkartierung vernachlässigt werden konnten.

3.2.3. Feinkartierung homozygoter Kandidatenregionen

Die Feinkartierung der homozygoten Kandidatenregionen erfolgte über die Fragmentanalyse von Mikrosatellitenmarkern in Familienstammbäumen, wie zuvor im Detail beschrieben (Kapitel 2). Dazu wurden zur groben Eingrenzung und Charakterisierung einzelner chromosomaler Kandidatenregionen (insbesondere für Sa) entsprechende Marker des erweiterten Mikrosatellitenmarker-Sets (Kapitel 2) verwendet. Darüber hinaus wurden 114 zusätzliche Marker (GIT: n = 39, AT: n = 44, Lö: n = 10, Sa: n = 21) für die vier Rassen in diesen Regionen aus der UCSC-Hundegenom-Datenbank ausgewählt und untersucht.

In einzelnen Kandidatenregionen, die anhand von Mikrosatellitenmarkern nicht näher eingegrenzt werden konnten, wurden für die weitere Feinkartierung zusätzlich SNP-Marker verwendet (GIT: n = 13, AT: n = 6, Sa: n = 4), die aus der CanFam 2.0 SNP Datenbank (Broad Institute of MIT and Harvard, Mai 2005 *Assembly*) ausgewählt wurden. Die PCR-Bedingungen für deren Analyse sind bis auf abweichende Konzentrationen von F- und R-Primern (10 pM) und MgCl₂ (2 - 3 mM) sowie eine verminderte Zyklenanzahl (n = 28) die gleichen wie die für die Amplifikation von Mikrosatellitenmarkern (Kapitel 2). Die PCR-Produkte wurden in Abhängigkeit der SNP enthaltenden DNA-Sequenz mit spezifischen Restriktionsenzymen geschnitten, zur Analyse im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mit anschließender Ethidiumbromid-Färbung visualisiert. Die Primersequenzen der verwendeten Feinkartierungsmarker sind in Tab. A5 zusammengefasst.

3.2.4. Auswahl und Analyse von Kandidatengen

Für die Analyse von Kandidatengen innerhalb eingegrenzter Kandidatenregionen wurden solche Gene bevorzugt untersucht, in denen bereits Mutationen ursächlich für retinale Erkrankungen beim Menschen beschrieben worden waren (RetNet-Datenbank). Weitere Genkandidaten waren solche, die eine hohe Expression im Auge aufwiesen (EST-Datenbank; www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene) bzw. funktionell bedeutsam für die Retina waren.

Um die Exon/Intron Grenzen von Kandidatengen (GIT: *ADAM9*; AT: *PP1P5K2*; Lö: *PXMP3*; AT und Lö: *PLEKHBI*, *ARHGEF17*) zu prüfen, wurden deren genomische Sequenzen beim Hund aus der UCSC-Datenbank mit den entsprechenden menschlichen mRNA-Sequenzen verglichen. Für die Sequenzierung aller codierenden Exons der o.g. Kandidatengene wurden Primer in den angrenzenden intronischen Sequenzbereichen ausgewählt (Tab. A6). Die Sequenzierreaktion erfolgte nach der Didesoxy-Kettenabbruchmethode nach Sanger, unter der Verwendung des DYEnamic ET Terminator Kits (GE Healthcare, Freiburg), nach Angaben des Herstellers auf dem automatischen Kapillarsequenzierer (MegaBACE 1000, GE Healthcare). Die erhaltenen Sequenzen wurden mit dem Programm SeqMan (DNASTar, Madison, WI, USA) ausgewertet. Neu identifizierte Sequenzen wurden durch überlappende cDNA-Analysen verifiziert. Zum Überprüfen, ob identifizierte intronische Sequenzvariationen für die jeweilige Genregulation essentiell und somit in unterschiedlichen Spezies konserviert sind, wurden diese Sequenzvariationen mit bereits verfügbaren Sequenzen der UCSC-Datenbank verglichen.

3.2.5. Analyse der Kandidatenregion auf CFA16 inklusive *ADAM9*-Gen

3.2.5.1. Haplotyp- und Statistische Kopplungsanalysen

Die Haplotyp-Analyse der homozygoten Kandidatenregion auf CFA16 (27.76–30.02 Mb) wurde mit jeweils sechs Mikrosatelliten- und SNP-Markern der Feinkartierung (16FK27.76, 16SNP27.84, 16SNP28.25, 16FK28.58, 16SNP28.59, 16SNP28.78, 16SNP28.93, 16FK29.39, 16SNP29.41, 16FK29.42, 16FK29.50 und 16FK30.02) durchgeführt, um Rekombinationsereignisse innerhalb der GIT-Stammbäume identifizieren zu können. Der LOD-Score wurde über Zwei-Punkt-Analysen mit der Superlink-online 1.0 Software berechnet (Kapitel 2).

3.2.5.2. Mutations- und Genomsequenzanalysen von *ADAM9*

Für die Mutationsanalyse und Abschätzung der Deletionsgröße im *ADAM9*-Gen wurden Teilbereiche von Intron 14 und 16 mit verschiedenen überlappenden PCR-Primer Kombinationen amplifiziert, um die Rekombinationsbruchpunkte zu identifizieren.

Da die genomische Sequenz von CFA16 (NCBI Accession NC_006598) eine Lücke im Intron 3 des *ADAM9*-Gens beinhaltet, wurde die Region als *Long-Range-PCR (expand high*

fidelity PCR system; Roche, Mannheim) amplifiziert. Ein weiterer Sequenzbereich im Intron 3 (einschließlich des 5'-Bereichs von Exon 4) wurde ebenfalls amplifiziert und wie die *Gap*-Region durch nested PCRs und Sequenzierung verifiziert. Die für diese Analysen verwendeten Primersequenzen sind in Tab. A7 aufgeführt.

3.2.5.3. cDNA-Analysen

Die Gesamt-RNA aus Retina und Muskel wurde bis zu dem Punkt der Phasen-Trennung mit peqGoldTriFast™ Reagenz (Peqlab, Erlangen) nach Herstellerangaben isoliert. Die RNA enthaltende wässrige Phase wurde mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) nach dem Protokoll des Herstellers gewaschen, eluiert und bei -80°C gelagert. Die cDNA wurde mit einem Primer im 3'-UTR-Bereich 5'-TTTTCATTCATAGTTGCAGCAGGAAG-3' des *ADAM9*-Gens und der *Omniscript reverse transcriptase* (Qiagen) hergestellt. Die Amplifikation der cDNA erfolgte mit den in Tab. A8 aufgeführten PCR-Primern. Die Exon-überlappenden PCR-Amplifikate wurden aus dem Agarosegel gereinigt (Illustra GFX PCR DNA and gel band purification Kit, GE Healthcare, Freiburg) und auf dem Kapillarsequenzierer MegaBACE 1000 (GE Healthcare) analysiert.

3.2.5.4. Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) Analysen

Die Gesamt-RNA der Retina des gPRA-erkrankten GIT und eines gesunden Sa sowie von Muskelgewebe (Sa) wurde mit dem High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Darmstadt) gemäß den Angaben des Herstellers in cDNA revers transkribiert. Die qRT-PCR wurde mit my-Budget 5xEvaGreen QPCR Mix II (ROX; Bio-Budget Technologies, Krefeld) nach Herstellerangaben im one-step-plus RT-PCR Detektion System (Applied Biosystems) durchgeführt. Um Kontaminationen durch genomische DNA bei der Amplifikation zu vermeiden, wurden die Primer so gewählt, dass sie Exon-Grenzen überspannten (Tab. A9). Die Werte für *baseline* und *threshold* wurden automatisch gewählt. Die *threshold cycle* (CT)-Werte wurden mit der one-step-plus Software (Applied Biosystems) bestimmt. Die relative RNA-Expression wurde nach der $\Delta\Delta$ -CT Methode (Livak und Schmittgen 2001) mit einer Normalisierung auf das Haushaltsgen *GAPDH* kalkuliert.

3.2.5.5. Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus (SSCP)-Analysen

Alle 22 Exons des *ADAM9*-Gens wurden mit der SSCP-Analyse nach Spinardi et al. (1991) gemäß einem modifizierten Protokoll (Milterski et al. 2000) untersucht. Zur Optimierung des *Mutation-Screenings* wurden die radioaktiv-markierten PCR-Produkte entsprechend ihrer Amplikonlänge mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten (Tab. A6; Jaeckel et al. 1998). Nach Denaturierung der Doppelstränge und sofortiger Kühlung auf Eis wurden die Fragmente in 6 %igen denaturierenden Polyacrylamid-Gelen mit zwei unterschiedlichen

Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt: a) 37,5:1 Acrylamid/Bisacrylamid (Serva, Heidelberg) plus 5 % Glycerin und 0,5 x Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE); b) 19:1 Acrylamid/Bisacrylamid (Serva) plus 5 % Glycerin, 1 M Urea und 1 x TBE. DNA-Proben, die im SSCP-Gelfoto Verschiebungen des Bandenmusters zeigten, wurden amplifiziert und sequenziert.

3.2.5.6. Western-Blot-Analysen

Das Auge eines gPRA-erkrankten GITs wurde präpariert, die Retina entnommen, in 100 % EtOH fixiert und bei -80°C gelagert. Menschliche Retinae sowie diejenige eines gesunden Saarloos Wolfhunds wurden nach der Präparation direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Im Allgemeinen wurden die Western-Blot-Analysen nach Dekomien et al. (2009) durchgeführt, jedoch mit folgenden Modifizierungen: Das in flüssigem Stickstoff schockgefrorene Gewebe von Mensch und Hund wurde nach der Homogenisierung für 20 min bei 2600 UpM zentrifugiert und der Überstand für die weitere Analyse verwendet. Für die EtOH-fixierte GIT-Retina wurde der Zentrifugationsschritt auf 5 min bei 800 Upm reduziert und der Überstand mittels Vivaspin Zentrifugalkonzentratoren (VIVASPIN500, Sartorius Stedim Biotech, Göttingen) aufkonzentriert. Die Proteinbestimmung erfolgte nach einem modifizierten Lowry *assay* (Markwell et al. 1978). Die bei 40°C denaturierten Protein-Proben (Proteinmenge: 40 µg) wurden mittels 10 %igen Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt (*sodiumdodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) und im Anschluss auf eine Nitrocellulose-Membran (Hybond C 0,45 µm Porengröße, GE Healthcare) transferiert. Nach Blockierung unspezifischer Bindungen mit 1 % Blockierungslösung (Western Blocking Reagent, Roche, Pentzberg) wurde die Membran mit dem polyklonalen Anti-ADAM9-AK (C-terminal, SH090410D, Abgent, San Diego, USA; 1:200 Verdünnung; Detektion der aktiven ADAM9-Form bei einem Molekulargewicht von ~84 kDa) bei 4°C über Nacht inkubiert und das Signal nach einem Protokoll (Dekomien et al. 2009) dargestellt. Nach Entfernung des AKs von der Membran wurde diese für den Ladekontrollen-Nachweis mit dem polyklonalen Anti-Phosphodiesterase-6-beta (PDE6B)-AK (PA1-722, Thermo Scientific, Dianova, Hamburg; 1:500 Verdünnung) wiederverwendet. Zum Nachweis der Spezifität des Anti-ADAM9-AK wurde das Anti-ADAM9-AK Blockierungspeptid (SD100518A, Abgent, San Diego, USA; Konzentration 0,001 mg/µl) im 80fachen Überschuss mit dem AK inkubiert und dieser, wie zuvor beschrieben, auf die Membran appliziert und detektiert. Der Einsatz des Blockierungspeptids verhindert die Bindung des AK an das Epitop im retinalen Zelllysate und ermöglicht somit die Detektion spezifischer Signale.

3.2.5.7. Histologie und Immunhistochemie

Das enukleierte Auge des gPRA-erkrankten GITs wurde für drei Tage in 4 % Paraformaldehyd fixiert, sagittal auf der Ebene des optischen Nervs geschnitten und in Phosphatpufferter NaCl-Lösung für 4 h gewaschen. Das zuvor in Paraffin eingebettete Auge wurde seriell in 15 µm-Sektionen geschnitten, auf Superfrost Plus *Slides* (Menzel, Braunschweig) aufgebracht und bei 40°C getrocknet. Jeder zehnte Schnitt wurde mit Hämatoxylin-Eosin (HE) als morphologische Referenz gefärbt. Für die weitere Beurteilung des Zustands der Retina wurden einige Schnitte nach einem Protokoll (Dekomien et al. 2009) immunfluoreszenztechnisch mit AK gefärbt. Die Schnitte wurden mit einem monoklonalen Anti-Rhodopsin-AK (MAB5316, Chemicon, Temecula, USA; 1:5000 Verdünnung) inkubiert, um den Zustand der Photorezeptoren zu beurteilen. Für die Darstellung von Horizontalzellen wurde alternativ ein polyklonaler Anti-Calbindin D-28k-AK (CodeNo. Cb-38a, Swant, Belinzona, Schweiz; 1:10000 Verdünnung) verwendet.

3.3. Ergebnis

3.3.1. Identifizieren von Kandidatenregionen

Durch die genomweite SNP-Genotypisierung mit Affymetrix Canine Genome 2.0 Arrays und anschließender Homozygotie-Kartierung konnten für die untersuchten Rassen maximal 16 homozygote Regionen auf 11 unterschiedlichen Chromosomen identifiziert werden. Beim Vergleich dieser Kandidatenregionen zu den Kontrollhunden zeigten 13 Regionen auch bei den Kontrollen den gleichen Genotyp und konnten daher für die Feinkartierungsanalyse ausgeschlossen werden. Im Allgemeinen waren die identifizierten Kandidatenregionen bei allen vier untersuchten Rassen verhältnismäßig klein. Die kleinsten Regionen wurden bei Lö mit Regionen meist ≤ 1 Mb und die größten Regionen bei Sa und GIT mit Größen von 7 bzw. 5 Mb gefunden.

3.3.2. Feinkartieren von Kandidatenregionen

Zur groben Eingrenzung einzelner Kandidatenregionen, insbesondere bei Sa, wurden Mikrosatellitenmarker des erweiterten MSS-2 verwendet, die vorab für eine gPRA-Kopplung in GIT, AT und Lö ausgeschlossen worden waren (Kapitel 2). Auch für Sa zeigte keiner der regionsspezifisch ausgewählten Marker aus diesem Set eine eindeutige Kopplung mit dem gPRA-Status in Sa-Familienstammbäumen. Bei der Feinkartierung durch weitere Marker wurde für GITs in der Region mit dem höchsten Wert an Homozygotie auf CFA16 (24,7 - 29,9 Mb; Abb. 3.1B) ein Marker (16FK28.58) gefunden, der bei allen gPRA-erkrankten Hunden der untersuchten GIT-Stammbäume einen homozygoten Zustand und einen LOD-Score von 3,71 ($\theta = 0,000$) zeigte. Zur weiteren Eingrenzung der Kandidatenregion wurden SNPs untersucht, wodurch Rekombinationsereignisse bei 27,76 und 29,50 Mb identifiziert und die Region auf 1,74 Mb mit nur 10 Kandidatengen reduziert werden konnten (Abb. 3.1C).

Für ATs, Lö und Sa wurde kein Feinkartierungsmarker und damit auch keine Kandidatenregion, die eindeutig mit der gPRA gekoppelt war, identifiziert. Allerdings konnten für ATs insgesamt zwei Regionen auf CFA21 und CFA3 nicht vollständig ausgeschlossen werden, sodass sie durch zusätzliche SNP-Marker auf Haplotypblöcke der Größen 1,2 Mb bzw. 0,2 Mb eingegrenzt wurden.

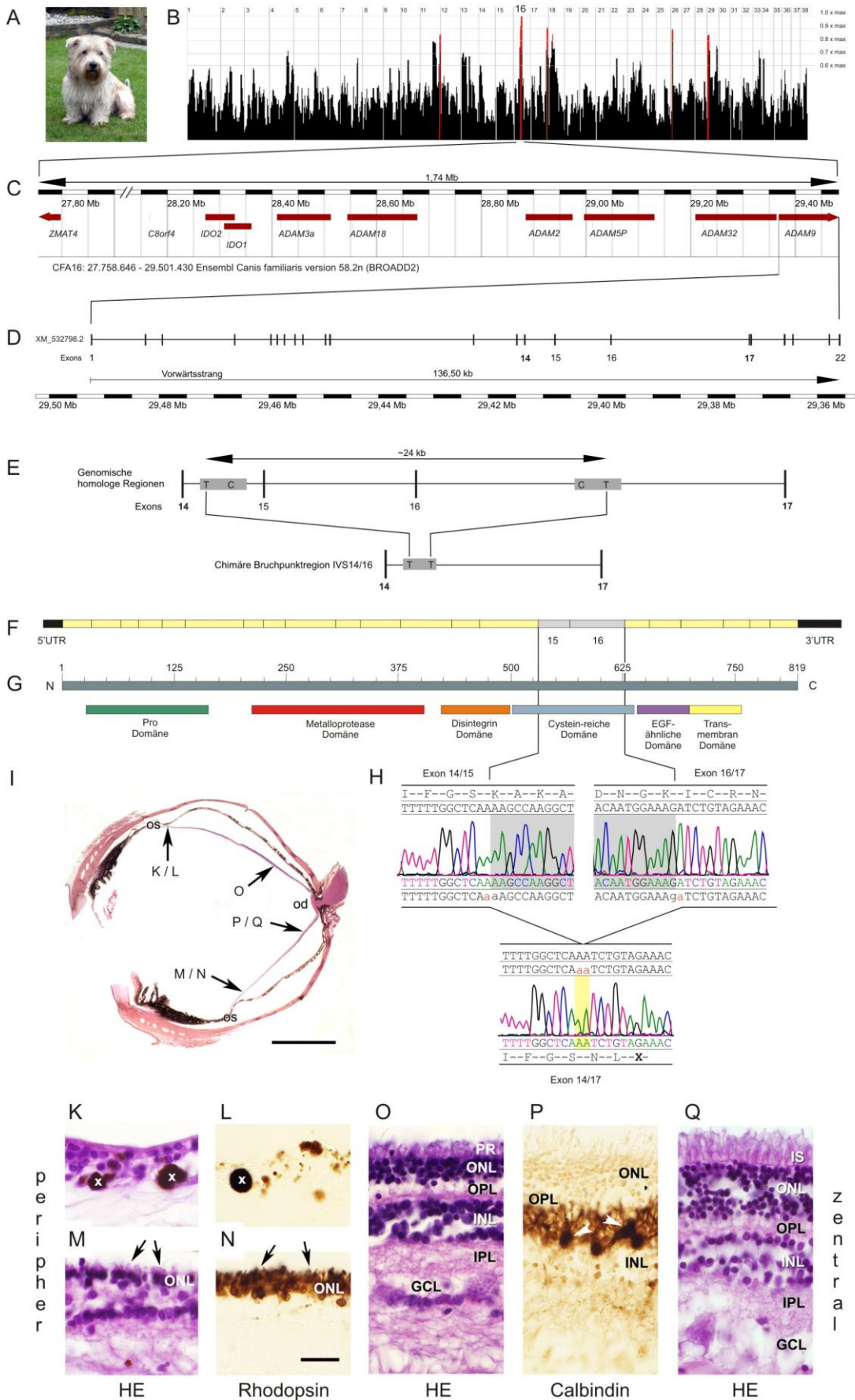


Abbildung 3.1 Kandidatenregion auf CFA16 identifiziert in Irish Glen of Imaal Terriern (GIT) via Homozygotie-Kartierung, einschließlich aller Kandidatengene, der neu identifizierten *ADAM9*-Mutation sowie morphologischer und immunohistochemischer Charakterisierung eines gPRA-erkrankten GIT Auges. **A** GIT. **B** Genomweite Ver-

teilung der homozygoten DNA-Sequenzregionen der SNP-*microarray* basierten Homozygotie-Kartierung von 12 gPRA-erkrankten GITs verglichen mit 12 Kontrollen. Homozygotie-Werte sind entsprechend ihrer physikalischen Position auf den 38 autosomalen Chromosomen dargestellt. Regionen mit besonders hohen Homozygotieraten sind als rote Peaks dargestellt. **C** Physikalische Karte der Kandidatengene in der feinkartierten, kritischen gPRA-Region mit einer Größe von 1,74 Mb. **D** Exon/Intron Struktur des *ADAM9*-Gens (Ensembl Accession: XM_532798.2). **E** Homologe Regionen des *ADAM9*-Gens (hellgraue Blöcke) und chimäre Bruchpunktregion im Intron 14/16 des mutierten *ADAM9* beim erkrankten GIT. **F** cDNA-Struktur des *ADAM9*-Gens einschließlich Exons 15 und 16 (EMBL Accession: FR667706), der Deletionsregion. (C, D, F sind modifizierte Abbildungen der Datenbanken Ensembl und NCBI.) **G** Protein-Sequenz des *ADAM9* mit seinen Hauptdomänen durch verschiedene Farben hervorgehoben. **H** Chromatogramme eines Teilbereichs der *ADAM9*-cDNA zeigen die Wildtyp-Sequenzen der Exon-Grenzen 14/15 und 16/17 sowie die entsprechende cDNA-Sequenz dieser Region beim erkrankten GIT mit der Deletion der beiden Exons 15 und 16, die zum vorzeitigen Stopp-Codon führt (EMBL Accession: FR 667708). Exon-Grenzen sind mit Kleinbuchstaben und im Fall der cDNA des erkrankten GITs zusätzlich gelb gekennzeichnet. Das erste sowie das letzte Nukleotid von Exon 14 und 17 sind rot markiert. Die Exon 15/16 Deletion ist hellgrau hinterlegt. **I** Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbte Paraffin-Schnitte der gesamten Retina im Bereich des Sehnervenkopfes (*optic disc*, od) eines 10,5 Jahre alten, gPRA-erkrankten GITs. Verschiedene Schnitte der peripheren und zentralen Retina (K-Q) sind mit Pfeilen markiert und in höherer Auflösung dargestellt. **K** Die äußersten peripheren Bereiche, nahe der Ora serrata (os), der erkrankten Retina zeigen vollständigen Verlust der retinalen Schichten und zahlreiche Pigmentablagerungen (x). **L** Den dargestellten Bereichen fehlt das Rhodopsin-Signal. **M** In angrenzenden peripheren Bereichen wurden Reste von Photorezeptoren (Pfeile) und retinalen Schichten identifiziert. **N** Die extrem verkürzten Photorezeptoren (Pfeile) und die dünne Linie der äußeren Körnerschicht (*outer nuclear layer*, ONL) sind Rhodopsin-immunpositiv. **O** In der zentralen Retina sind in dem HE-gefärbten Schnitt alle Schichten deutlich erkennbar, allerdings variiert der Erhaltungszustand. In einigen Bereichen ist die ONL dünn und die Photorezeptoren (PR) sind desorganisiert sowie verkürzt. **P** Calbindin-immungefärbte Regionen mit dünner ONL zeigen eine normale Färbung der Horizontalzellen (Pfeilköpfe) in der inneren Körnerschicht (*inner nuclear layer*, INL) und ihrer Fortsätze in der äußeren plexiformen Schicht (*outer plexiform layer*, OPL). **Q** In anderen zentralen Bereichen sind die inneren Segmente (IS) der Photorezeptoren besser erhalten und Stäbchen sowie Zapfen sind in dem HE-Schnitt deutlich zu unterscheiden. Innere plexiforme Schicht (*inner plexiform layer*, IPL); Ganglienzellschicht (*ganglion cell layer*, GCL); Maßstab in G=1cm; Maßstab in K-Q=20µm.

3.3.3. Analyse von Kandidatengen

In der mit der gPRA bei GITs gekoppelten Kandidatenregion wiesen Vergleiche mit der RetNet-Datenbank (<http://www.sph.uth.tmc.edu/retnet/>) *ADAM9* (Abb. 3.1D) als potentiell Kandidatengen auf, da Mutationen in diesem Gen zur CRD beim Menschen führen (Parry et al. 2009). Entsprechend seiner Orientierung im Genom wurden zunächst Exon 12 - 22 des *ADAM9*-Gens mittels Sequenzanalyse untersucht. Dabei wurde in diesem Gen bei gPRA-erkrankten GITs eine Deletion der Exons 15 und 16 im homozygoten Zustand identifiziert. Um zu überprüfen, ob diese Mutation auch ursächlich für gPRA in anderen Rassen ist, wurden alle 22 Exons mittels SSCP-Analyse in 45 gPRA-erkrankten Hunden von 24 Rassen und zwei Wölfen untersucht. Insgesamt wurden vier intronische Polymorphismen, nicht aber die *ADAM9*-Deletion von Exon 15 und 16 gefunden (Tab. 3.1). Nur einer der Polymorphismen (IVS4-45A>G) wurde bei gPRA-erkrankten Bolognesern, Berger des Pyrénées, Coton de Tuléar, Collies, Polnischen Niederungshühnhunden, Salukis und Tibet Terriern im heterozygoten Zustand nachgewiesen. Darüber hinaus wurden im *ADAM9*-Gen zahlreiche Poly-T-*Stretch*-Verlängerungen identifiziert, die vermutlich auf *Slippage*-Probleme der Taq-Polymerase zurückzuführen sind (Clarke et al. 2001) und daher nur PCR-Artefakte darstellen.

Da für Lö und Sa keine der homozygoten Regionen anhand eines gekoppelten Feinkartierungsmarkers eindeutig mit der gPRA assoziiert war, wurden sie mittels RetNet-Daten-

bank auf Kandidatengene mit beschriebenen RP-Mutationen überprüft. Für Sa gab es innerhalb der Kandidatenregionen keine RP-spezifischen Gene, die potentielle Kandidaten für die kausale gPRA-Mutation gewesen wären. Für Lö dagegen ist in der homozygoten Region auf CFA29 das *PXMP3*-Gen beschrieben, welches beim Menschen auf Chromosom 8 (8q21.13) lokalisiert ist und mit dem Zellweger-Syndrom bzw. mit progressiver RP assoziiert ist (Shimozawa et al. 1992). In dem einzigen Protein-kodierenden Exon 4 wurde bis auf zwei kodierende Sequenzvariationen ohne Aminosäure (AS)-Austausch im homozygoten Zustand keine Mutation für die gPRA beim erkrankten Lö identifiziert.

Da in den eingegrenzten Kandidatenregionen der ATs auf CFA21 und CFA3 keine Gene mit bereits beschriebenen RP-assoziierten Mutationen in der RetNet-Datenbank zu finden waren, wurden vorrangig die Gene für die Sequenzanalyse ausgewählt, die in der Retina exprimiert sind. Nach der EST-Datenbank gab es in der Region auf CFA3 nur ein Gen (*PPIP5K2*) und auf CFA21 insgesamt 14 Gene (Abb. 3.2), die u.a. im Auge exprimiert werden. Von diesen 14 Genen wurden die beiden Gene *PLEKHB1* und *ARHGEF17* mit der höchsten Expression bzw. aufgrund ihrer Funktion vorrangig untersucht. Da für Lö in der Region auf CFA21 ebenfalls Homozygotie nachgewiesen wurde, wurden o.g. Gene auch für diese Rasse analysiert. Insgesamt wurden in diesen drei Genen 33 Sequenzvariationen identifiziert (Tab. 3.1). Beim erkrankten AT wurde im *PPIP5K2*-Gen keine krankheitsverursachende Mutation, sondern es wurden nur einige Polymorphismen im heterozygoten Zustand gefunden. Im *PLEKHB1*-Gen wurden weder bei Lö noch bei ATs Sequenzvariationen im heterozygoten Zustand identifiziert. Vergleichbares gilt für identifizierte Polymorphismen im *ARHGEF17*-Gen für Lö. Beim erkrankten AT dagegen wurden in Exon 1 dieses Gens eine 6 bp Expansion eines CAG-Repeats c.598CAG[11] sowie der Polymorphismus c.2189A>T, der zu einem AS-Austausch führt, im homozygoten Zustand gefunden. Eine zusätzliche Analyse von weiteren drei gPRA-erkrankten ATs sowie sieben Hunden anderer Rassen mit bereits identifizierter gPRA-Mutation (Sl, SD, GIT, Ku) zeigte allgemeine Heterogenität des CAG-Repeats. Sowohl der Repeat als auch der Polymorphismus wurden bei den drei erkrankten ATs im heterozygoten Zustand identifiziert, wodurch die Region auf 0,7 Mb eingegrenzt werden konnte.

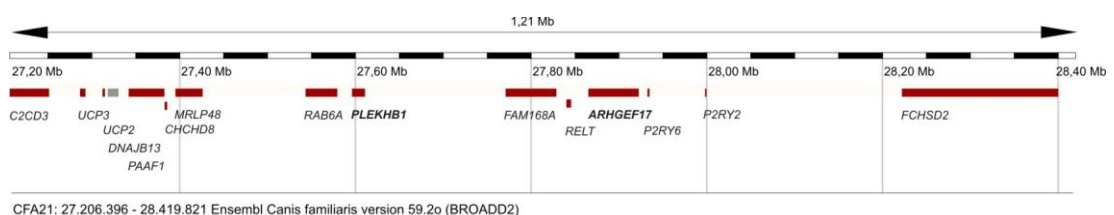


Abbildung 3.2 Kandidatengene innerhalb der homozygoten Region auf CFA21 einer Größe von 1,21 Mb identifiziert für Airedale Terrier. Die 14 Gene, die in der Retina exprimieren, sind in rot dargestellt. Bereits untersuchte Kandidatengene sind fett markiert (Abbildung: modifiziert nach Ensembl-Datenbank).

Tabelle 3.1 Sequenzvariationen in den Kandidatengen *PXMP3*, *PIIP5K2*, *PLEKHBI*, *ARHGEF17* und *ADAM9* für verschiedene Hunderassen. Sequenzvariationen mit heterozygotem Zustand bei gPRA-erkrankten Hunden werden mit fettgedrucktem Rassenamen dargestellt.

Gene	Lokalisation	Sequenzvariation	Aminosäure austausch	Hunderassen	
<i>PXMP3</i>	Exon4	c.66C>T	p.Ala22Ala	Lö	
		c.858G>A	p.Glu286Glu	Lö	
<i>PIIP5K2</i>	Intron2	IVS2+45C>T		AT	
		IVS2+84_88DelAACT		AT	
	Intron4	IVS4+30C>T		AT	
	Exon5	c.876A>G	p.Thr289Thr	AT	
	Exon8	c.1272C>T	p.Asp424Asp	AT	
	Intron9	IVS9-11_12DelT		AT	
	Intron18	IVS18-146T>C		AT	
	Intron22	IVS22-17G>A		AT	
	Intron 24	IVS24-77A>C		AT	
	Intron26	IVS26-11_12DelTC		AT	
<i>PLEKHBI</i>	5UTR	5UTR-95G>T		AT	
	Intron1	IVS1+88A>T		Lö	
	Intron4	IVS4-50G>T		Lö	
	Intron6	IVS6-38_39delAG		AT, Lö	
	Exon7	c.552C>T	p.His184His	Lö	
	Intron7	IVS7-53G>A		Lö	
	Exon8	c.714G>A	p.Ser238Ser	Lö	
	3UTR	3UTR+2T>C		Lö	
<i>ARHGEF17</i>	Exon1	c.435T>C	p.Ser145Ser	AT	
		c.598CAG[11]	p.Gln200	AT	
		c.1530C>T	p.Gly510Gly	AT	
		c.2189A>T	p.Asp730Ile	AT	
	Intron7	IVS7-53T>C		Lö	
	Exon8	c.4387C>A	p.Arg1463Arg	Lö	
	Exon10	c.4587T>C	p.Ser1529Ser	Lö	
	Intron10	IVS10+107_110delTCAC		Lö	
		IVS10-6C>T		Lö	
		IVS10-18A>G		Lö	
	Exon11	c.4613G>C	p.Ser1538Thr	Lö	
	Intron12	IVS12-78C>T		Lö	
		IVS12-88G>A		Lö	
	Exon13	c.5025A>G	p.Glu1675Glu	Lö	
	Intron17	IVS17-112T>C		Lö	
	<i>ADAM9</i>	Intron1	IVS1+21_22delG		Bar, BDP, C, CdT, KV, MS, Sa, TeZL
		Intron4	IVS4-45A>G		Bo, BDP, C, CdT, Po, Sal, TT
Intron5		IVS5-49G>A		Bo, Co, W	
Intron18		IVS18+6A>G		Bo, C, Co, GIT, TT	

AT: Airedale Terrier, BDP: Berger des Pyrénées, Bar: Barsoi, Bo: Bologneser, C: Cocker Spaniel, CdT: Coton de Tuléar, Co: Collie, GIT: Irish Glen of Imaal Terrier, KV: Kuvasz Vizsla, Lö: Löwchen, MS: Mittelschnauzer, Po: Polnischer Niederungshühnd, Sal: Saluki, TeZL: Zwerglanghaar Teckel, TT: Tibet Terrier, W: Wolf.

3.3.4. Mutationsanalyse im Kandidatengen *ADAM9*

3.3.4.1. Charakterisieren der *ADAM9*-Deletion

Die bei gPRA-erkrankten GITs im homozygoten Zustand identifizierte *ADAM9*-Deletion von Exon 15 und 16 konnte in 443 Hunden von 34 verschiedenen Rassen (darunter 60 gPRA-erkrankte Hunde) und zwei Wölfen nicht bestätigt werden, da die PCR-Produkte beider Exons eindeutig nachgewiesen wurden. Das Mutations-*Screening* in 170 untersuchten GITs, überwiegend zugehörig zu einem großen Stammbaum mit vielen Inzuchtereignissen, identifizierte 49 GITs (28.8 %) mit einem homozygoten und 75 GITs (44.1 %) mit einem heterozygoten Genotyp. Somit betrug die Trägerfrequenz der Mutation in dieser Population ~50 %. Bei 25 GITs, die für die Mutation homozygot typisiert worden waren, ist die gPRA bis jetzt phänotypisch noch nicht durch entsprechende Augenbefunde bestätigt.

Um die genomische Größe der Deletion im *ADAM9*-Gen abzuschätzen, wurden Intron 14 und 16 über verschiedene PCR-Primer-Systeme auf Bruchpunkte der Rekombinationsereignisse untersucht. Durch Vergleiche mit der UCSC-Datenbank wurde eine 1.298 bp große Region im Intron 14 (chr16:29422131 - 29423428) identifiziert, die fast identisch im Intron 16 (chr16:29398910 - 29400207) wiederzufinden war (direkte Repeats, dR; Abb. 3.1E). Bis auf sechs Einzelnukleotid-Unterschiede, die Intron 14 bzw. 16 eindeutig zugeordnet werden konnten, zeigte die DNA-Sequenz keine Unterschiede innerhalb der dR-Region des deletierten zu der des nicht-mutierten Allels. Die Bruchpunkte des Rekombinationsereignisses ließen sich deshalb nicht exakt bestimmen, sondern lediglich auf einen 948 bp großen Sequenzbereich im Intron 14 (chr16:29399182 - 29400129) bzw. Intron 16 (chr16:29422403 - 29423350) eingrenzen, womit die Deletion 24.169 bp umfasst.

3.3.4.2. Haplotypanalyse der *ADAM9*-Genregion

Die Haplotypanalyse wurde mit 12 informativen Markern von insgesamt 21 in der Region um die *ADAM9*-Mutation (27,76 – 30,02 Mb) durchgeführt. Zwei der untersuchten Mikrosatellitenmarker waren für GITs monomorph und daher ohne Aussagekraft. Sieben untersuchte SNPs waren entweder homozygot für alle GITs oder sind SNPs mit seltenen Varianten, die bei dieser GIT-Population nicht vorhanden waren. In den untersuchten GIT-Familienstammbäumen wurden Rekombinationsereignisse durch Mikrosatellitenmarker bei 27,84 Mb, 29,50 Mb und 29,39 Mb identifiziert, wobei die letztgenannten im Intron 1 bzw. 16 des *ADAM9*-Gens lokalisiert sind (Abb. 3.3).

3.3.4.3. cDNA-Analysen des Kandidatengens *ADAM9*

Anhand von cDNA-Analysen konnte gezeigt werden, dass die *ADAM9*-cDNA-Sequenz beim gesunden Hund in der Retina sowie im Blut und Muskelgewebe 2.460 bp umfasst, codiert von 22 Exons, die in einem 819 Aminosäuren (AS) großen Protein resultiert (EMBL Accession: FR667706; Abb. 3.1F und G). Vergleiche der retinalen cDNA von einem gPRA-erkrankten GIT mit der eines gesunden Sa zeigten nur beim gPRA-betroffenen GIT den Verlust der beiden Exons 15 und 16 des *ADAM9*-Gens (Abb. 3.1H). Die konzeptionelle Translation der cDNA des gPRA-GITs führt zu einem vorzeitigen Stopp-Codon an der Position c.1599 in Exon 17, was in einem trunktierten Protein mit 534 AS (c.1592_1881del p.Lys531AsnfsX2) resultiert (EMBL Accession: FR667708). Auch im Muskelgewebe des gPRA-erkrankten GITs wurde die Deletion nachgewiesen. In der cDNA aus Blut eines gesunden Weimaraners dagegen waren Exon 15 und 16 vorhanden. Zusätzlich wurde ein neues, alternatives *ADAM9*-cDNA-Transkript ohne Exon 12 (EMBL Accession: FR667707) im Blut und Muskelgewebe eines gesunden Hundes, nicht aber in der Retina identifiziert.

3.3.4.4. Neu identifizierte DNA-Sequenzen im Intron 3 des *ADAM9*-Gens

Vergleiche von Datenbanken zeigten in der caninen Sequenz des *ADAM9*-Gens eine *Gap*-Region im Intron 3. Neben anderen Regionen wurde dieser Bereich sowie die angrenzende Region des Exons 4 mittels *Long-Range*-PCR und anschließender Sequenzierung untersucht und so die fehlende DNA-Sequenz des Intron 3 identifiziert. Die gefundene Sequenz der Region direkt vor Exon 4 wich von der Hunde-Referenzsequenz in der NCBI-Datenbank um 217 bp ab (EMBL Accession: FR667709). Über cDNA-Analysen konnte die neu identifizierte 5'-Sequenz von Exon 4 bestätigt werden. Allgemein zeigten zusätzliche Datenbank-Vergleiche, dass Intron 3 von *ADAM9* viele repetitive Sequenzelemente enthält.

3.3.4.5. Expressionsstudien anhand von qRT-PCR Analysen

Nach der EST-Datenbank (NCBI) wird *ADAM9* in vielen verschiedenen Geweben exprimiert. Für die qRT-PCR wurden cDNAs von retinaler RNA eines gPRA-erkrankten GITs und eines gesunden sowie von muskulärer RNA eines gesunden Hundes amplifiziert. Die RNA-Expression der Exons 15 und 16 des *ADAM9*-Gens in der Retina des erkrankten GIT diente als Negativ-Kontrolle. Das Retina-spezifisch exprimierte Gen *GNATI* dagegen wurde als Positiv-Kontrolle für die retinale Expression verwendet. Wie erwartet, zeigte es eine hohe Expression in der Retina des gesunden Hundes, nicht aber in dessen Muskelgewebe. In der Retina des GITs war die *GNATI*-Expression verhältnismäßig gering, verglichen mit der des gesunden Hundes. Entsprechend gering waren die Expressionsspiegel von *CCDC66* und *ADAM9* beim erkrankten GIT, wobei *ADAM9*, wie erwartet, weitaus am geringsten exprimiert wurde (Abb. 3.4).

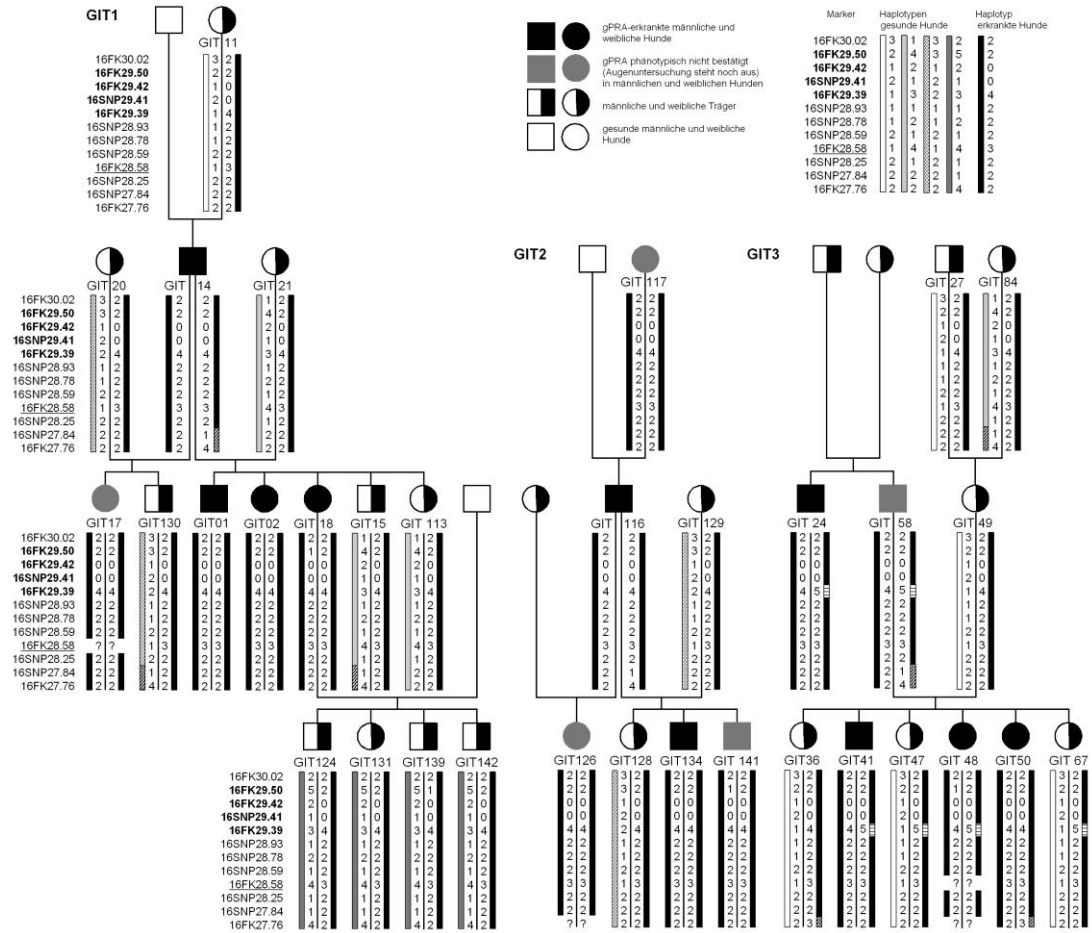


Abbildung 3.3 Haplotypenanalysen von 12 Feinkartierungsmarkern innerhalb der homozygoten Kandidatenregion auf CFA16 für Irish Glen of Imaal Terrier (GIT)-Stammbäumen mit segregierender gPRA. Mikrosatellitenmarker wurden für die Identifizierung von Rekombinationsbruchpunkten verwendet, gekennzeichnet durch verschiedene Schraffierungsmuster. Fettgedruckte Marker sind im *ADAM9*-Gen lokalisiert. Der unterstrichene Marker (16FK28.58) stellt den gPRA-gekoppelten Marker mit einem LOD-Score von 3,71 ($\theta=0,000$) dar. Verschiedene Markerallele sind durch Nummern (1-5) gekennzeichnet. ‚0‘ steht für das deletierte Allel. Marker, die für einige Individuen trotz mehrerer Versuche nicht typisiert werden konnten, wurden mit ‚?’ versehen.

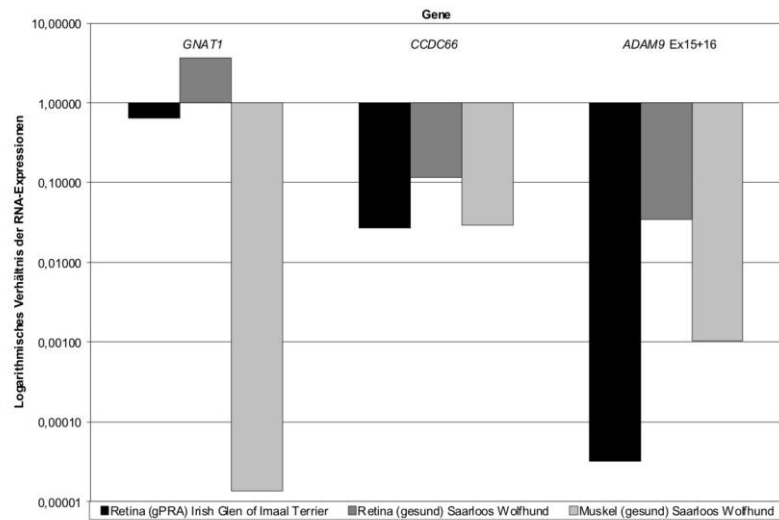


Abbildung 3.4 RNA-Expressionsanalyse verschiedener Gene in Retinae eines gPRA-erkrankten Irish Glen of Imaal Terriers und eines gesunden Saarloos Wolfhunds sowie im Muskel eines gesunden Saarloos Wolfhunds. Expressionsspiegel wurden in Referenz zum Haushaltsgen GAPDH normalisiert.

3.3.4.6. Nachweis der ADAM9-Protein-Expression mittels Western-Blot-Analysen

Mittels Western-Blots wurde die ADAM9-Expression in gesunden Retinae von Mensch und Hund mit einem AK untersucht, dessen Epitop sich in der C-terminalen Region des ADAM9-Proteins befindet. Der C-Terminus im ADAM9-Protein wird auf DNA-Ebene von einer Sequenz stromabwärts von Exon 16 in der 3'-Region codiert. Für beide Spezies konnte in der gesunden Retina ein starkes Bandensignal bei einem Molekulargewicht von ~84 kDa dargestellt werden, welches dem Molekulargewicht der aktiven Form des ADAM9-Proteins entspricht (Roghani et al. 1999; Abb. 3.5A). Beim gPRA-erkrankten GIT war diese spezifische ADAM9-Bande nicht erkennbar. Dies bestätigt vorausgehende Befunde, nach denen beim Vorhandensein der Deletion von Exon 15 und 16 der C-Terminus in einem verkürzten ADAM9-Protein nicht nachweisbar sein sollte. Allerdings fehlte beim gPRA-GIT auch eine Nebenbande bei ~32 kDa, die sowohl in der gesunden caninen als auch humanen Retina identifiziert wurde (Abb. 3.5A).

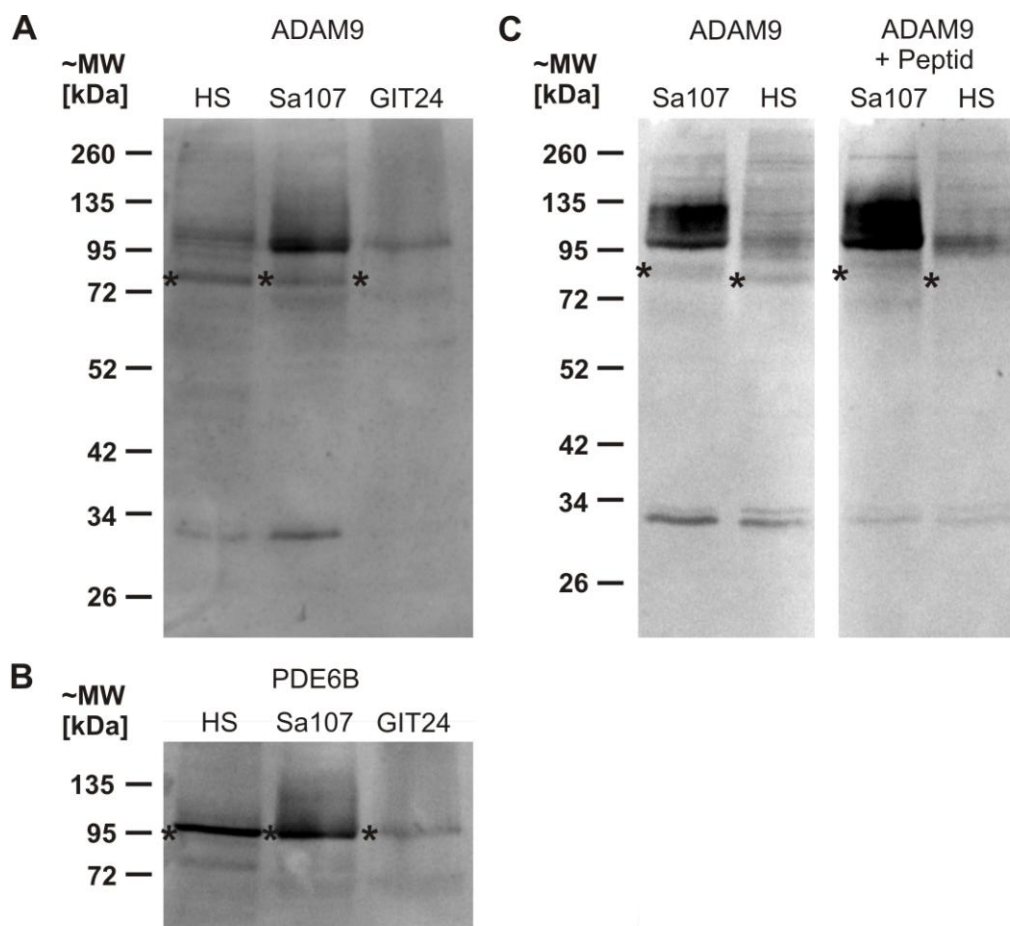


Abbildung 3.5 Western-Blot-Analysen zur retinalen Expression von ADAM9 und PDE6B sowie des Anti-ADAM9-Antikörper-Spezifitätsnachweises bei Hund und Mensch. **A** ADAM9-Expression bei Mensch (*Homo sapiens*, HS), Saarloos Wolfhund (Sa) und Irish Glen of Imaal Terrier (GIT). Die Sternchen markieren die Position des ADAM9-spezifischen Bandensignals bei ~84 kDa. **B** Nachweis der PDE6B-Expression (Ladekontrolle) bei ~95 kDa (Sternchen). **C** Spezifitätsnachweis des Anti-ADAM9-Antikörpers durch Peptidblockierung bei Hund und Mensch. ADAM9-spezifisches Bandensignal liegt bei ~84 kDa, wobei die Bande beim Sa im Vergleich zum Menschen ein höheres Molekulargewicht aufweist (Sternchen).

Als Ladekontrollen-Nachweis diente die Expression des PDE6B-Proteins (~95 kDa), welches spezifisch in Stäbchen-Photorezeptoren exprimiert wird. PDE6B konnte zwar auch beim erkrankten GIT detektiert werden, allerdings nur in wesentlich schwächerem Ausmaß als beim gesunden Hund bzw. Mensch (Abb. 3.5B), wodurch sich möglicherweise die beginnende Degeneration der Stäbchen-Photorezeptoren in der gPRA-Retina widerspiegelt. Um die Spezifität des Anti-ADAM9-AK zu überprüfen, wurde eine Peptidblockierung durch Koinkubation des Anti-ADAM9-AK mit dem entsprechenden ADAM9-Peptid durchgeführt. Beim Menschen fehlte das ADAM9-spezifische Bandensignal bei ~84 kDa, da es spezifisch wegblockiert wurde. Ähnliches war auch beim Hund zu beobachten, allerdings in geringerem Ausmaß. Die übrigen Banden, die keine Intensitätsunterschiede zeigten, stellten unspezifische Nebenbanden dar (Abb. 3.5C).

3.3.4.7. Histologischer und immunhistochemischer Degenerationsnachweis

Die Degeneration der Retina des gPRA-erkrankten GIT wurde in HE-gefärbten Schnitten über die gesamte Retina untersucht (Abb. 3.1I). Nur ein schmaler Randbereich der peripheren Retina, nahe der *Ora serrata*, zeigte den Verlust der gesamten Retina-Struktur sowie große Pigmentablagerungen (Abb. 3.1K). Außerdem konnte in diesem komplett degenerierten Bereich kein Rhodopsin nachgewiesen werden (Abb. 3.1L). In angrenzenden peripheren Regionen dagegen wurden noch Reste der Retina (Abb. 3.1M) mit Rhodopsin-positiven, verkürzten Photorezeptoren und einigen Zellen der äußeren Körnerschicht (Abb. 3.1N) nachgewiesen. In der zentralen Retina waren die meisten Bereiche noch gut erhalten und unterschiedlich stark degeneriert (Abb. 3.1O-Q). Regionen nahe des optischen Nerns zeigten oft wenige ungeordnete Photorezeptoren mit einer dünnen äußeren Körnerschicht (Abb. 3.1O), während in vergleichbaren zentralen Regionen die Körnerschicht wesentlich dicker war und die Photorezeptoren klar in Stäbchen und Zapfen differenziert werden konnten (Abb. 3.1Q). Calbindin-Immunfärbung zeigte eine regelmäßige Färbung der Horizontalzellen und ihrer Fortsätze (Abb. 3.1P).

3.4. Diskussion

3.4.1. Genomweite SNP-*microarray* Analyse bei Irish Glen of Imaal Terriern

Um die kausale Mutation für die ar vererbte gPRA verschiedener Hunderassen zu identifizieren, wurden in dieser Studie Homozygotie-Kartierungen, basierend auf genomweiten SNP-*microarrays*, verwendet. Für die Rasse der GITs konnte die gPRA auf diese Weise in einer ~5 Mb großen Region auf CFA16 kartiert werden. In dem dort lokalisierten Kandidatengen *ADAM9* wurde bei gPRA-erkrankten und Träger GITs eine große Deletion, die zwei Exons umfasste, im homo- bzw. heterozygoten Zustand gefunden. Die gleiche Mutation in diesem Gen, ursächlich für gPRA beim GIT, wurde kürzlich auch von einer amerikanischen Arbeitsgruppe publiziert (Goldstein et al. 2010).

3.4.1.1. *ADAM9*: Kandidatengen für gPRA

ADAM9 ist ein Mitglied der ADAM-Proteinfamilie, einer Gruppe von Metalloproteasen, die zur Superfamilie von Zink-Proteasen gehört. Die ADAM-Familie umfasst membranständige Glykoproteine, die aus einer N-terminalen Pro-Domäne, gefolgt von einer Metalloprotease-Domäne, einem Disintegrin-Motiv, einer cystein-reichen Region, einer epidermalen Wachstumsfaktor (*epidermal growth factor*, EGF) ähnlichen Domäne, einer transmembranen Domäne und einem zytoplasmatischen Schwanz mit potentiellen SH3-Ligand Domänen besteht (Weskamp et al. 1996). ADAM-Proteine sind an unterschiedlichen Prozessen wie Fertilisation, Myogenese, Neurogenese und Ektodomänen-*Shedding* (Schlondorff und Blobel 1999) beteiligt. Beim Menschen sind 21 funktionelle, Protein-kodierende *ADAM*-Gene beschrieben (Brockner et al. 2009), wovon *ADAM9* als Ursache für CRD identifiziert wurde. Im Zusammenhang mit CRD wird vermutet, dass *ADAM9* in der Retina an der Adhäsion an der Grenzfläche zwischen äußeren Segmenten der Photorezeptoren und retinalem Pigmentepithel oder der Neugestaltung der extrazellulären Matrix funktionell beteiligt ist (Parry et al. 2009).

3.4.1.2. Charakterisierung der *ADAM9*-Mutation auf Genomebene

Die identifizierte Deletion im *ADAM9*-Gen ist GIT-spezifisch, da sie in keiner von 34 weiteren gPRA-infizierten Hunderassen gefunden wurde. Auch die retinale cDNA-Analyse bestätigte, dass die beiden Exons 15 und 16 in gesunden Hunden vorhanden waren, bei gPRA-erkrankten GITs aber fehlten. Zudem zeigte die SSCP-Analyse des *ADAM9*-Gens in anderen Rassen keine weiteren krankheitsverursachenden Mutationen. In sieben dieser Rassen konnte dieses Gen aufgrund eines intronischen Polymorphismus im heterozygoten Zustand als gPRA-Ursache mit großer Wahrscheinlichkeit sogar ausgeschlossen werden.

Die Deletion beider Exons führt zu einer Leserasterverschiebung, die in ein vorzeitiges Stopp-Codon und damit in einem trunkeierten Protein von 534 AS resultiert. Demnach besteht

das mutmaßlich verkürzte ADAM9-Protein bei GITs nur noch aus einem Signalpeptid, einer Metalloprotease und Disintegrin Domäne sowie den ersten 29 AS der Cystein-reichen Domäne. Die Cystein-reiche Domäne des ADAM9-Protein spielt eine Rolle bei der Zelladhäsion (Zigrino et al. 2007) und Zellfusion (Namba et al. 2001), die folglich im trunkierten ADAM9-Protein erheblich beeinträchtigt sein müsste.

Die 24.169 bp große Deletion im *ADAM9*-Gen ist offensichtlich durch ein ungleiches Rekombinationsereignis innerhalb der höchst homologen DNA-Bereiche im Intron 14 und 16 entstanden. Diese beiden Regionen weisen eine DNA-Sequenz-Ähnlichkeit von mehr als 97 % auf, was Rekombinationen durch ungleichmäßige Crossing-over-Ereignisse begünstigt (Stankiewicz und Lupski 2002).

3.4.1.3. Untersuchungen zum ADAM9-Protein

Das Protein ADAM9 ist eine katalytisch aktive Disintegrin-Metalloprotease und an verschiedenen Prozessen beteiligt (Deuss et al. 2008). ADAM9 wird ubiquitär in diversen menschlichen Geweben exprimiert und ist bei Mensch und Maus hoch konserviert (Weskamp et al. 1996). In den Invertebraten *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* existieren keine ADAM9-Orthologen, was auf eine besondere funktionelle Bedeutung bei Vertebraten (Weskamp et al. 2002), möglicherweise im Auge (Parry et al. 2009), schließen lässt. Wie vor kurzem beschrieben wurde, ist die Funktion von ADAM9 mit Zapfen oder Regionen mit hoher Photorezeptorzell-dichte (Parry et al. 2009) assoziiert. Die Ergebnisse der durchgeführten qRT-PCRs bestätigen dies indirekt, da die RNA-Expression von *ADAM9* beim gPRA-erkrankten GIT, verglichen mit der von *CCDC66*, das vornehmlich in den inneren Segmenten der Photorezeptoren lokalisiert ist (Dekomien et al. 2009), ausblieb. Im Gegensatz dazu ist die RNA-Expression von *GNAT1*, ein in den äußeren Segmenten der Zapfen-Photorezeptoren spezifisch exprimiertes Gen, im gPRA-erkrankten GIT weniger stark reduziert als die relative Reduktion der *ADAM9*-Expression. Trotz des sehr späten Beginns der gPRA in dieser Rasse zeigt dies, dass im untersuchten GIT noch Zapfen-Photorezeptoren vorhanden sind. Dies belegen auch die Ergebnisse der histologischen und immunhistochemischen Analysen des GIT Auges, die trotz fortgeschrittenen Alters des Hundes von 10,5 Jahren nur eine relativ milde Degeneration der Retina-Struktur nachwiesen.

Die Western-Blot Ergebnisse der ADAM9-Protein-Expression zeigten, dass in der Retina des erkrankten GITs das ADAM9-spezifische Bandensignal (~84 kDa) im Vergleich zum gesunden Hund und Menschen fehlt. Dies lässt vermuten, dass ADAM9 beim erkrankten GIT zumindest in trunkierter Form vorliegt oder sogar bereits dessen mRNA durch *Nonsense-mediated mRNA decay* (NMD) eliminiert wurde und deshalb nicht mehr nachzuweisen war. NMD ist ein wichtiger Qualitätskontrollmechanismus, der Transkripte mit vor-

zeitiger Translationstermination durch Endonukleasen abbaut und so die Akkumulation trunkierter Proteine verhindert (Maquat 2005). Allerdings existiert beim Mensch noch eine zweite C-terminal-trunkierte, sezernierte Isoform des ADAM9-Proteins ohne Transmembran- und cytoplasmatische Domäne, jedoch mit funktionell aktiver Metalloprotease und α -Sekretase-ähnlicher Aktivität (Hotoda et al. 2002). Es ist nicht auszuschließen, dass diese Isoform beim erkrankten GIT vorhanden ist und möglicherweise nicht mit dem verwendeten Anti-ADAM9-AK erfasst wird, da dieser den Teil des Proteins nachweist, der bei vorgenannter Isoform fehlt.

Obwohl die Expression der Ladekontrolle PDE6B, ein Stäbchenrezeptor-spezifisches Protein, den Nachweis liefert, dass auch beim erkrankten GIT Protein geladen war, ist anzumerken, dass die fehlende ADAM9-Expression beim erkrankten GIT ebenfalls darauf zurückzuführen sein könnte, dass sie außerhalb der Nachweisgrenze lag. Dies würde auch das fehlende Signal einer Nebenbande (~32 kDa) bei der GIT-Retina erklären. Möglicherweise entsprach die geladene Proteinmenge nicht den vermeintlich eingesetzten 40 μ g und reichte somit nicht aus, diese Nebenbande sowie ggf. auch die ADAM9-spezifische Bande nachzuweisen. Schwankungen in der Protein-Nachweisgrenze könnten auf die unterschiedliche Menge an nicht-degradiertem Protein als Folge der variierenden Fixierungs- und Lagerungsbedingungen der retinalen Gewebeproben zurückzuführen sein.

3.4.1.4. Phänotypische Variabilität der gPRA bei Irish Glen of Imaal Terriern

Die *ADAM9*-Deletion wurde in erster Linie in gPRA-Trägern und erkrankten GITs identifiziert. Allerdings wurde sie auch in 25 von 170 untersuchten GITs im homozygoten Zustand nachgewiesen, bei denen der gPRA-Phänotyp durch eine Augenuntersuchung bisher noch nicht bestätigt wurde. Eine Fehltypisierung dieser Hunde konnte anhand der Allelverteilung innerhalb der Stammbäume ausgeschlossen werden. Nach Rücksprache mit den Hundehaltern waren sieben dieser Hunde inzwischen verstorben und vier zeigten klinische Symptome im Alter von sechs bis neun Jahren. Die frühesten Symptome in der untersuchten GIT-Population wurden bei einem etwa zwei Jahre alten Hund beobachtet, was bedeutet, dass die gPRA in dieser Rasse einen sehr variablen Krankheitsbeginn zwischen zwei und neuneinhalb Jahren aufweist. Eine mögliche Erklärung für diese phänotypische Variabilität impliziert funktionelle Kompensation und/oder bisher noch nicht-untersuchte Modifier-Gene, die Krankheitsbeginn, Progressionsrate oder Schweregrad einer Erkrankung beeinflussen können (Haider et al. 2002). Solche Modifier-Gene könnten andere Mitglieder der ADAM-Familie (Weskamp et al. 2002) oder andere zusätzliche funktionskompensierende Proteine sein (Khanna et al. 2009). In diesem Zusammenhang ist es erwähnenswert, dass die Entwicklung von *ADAM9*-Knock-out-Mäusen normal verläuft, diese lebensfähig und fertil sind und nur einen milden, sehr späten retinalen Krankheitsphänotyp zeigen (Parry et al. 2009,

Weskamp et al. 2002). Eine weitere Erklärung für den variablen Krankheitsbeginn wäre eine unvollständige Penetranz der gPRA bei GITs, wie beispielsweise bei der rezessiv vererbten Mukoviszidose (Thauvin-Robinet et al. 2009) oder dem persistierenden Ductus arteriosus, einer kongenitalen Herzerkrankung beim Menschen (Mani et al. 2002).

Noch zu klären sind die Mechanismen, die zum Funktionserhalt der Photorezeptoren bei GITs mit deletiertem ADAM9 im homozygoten Zustand und fortgeschrittenen Alter beitragen. Abgesehen davon wurde ein diagnostischer Test etabliert, der eindeutig zwischen GITs mit hohem Risiko, gPRA-Symptome zu entwickeln (Deletion im homozygoten Zustand) und solchen ohne gPRA-Risiko (heterozygot und homozygot Wildtyp) unterscheidet. Dieser Test kann zwar nicht den Zeitpunkt des Krankheitsbeginns vorhersagen, ist aber für die Zucht hilfreich, da aufgrund des bekannten Genotyps auch Träger in der Zucht bleiben können, ohne in der Folgegeneration weitere gPRA-Fälle befürchten zu müssen. Hunde, welche die Mutation im homozygoten Zustand tragen und folglich ein relativ hohes gPRA-Risiko besitzen, können aufgrund des variablen Krankheitsbeginns erst im hohen Alter klinische Symptome entwickeln. Da der Anteil an GITs, die in einem frühen Alter aufgrund anderer Erkrankungen (z.B. Krebs) sterben, in der untersuchten Population relativ groß ist, kann es sein, dass diese Hunde zu Lebzeiten klinisch unauffällig bleiben.

3.4.2. Genomweite SNP-*microarray* Analyse bei weiteren Hunderassen

Für die drei Rassen AT, Lö und Sa wurden mittels SNP-*microarray* basierter Homozygotie-Kartierungen zwar homozygote Kandidatenregionen identifiziert, allerdings konnte für keine Region eine eindeutige Kopplung mit der gPRA anhand untersuchter Feinkartierungsmarker nachgewiesen werden. Die RetNet-Datenbank Recherche nach Kandidatengen mit beschriebenen humanen RP-Mutationen innerhalb der homozygoten Regionen war nur für Lö auf CFA29 erfolgreich. Jedoch wurde in diesem Gen (*PXMP3*) keine Mutation identifiziert, sodass es als gPRA-Ursache bei Lö ausgeschlossen wurde.

In den beiden chromosomalen Regionen CFA3 und CFA21, die für ATs keinen eindeutigen Ausschluss lieferten, wurden verschiedene Retina-exprimierende Kandidatengene untersucht. Die Gene der Region auf CFA21 wurden ebenso bei Lö analysiert, da auch für diese Rasse dort Homozygotie nachgewiesen worden war. Keine der insgesamt 33 in den Kandidatengen *PPIP5K2*, *PLEKHB1* und *ARHGEF17* identifizierten Sequenzvariationen zeigte eine Kosegregation mit dem gPRA-Status bei ATs oder Lö. Da aber im *PPIP5K2*-Gen einige Polymorphismen beim erkrankten AT im heterozygoten Zustand gefunden wurden, konnte dieses Gen und damit auch die gesamte 0,2 Mb große Kandidatenregion auf CFA3 mit hoher Wahrscheinlichkeit als gPRA-Lokus für ATs ausgeschlossen werden. Für Lö lieferten die untersuchten Gene *PLEKHB1* und *ARHGEF17* noch keinen Ausschluss der Region auf

CFA21, da keine der Sequenzvariationen beim erkrankten Lö im heterozygoten Zustand identifiziert wurden. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass bei diesen Genen die kausale Mutation in Promotor- oder anderen regulatorischen Bereichen dieser Gene zu finden ist. Da diese Bereiche jedoch beim Hund meist noch nicht bekannt sind, wurde die Mutationsanalyse lediglich auf die kodierenden Bereiche beschränkt.

Für ATs wurde beim erkrankten AT in Exon 1 des Kandidatengens *ARHGEF17* eine Expansion eines CAG-Repeats um zwei CAG-Einheiten im homozygoten Zustand identifiziert. CAG-Trinukleotidrepeats kodieren für Polyglutamin (polyQ-Trakt) und sind instabile, meist intragenische Mikrosatellitenrepeats, die in expandierter Form beim Menschen zu neurodegenerativen Erkrankungen führen können, wie Chorea Huntington oder Spinozerebelläre Ataxien (Butland et al. 2007). Aufgrund der großen Variabilität des CAG-Trinukleotidrepeats im *ARHGEF17*-Gen (9 - 13 CAG-Einheiten) auch in anderen Hunderassen ist allerdings anzunehmen, dass dieser Repeat keine funktionelle Bedeutung für ATs hat. Zudem wurde sowohl dieser CAG-Repeat als auch der Polymorphismus c.2189A>T in Exon 1 bei weiteren untersuchten erkrankten ATs im heterozygoten Zustand identifiziert, wodurch dieses Gen als gPRA-Ursache in dieser Rasse mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden konnte. Damit wurde die Kandidatenregion auf 0,7 Mb eingegrenzt, sodass für künftige Analysen nur noch neun potentielle Kandidatengene ausstehen.

Letztendlich waren die SNP-*microarray* basierten Homozygotie-Kartierungen somit nur bei einer von vier Rassen (25 %) erfolgreich und konnten über weiterführende Feinkartierungsanalysen zur Identifizierung der gPRA-ursächlichen Mutation führen. Möglicherweise ist die geringe Erfolgsrate bei ATs und Lö auf eine Überbewertung des Inzuchtkoeffizienten bei diesen Rassen im Vergleich zu GITs zurückzuführen, bei denen aufgrund des Gründereffekts und der geringen Anzahl registrierter Welpen pro Jahr (weniger als 100) ein sehr begrenzter Gen-*Pool* angenommen wird (Lindblad-Toh et al. 2005). Die Homozygotie-Kartierung ist eine effektive Methode für Kartierungen seltener, rezessiv vererbter Erkrankungen in konsanguinen Populationen (Lander und Botstein 1987), dessen Effizienz u.a. mit dem Markerabstand korreliert (Genin et al. 1998). Ist der Verwandtschaftsgrad der untersuchten Population aber geringer als angenommen und die SNP-Marker-Dichte des verwendeten 50K SNP-*microarrays* möglicherweise zu gering, ist auch die Aussagekraft der Homozygotie-Kartierung nicht ausreichend, um die Krankheitsregion erfolgreich zu kartieren. Da durch Erhöhung der Markeranzahl die Effizienz der Homozygotie-Kartierung beeinflusst werden kann (Genin et al. 1998), könnte durch die Verwendung eines *microarrays* mit höherer Markerdichte auch für ATs und Lö die gPRA-Region erfolgreich kartiert werden.

Für die Rasse der Sa ist die erfolglose Homozygotie-Kartierung nicht auf die Annahme eines unzureichenden Inzuchtkoeffizienten zurückzuführen, da im Gegenteil viele der untersuchten

Feinkartierungsmarker für alle Sa monomorph waren. Dies wurde auch bei dem zuvor durchgeführten genomweiten Mikrosatelliten-*Screening* für diese Rasse beobachtet (Lippmann 2006b), was bestätigt, dass Sa relativ eng gezüchtet wurden und durch den Gründereffekt (Verpaarung 1921 von Wolf und Deutschem Schäferhund) nur über einen kleinen Genpool verfügen und daher nur eine geringe genetische Variabilität aufweisen.

3.4.3. Ausblick

Da in den bisher untersuchten Kandidatengenomen der Region auf CFA21 für ATs die kausale gPRA-Mutation nicht identifiziert werden konnte, werden derzeit innerhalb dieser Region weitere Sequenzanalysen der noch ausstehenden neun Kandidatengene durchgeführt. Auch für Sa und Lö werden parallel Retina-spezifisch exprimierte Gene einzelner Kandidatenregionen untersucht, um ebenfalls in diesen Rassen die gPRA-ursächliche Mutation zu finden.

Eine alternative Möglichkeit, die gPRA-Mutation bei AT, Lö und Sa zu identifizieren, wäre die in Retinadegenerations-Erkrankungen involvierten Gene und Signalwege durch Gesamt-Exom-Sequenziermethoden (*whole-exome sequencing*; Choi et al. 2009) zu untersuchen. Dazu werden alle Exome Retina-spezifischer Gene aus der zu untersuchenden DNA-Probe eines erkrankten Hundes mittels *microarray*-basierter *exome capture* Methode separiert und durch Sequenzanalyse auf gPRA-ursächliche Mutationen überprüft. Nachteilig ist allerdings, dass dabei nur bekannte Retina-spezifische Gene berücksichtigt und Gene mit noch unbekannter Funktion, wie z.B. das für die gPRA bei Schapendoes ursächliche Gen *CCDC66* (Dekomien et al. 2009), nicht erfasst werden.

Zusammenfassung

Heutzutage existieren weltweit mehr als 400 Hunderassen, die jede für sich eine in sich geschlossene, mehr oder weniger stark ingezüchtete Population mit limitierter Populationsgröße darstellt. Durch intensive Selektion hinsichtlich bestimmter, meist morphologischer Rassemerkmale sowie aufgrund schwerwiegender Flaschenhalseffekte wurde die effektive Größe der Zuchtpopulation auf nur wenige Gründertiere reduziert. Nachfolgende selektive Zuchtbestrebungen haben so beim Hund allgemein zu einer Spezies mit enormer phänotypischer Variabilität geführt, zumeist aber mit genetischen Einbußen.

Um die genetischen Beziehungen von deutschen Weimaraner Jagdhunden im Vergleich zu anderen Rassen zu untersuchen, wurden paternal vererbte Y-chromosomale Marker und maternal vererbte mitochondriale (mt)DNA-Sequenzen in 27 Hunderassen und vier Wölfen analysiert. Insgesamt wurden neun polymorphe Marker des Y-Chromosoms und ein Teil des caninen mt Genoms (1.947 bp, Basenpaare) in 115 männlichen Individuen untersucht, die 20 Y-chromosomale und 59 mtDNA-Haplotypen zeigten. In 34 Weimaranern wurden vier verschiedene Y-chromosomale und drei mtDNA-Haplotypen beobachtet, die mindestens vier männlichen bzw. drei weiblichen Vorfahren der derzeitigen Population in Deutschland entsprechen. In diesem Zusammenhang konnten einzelne Einträge in den Weimaraner Zuchtbüchern weder anhand der paternalen Y-chromosomalen noch der maternalen mitochondrialen Vererbungsmuster bestätigt werden. Die untersuchten Rassen repräsentieren 9 von 10 durch die *Fédération Cynologique Internationale* (FCI) definierte Gruppen. Die Vielfalt an Y-chromosomalen und besonders an mtDNA-Haplotypen war immens, gemessen an der relativ kleinen Anzahl an untersuchten Individuen pro Rasse. Einzigartige Haplotypen wurden nur in wenigen Rassen und beim Wolf gefunden. Andere Haplotypen dagegen wurden in diversen Rassen, auch in verschiedenen FCI-Gruppen, identifiziert. Dies lässt vermuten, dass diese Hunderassen gemeinsame männliche und weibliche Vorfahren besitzen.

Die Folge enggezüchteter Hunderassen ist die allgemeine Verbreitung von Erbkrankheiten, wie z.B. die generalisierte progressive Retina Atrophie (gPRA). Die gPRA gehört zu einer Gruppe vererbter retinaler Erkrankungen, die mit dem allmählichen Verlust des Sehvermögens in verschiedenen Hunderassen assoziiert ist. Um die molekulargenetische Ursache für autosomal rezessiv (ar) vererbte gPRA in Airedale Terriern (AT), Irish Glen of Imaal Terriern (GIT), Löwchen (Lö), Coton de Tuléar (CdT) und Saarloos Wolfhunden (Sa) zu finden, wurde zunächst eine Kopplungsanalyse 15 ausgewählter Kandidatengene (*CDH23*, *CHX10*, *CNGB3*, *LRAT*, *PCDH21*, *PROM1*, *PRPF8*, *RGR*, *RLBP1*, *RP1*, *RPGRIP1*, *SFRP2*, *TTPA*, *TULP1* und *USH2A*) durchgeführt. Keiner der 26 untersuchten Mikrosatellitenmarker zeigte anhand von Stammbaum- und LOD-Score Analysen eine Kopplung mit der gPRA in den untersuchten Rassen. Deshalb wurde für die ersten drei Rassen die Suche auf das

gesamte Hundegenom ausgeweitet. Insgesamt wurden 544 Mikrosatellitenmarker (311 Marker des MSS-2 und 233 Ergänzungsmarker) analysiert. Auf diese Weise sollten große Markerabstände des bestehenden MSS-2 reduziert, Retina-spezifisch exprimierte Genregionen abgedeckt und damit die Erfolgsrate der genomweiten Kopplungsanalyse erhöht werden. Dennoch konnte für keine der Rassen ein Marker identifiziert werden, der mit der genomischen gPRA-Region segregierte.

Um die Erfolgsaussichten der Suche nach der gPRA-Region zu steigern, wurden für AT, GIT, Lö und Sa genomweite Kartierungsanalysen mittels *SNP-microarrays* durchgeführt, die ein Marker-Set mit noch besserer Genomabdeckung als das erweiterte MSS-2 garantierten. Durch Homozygotie-Kartierungen anhand genomweiter SNP-Genotypen wurden Kandidatenregionen identifiziert und durch zusätzliche Mikrosatellitenmarker feinkartiert. So konnte für GITs die gPRA-Region auf Chromosom 16 lokalisiert werden. Diese Region zeigt Syntenie zum menschlichen Chromosom 8, welche das Gen *a disintegrin and metalloprotease domain 9 (ADAM9)* beinhaltet. *ADAM9* ist ein gutes Kandidatengen für canine gPRA, da in diesem Gen Mutationen beschrieben sind, welche die ar vererbte *cone-rod dystrophy (CRD)* verursachen, eine die Photorezeptorfunktion beeinträchtigende retinale Erkrankung beim Menschen. Für die übrigen drei Rassen (AT, Lö und Sa) wurde innerhalb der homozygoten Kandidatenregionen kein gPRA-gekoppelter Feinkartierungsmarker anhand einer entsprechenden LOD-Score Analyse identifiziert. Dennoch wurden in einigen chromosomalen Regionen ausgewählte Retina-exprimierende Kandidatengene mittels Sequenzanalyse untersucht, wodurch aber die ursächliche Mutation der gPRA in diesen Rassen bisher noch nicht gefunden wurde. Detaillierte Sequenzanalysen von *ADAM9* identifizierten in erkrankten und Träger-GITs eine Deletion der Exons 15 und 16, die zur Leserasterverschiebung und zum vorzeitigen Stopp-Codon führte. Diese Mutation wurde in keiner weiteren der 34 anderen untersuchten Hunderassen mit gPRA gefunden. Bei GITs wurde ein variabler und teilweise sehr später Beginn der gPRA infolge einer relativ milden Form von retinaler Degeneration trotz fortgeschrittenen Alters festgestellt. Mit der Identifizierung der kausalen Mutation für gPRA beim GIT ist diese Rasse ein Modellorganismus für die CRD beim Menschen und insbesondere für funktionelle Analysen der kürzlich beschriebenen Mutationen im humanen *ADAM9*-Gen.

Summary

Today, more than 400 dog breeds exist which are closed or partly inbred populations of limited population size. Intense selection mechanisms concerning specific traits as well as severe population bottlenecks have reduced the effective breeding population to only a small number of founder dogs. Subsequent selective breeding lead to a species with an immense phenotypic diversity but often associated with reduced genetic variability.

In order to investigate genetic relations of German Weimaraner hunting dogs as compared to other dog breeds paternally inherited Y chromosomal markers and maternally inherited mitochondrial (mt)DNA sequences were analysed in 27 dog breeds. Altogether, nine potentially polymorphic markers of the Y chromosome were examined as well as parts of the canine mt genome (1947 base pairs) in 111 male dogs and four wolves for comparison. Twenty Y chromosomal and 59 mtDNA haplotypes were identified in the canine breeds and wolves. In 34 Weimaraners, four distinct Y chromosomal haplotypes were observed as well as three mtDNA types thus reflecting at least four male and three female ancestors for the current population in Germany. Tracing patri- and matrilineages, several entries in the Weimaraner stud book cannot be reconciled with the male-only, Y chromosomal neither the female-only, mitochondrial inheritance patterns, respectively. The investigated breeds represent 9 out of 10 groups defined by the *Fédération Cynologique Internationale* (FCI). The level of Y chromosomal and especially mtDNA diversity was immense considering the relatively small number of individuals investigated per breed. Unique haplotypes were found only in a few breeds and the wolf. Other haplotypes were shared among several breeds, also across different FCI groups, suggesting that these canine breeds had common male and female ancestors.

As consequence of the breeding strategies, many inherited diseases such as generalized progressive retinal atrophy (gPRA) are present in most of dog breeds. gPRA belongs to a group of inherited retinal diseases which are associated with gradual vision loss in various dog breeds. In order to investigate the molecular genetic cause of autosomal recessively (ar) inherited gPRA in Airedale Terrier (AT), Irish Glen of Imaal Terriers (GIT), Löwchen (Lö), Coton de Tuléar (CdT) and Saarloos Wolfhounds (Sa) linkage analyses of 15 selected candidate genes (*CDH23*, *CHX10*, *CNGB3*, *LRAT*, *PCDH21*, *PROM1*, *PRPF8*, *RGR*, *RLBP1*, *RP1*, *RPGRIP1*, *SFRP2*, *TTPA*, *TULP1* and *USH2A*) have been performed. None of 26 investigated microsatellite markers indicated linkage with gPRA by pedigree and LOD score analyses in one of the studied breeds. Therefore, the screening was expanded to the entire canine genome for the first three dog breeds. In total, 544 microsatellite markers (311 MSS-2 markers and 233 additional markers) have been analysed. Thus, wide marker-distances in the existing MSS-2 should be reduced and retina specifically expressed gene regions should be covered. This should consequently increase the success rate of genome-

wide linkage analyses. Nonetheless, no marker was identified to segregate with gPRA locus for any dog breed.

In order to increase the success for gPRA-screening genome-wide mapping analyses via SNP microarrays have been performed for AT, GIT, Lö and Sa which reveal a marker set with better coverage of the canine genome than the extended MSS-2. By homozygosity mapping using genome-wide SNP genotypes homozygous candidate regions have been identified which were fine mapped with additional microsatellite markers. For GITs, gPRA candidate region was assigned to canine chromosome 16. The respective region is syntenic with human chromosome 8 comprising the gene a disintegrin and metalloprotease domain 9 (*ADAM9*). *ADAM9* represents a strong candidate gene for canine retinal disease because mutations have previously been shown to cause an inherited human cone-rod dystrophy (CRD), a retinal disorder affecting photoreceptor function. For the remaining three breeds (AT, Lö and Sa) no gPRA linked fine mapping marker was identified with an appropriate LOD score in a homozygous candidate region. Yet, diverse retina specifically expressed candidate genes in several chromosomal regions were selected and investigated by sequence analyses, but the causative mutation for gPRA in these breeds was not identified yet. Sequence analyses of *ADAM9* in affected and carrier GITs revealed a deletion of exons 15 and 16 which alters the reading frame leading to a premature stop codon. This mutation was absent in 34 other dog breeds. A variable and, at times, very late onset of gPRA was confirmed in GITs by a relatively mild retinal degeneration at advanced age. Hence, the identification of the genetic defect underlying gPRA in the GIT represents a suitable model for CRD in man, with superior potential to elucidate functional consequences of the recently described null mutations in the human *ADAM9* gene.

Literaturverzeichnis

- Acland GM, Aguirre GD. Retinal degenerations in the dog: IV. Early retinal degeneration (erd) in Norwegian elkhounds. *Exp Eye Res* 44(4):491-521, **1987**.
- Acland GM, Blanton SH, Hershfield B, Aguirre GD. XLPRA: a canine retinal degeneration inherited as an X-linked trait. *Am J Med Genet* 52(1):27-33, **1994**.
- Acland GM, Ray K, Mellersh CS, Gu W, Langston AA, Rine J, Ostrander EA, Aguirre GD. Linkage analysis and comparative mapping of canine progressive rod-cone degeneration (prcd) establishes potential locus homology with retinitis pigmentosa (RP17) in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(6):3048-3053, **1998**.
- Acland GM, Ray K, Mellersh CS, Langston AA, Rine J, Ostrander EA, Aguirre GD. A novel retinal degeneration locus identified by linkage and comparative mapping of canine early retinal degeneration. *Genomics* 59(2):134-142, **1999**.
- Acland GM, Aguirre GD, Ray J, Zhang Q, Aleman TS, Cideciyan AV, Pearce-Kelling SE, Anand V, Zeng Y, Maguire AM et al. Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness. *Nat Genet* 28(1):92-95, **2001**.
- Aguirre-Hernandez J, Sargan DR. Evaluation of candidate genes in the absence of positional information: a poor bet on a blind dog! *J Hered* 96(5):475-484, **2005**.
- Aguirre GD. Retinal degenerations in the dog. I. Rod dysplasia. *Exp Eye Res* 26(3):233-253, **1978**.
- Aguirre GD, Alligood J, O'Brien P, Buyukmihci N. Pathogenesis of progressive rod-cone degeneration in miniature poodles. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 23(5):610-630, **1982**.
- Aguirre GD, Acland GM. Variation in retinal degeneration phenotype inherited at the prcd locus. *Exp Eye Res* 46(5):663-687, **1988**.
- Akey JM, Ruhe AL, Akey DT, Wong AK, Connelly CF, Madeoy J, Nicholas TJ, Neff MW. Tracking footprints of artificial selection in the dog genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(3):1160-1165, **2010**.
- Albanese V, Biguet NF, Kiefer H, Bayard E, Mallet J, Meloni R. Quantitative effects on gene silencing by allelic variation at a tetranucleotide microsatellite. *Hum Mol Genet* 10(17):1785-1792, **2001**.
- Awano T, Johnson GS, Wade CM, Katz ML, Johnson GC, Taylor JF, Perloski M, Biagi T, Baranowska I, Long S et al. Genome-wide association analysis reveals a SOD1 mutation in canine degenerative myelopathy that resembles amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(8):2794-2799, **2009**.
- Bannasch DL, Bannasch MJ, Ryun JR, Famula TR, Pedersen NC. Y chromosome haplotype analysis in purebred dogs. *Mamm Genome* 16(4):273-280, **2005**.
- Bannasch DL, Young A, Myers J, Truve K, Dickinson P, Gregg J, Davis R, Bongcam-Rudloff E, Webster MT, Lindblad-Toh K et al. Localization of canine brachycephaly using an across breed mapping approach. *PLoS One* 5(3):e9632, **2010**.
- Bolz H. [Genetics of retinal dystrophies--an overview]. *Ophthalmologie* 102(7):661-673, **2005**.

- Boyko AR, Boyko RH, Boyko CM, Parker HG, Castelhana M, Corey L, Degenhardt JD, Auton A, Hedimbi M, Kityo R et al. Complex population structure in African village dogs and its implications for inferring dog domestication history. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(33):13903-13908, **2009**.
- Breen M, Langford CF, Carter NP, Holmes NG, Dickens HF, Thomas R, Suter N, Ryder EJ, Pope M, Binns MM. FISH mapping and identification of canine chromosomes. *J Hered* 90(1):27-30, **1999**.
- Breen M, Hitte C, Lorentzen TD, Thomas R, Cadieu E, Sabacan L, Scott A, Evanno G, Parker HG, Kirkness EF et al. An integrated 4249 marker FISH/RH map of the canine genome. *BMC Genomics* 5(1):65, **2004**.
- Brocker CN, Vasiliou V, Nebert DW. Evolutionary divergence and functions of the ADAM and ADAMTS gene families. *Hum Genomics* 4(1):43-55, **2009**.
- Bruford MW, Bradley DG, Luikart G. DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. *Nat Rev Genet* 4(11):900-910, **2003**.
- Butland SL, Devon RS, Huang Y, Mead CL, Meynert AM, Neal SJ, Lee SS, Wilkinson A, Yang GS, Yuen MM et al. CAG-encoded polyglutamine length polymorphism in the human genome. *BMC Genomics* 8:126, **2007**.
- Cadieu E, Neff MW, Quignon P, Walsh K, Chase K, Parker HG, Vonholdt BM, Rhue A, Boyko A, Byers A et al. Coat variation in the domestic dog is governed by variants in three genes. *Science* 326(5949):150-153, **2009**.
- Castelloe J, Templeton AR. Root probabilities for intraspecific gene trees under neutral coalescent theory. *Mol Phylogenet Evol* 3(2):102-113, **1994**.
- Chen WK, Swartz JD, Rush LJ, Alvarez CE. Mapping DNA structural variation in dogs. *Genome Res* 19(3):500-509, **2009**.
- Choi M, Scholl UI, Ji W, Liu T, Tikhonova IR, Zumbo P, Nayir A, Bakkaloglu A, Ozen S, Sanjad S et al. Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(45):19096-19101, **2009**.
- Clarke LA, Rebelo CS, Goncalves J, Boavida MG, Jordan P. PCR amplification introduces errors into mononucleotide and dinucleotide repeat sequences. *Mol Pathol* 54(5):351-353, **2001**.
- Clement M, Posada D, Crandall KA. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol Ecol* 9(10):1657-1659, **2000**.
- Clements PJ, Gregory CY, Petersen-Jones SM, Sargan DR, Bhattacharya SS. Confirmation of the rod cGMP phosphodiesterase beta subunit (PDE beta) nonsense mutation in affected rcd-1 Irish setters in the UK and development of a diagnostic test. *Curr Eye Res* 12(9):861-866, **1993**.
- Clements PJ, Sargan DR, Gould DJ, Petersen-Jones SM. Recent advances in understanding the spectrum of canine generalised progressive retinal atrophy. *J Small Anim Pract* 37(4):155-162, **1996**.
- Cruz F, Vila C, Webster MT. The legacy of domestication: accumulation of deleterious mutations in the dog genome. *Mol Biol Evol* 25(11):2331-2336, **2008**.

- Dakin EE, Avise JC. Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity* 93(5):504-509, **2004**.
- Dekomien G, Epplen JT. Exclusion of the PDE6A gene for generalised progressive retinal atrophy in 11 breeds of dog. *Anim Genet* 31(2):135-139, **2000**.
- Dekomien G, Runte M, Godde R, Epplen JT. Generalized progressive retinal atrophy of Sloughi dogs is due to an 8-bp insertion in exon 21 of the PDE6B gene. *Cytogenet Cell Genet* 90(3-4):261-267, **2000**.
- Dekomien G, Epplen JT. The canine Recoverin (RCV1) gene: a candidate gene for generalized progressive retinal atrophy. *Mol Vis* 8436-441, **2002**.
- Dekomien G, Vollrath C, Petrasch-Parwez E, Boeve MH, Akkad DA, Gerding WM, Epplen JT. Progressive retinal atrophy in Schapendoes dogs: mutation of the newly identified CCDC66 gene. *Neurogenetics* 11(2):163-174, **2009**.
- Deuss M, Reiss K, Hartmann D. Part-time alpha-secretases: the functional biology of ADAM 9, 10 and 17. *Curr Alzheimer Res* 5(2):187-201, **2008**.
- Dietrich WF, Miller J, Steen R, Merchant MA, Damron-Boles D, Husain Z, Dredge R, Daly MJ, Ingalls KA, O'Connor TJ. A comprehensive genetic map of the mouse genome. *Nature* 380(6570):149-152, **1996**.
- Drögemüller C, Karlsson EK, Hytonen MK, Perloski M, Dolf G, Sainio K, Lohi H, Lindblad-Toh K, Leeb T. A mutation in hairless dogs implicates FOXI3 in ectodermal development. *Science* 321(5895):1462, **2008**.
- Drögemüller C, Becker D, Brunner A, Haase B, Kircher P, Seeliger F, Fehr M, Baumann U, Lindblad-Toh K, Leeb T. A missense mutation in the SERPINH1 gene in Dachshunds with osteogenesis imperfecta. *PLoS Genet* 5(7):e1000579, **2009**.
- Drögemüller C, Becker D, Kessler B, Kemter E, Tetens J, Jurina K, Jaderlund KH, Flagstad A, Perloski M, Lindblad-Toh K et al. A deletion in the N-myc downstream regulated gene 1 (NDRG1) gene in Greyhounds with polyneuropathy. *PLoS One* 5(6):e11258, **2010**.
- Evans DM, Cardon LR. Guidelines for genotyping in genomewide linkage studies: single-nucleotide-polymorphism maps versus microsatellite maps. *Am J Hum Genet* 75(4):687-692, **2004**.
- Fondon JW, 3rd, Garner HR. Molecular origins of rapid and continuous morphological evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(52):18058-18063, **2004**.
- Genin E, Todorov AA, Clerget-Darpoux F. Optimization of genome search strategies for homozygosity mapping: influence of marker spacing on power and threshold criteria for identification of candidate regions. *Ann Hum Genet* 62(Pt 5):419-429, **1998**.
- Goldstein O, Mezey JG, Boyko AR, Gao C, Wang W, Bustamante CD, Anguish LJ, Jordan JA, Pearce-Kelling SE, Aguirre GD et al. An ADAM9 mutation in canine cone-rod dystrophy 3 establishes homology with human cone-rod dystrophy 9. *Mol Vis* 161549-1569, **2010**.
- Guyon R, Lorentzen TD, Hitte C, Kim L, Cadieu E, Parker HG, Quignon P, Lowe JK, Renier C, Gelfenbeyn B et al. A 1-Mb resolution radiation hybrid map of the canine genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(9):5296-5301, **2003**.

- Haider NB, Ikeda A, Naggert JK, Nishina PM. Genetic modifiers of vision and hearing. *Hum Mol Genet* 11(10):1195-1206, **2002**.
- Hearne CM, Ghosh S, Todd JA. Microsatellites for linkage analysis of genetic traits. *Trends Genet* 8(8):288-294, **1992**.
- Hertil E, Bergstrom T, Kell U, Karlstam L, Ekman S, Ekesten B. Retinal degeneration in nine Swedish Jamthund dogs. *Vet Ophthalmol* 13(2):110-116, **2010**.
- Holmans P, Craddock N. Efficient strategies for genome scanning using maximum-likelihood affected-sib-pair analysis. *Am J Hum Genet* 60(3):657-666, **1997**.
- Hotoda N, Koike H, Sasagawa N, Ishiura S. A secreted form of human ADAM9 has an alpha-secretase activity for APP. *Biochem Biophys Res Commun* 293(2):800-805, **2002**.
- Housley DJ, Venta PJ. The long and the short of it: evidence that FGF5 is a major determinant of canine 'hair'-itability. *Anim Genet* 37(4):309-315, **2006**.
- Irion DN, Schaffer AL, Famula TR, Eggleston ML, Hughes SS, Pedersen NC. Analysis of genetic variation in 28 dog breed populations with 100 microsatellite markers. *J Hered* 94(1):81-87, **2003**.
- Jaeckel S, Epplen JT, Kauth M, Mitterski B, Tschentscher F, Epplen C. Polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism or how to detect reliably and efficiently each sequence variation in many samples and many genes. *Electrophoresis* 19(18):3055-3061, **1998**.
- Jagiello P, Gencik M, Arning L, Wiczorek S, Kunstmann E, Csernok E, Gross WL, Epplen JT. New genomic region for Wegener's granulomatosis as revealed by an extended association screen with 202 apoptosis-related genes. *Hum Genet* 114(5):468-477, **2004**.
- John S, Shephard N, Liu G, Zeggini E, Cao M, Chen W, Vasavda N, Mills T, Barton A, Hinks A et al. Whole-genome scan, in a complex disease, using 11,245 single-nucleotide polymorphisms: comparison with microsatellites. *Am J Hum Genet* 75(1):54-64, **2004**.
- Karlsson EK, Baranowska I, Wade CM, Salmon Hillbertz NH, Zody MC, Anderson N, Biagi TM, Patterson N, Pielberg GR, Kulbokas EJ, 3rd et al. Efficient mapping of mendelian traits in dogs through genome-wide association. *Nat Genet* 39(11):1321-1328, **2007**.
- Karlsson EK, Lindblad-Toh K. Leader of the pack: gene mapping in dogs and other model organisms. *Nat Rev Genet* 9(9):713-725, **2008**.
- Kennedy GC, Matsuzaki H, Dong S, Liu WM, Huang J, Liu G, Su X, Cao M, Chen W, Zhang J et al. Large-scale genotyping of complex DNA. *Nat Biotechnol* 21(10):1233-1237, **2003**.
- Khanna H, Davis EE, Murga-Zamalloa CA, Estrada-Cuzcano A, Lopez I, den Hollander AI, Zonneveld MN, Othman MI, Waseem N, Chakarova CF et al. A common allele in RPGRIP1L is a modifier of retinal degeneration in ciliopathies. *Nat Genet* 41(6):739-745, **2009**.

- Kijas JW, Cideciyan AV, Aleman TS, Pianta MJ, Pearce-Kelling SE, Miller BJ, Jacobson SG, Aguirre GD, Acland GM. Naturally occurring rhodopsin mutation in the dog causes retinal dysfunction and degeneration mimicking human dominant retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(9):6328-6333, **2002**.
- Kijas JW, Miller BJ, Pearce-Kelling SE, Aguirre GD, Acland GM. Canine models of ocular disease: outcross breedings define a dominant disorder present in the English mastiff and bull mastiff dog breeds. *J Hered* 94(1):27-30, **2003**.
- Kijas JW, Zangerl B, Miller B, Nelson J, Kirkness EF, Aguirre GD, Acland GM. Cloning of the canine ABCA4 gene and evaluation in canine cone-rod dystrophies and progressive retinal atrophies. *Mol Vis* 10223-232, **2004**.
- Kim KS, Lee SE, Jeong HW, Ha JH. The complete nucleotide sequence of the domestic dog (*Canis familiaris*) mitochondrial genome. *Mol Phylogenet Evol* 10(2):210-220, **1998**.
- Kingman JF. Origins of the coalescent. 1974-1982. *Genetics* 156(4):1461-1463, **2000**.
- Kirkness EF, Bafna V, Halpern AL, Levy S, Remington K, Rusch DB, Delcher AL, Pop M, Wang W, Fraser CM et al. The dog genome: survey sequencing and comparative analysis. *Science* 301(5641):1898-1903, **2003**.
- Kommonen B, Karhunen U. A late receptor dystrophy in the Labrador retriever. *Vision Res* 30(2):207-213, **1990**.
- Koskinen MT. Individual assignment using microsatellite DNA reveals unambiguous breed identification in the domestic dog. *Anim Genet* 34(4):297-301, **2003**.
- Kruglyak L. Prospects for whole-genome linkage disequilibrium mapping of common disease genes. *Nat Genet* 22(2):139-144, **1999**.
- Kukekova AV, Nelson J, Kuchtey RW, Lowe JK, Johnson JL, Ostrander EA, Aguirre GD, Acland GM. Linkage mapping of canine rod cone dysplasia type 2 (rcd2) to CFA7, the canine orthologue of human 1q32. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47(3):1210-1215, **2006**.
- Kukekova AV, Goldstein O, Johnson JL, Richardson MA, Pearce-Kelling SE, Swaroop A, Friedman JS, Aguirre GD, Acland GM. Canine RD3 mutation establishes rod-cone dysplasia type 2 (rcd2) as ortholog of human and murine rd3. *Mamm Genome* 20(2):109-123, **2009**.
- Lander ES, Botstein D. Homozygosity mapping: a way to map human recessive traits with the DNA of inbred children. *Science* 236(4808):1567-1570, **1987**.
- Leonard JA, Wayne RK, Wheeler J, Valadez R, Guillen S, Vila C. Ancient DNA evidence for Old World origin of New World dogs. *Science* 298(5598):1613-1616, **2002**.
- Lin CT, Gould DJ, Petersen-Jonest SM, Sargan DR. Canine inherited retinal degenerations: update on molecular genetic research and its clinical application. *J Small Anim Pract* 43(10):426-432, **2002**.
- Lindblad-Toh K, Wade CM, Mikkelsen TS, Karlsson EK, Jaffe DB, Kamal M, Clamp M, Chang JL, Kulbokas EJ, 3rd, Zody MC et al. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature* 438(7069):803-819, **2005**.

- Lippmann T, Pasternack SM, Kraczyk B, Dudek SE, Dekomien G. Indirect exclusion of four candidate genes for generalized progressive retinal atrophy in several breeds of dogs. *J Negat Results Biomed* 519, **2006a**.
- Lippmann T. Genetic analyses in canine breeds: residual genetic variability and autosomal recessively inherited generalized progressive retinal atrophy. Ruhr-Universität Bochum, Fakultät für Biologie und Biotechnologie, **2006b**.
- Lippmann T, Jonkisz A, Dobosz T, Petrasch-Parwez E, Epplen JT, Dekomien G. Haplotype-defined linkage region for gPRA in Schapendoes dogs. *Mol Vis* 13174-180, **2007**.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25(4):402-408, **2001**.
- Lowe JK, Kukekova AV, Kirkness EF, Langlois MC, Aguirre GD, Acland GM, Ostrander EA. Linkage mapping of the primary disease locus for collie eye anomaly. *Genomics* 82(1):86-95, **2003**.
- Magnusson H. Über Retinitis Pigmentosa und Konsanguinität beim Hund. *Archiv für vergleichende Ophthalmologie* 2147-163, **1911**.
- Mani A, Meraji SM, Houshyar R, Radhakrishnan J, Mani A, Ahangar M, Rezaie TM, Taghavinejad MA, Broumand B, Zhao H et al. Finding genetic contributions to sporadic disease: a recessive locus at 12q24 commonly contributes to patent ductus arteriosus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(23):15054-15059, **2002**.
- Maquat LE. Nonsense-mediated mRNA decay in mammals. *J Cell Sci* 118(Pt 9):1773-1776, **2005**.
- Markwell MA, Haas SM, Bieber LL, Tolbert NE. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem* 87(1):206-210, **1978**.
- Mellersh CS, Langston AA, Acland GM, Fleming MA, Ray K, Wiegand NA, Francisco LV, Gibbs M, Aguirre GD, Ostrander EA. A linkage map of the canine genome. *Genomics* 46(3):326-336, **1997**.
- Mellersh CS, Bournsnell ME, Pettitt L, Ryder EJ, Holmes NG, Grafham D, Forman OP, Sampson J, Barnett KC, Blanton S et al. Canine RPGRIP1 mutation establishes cone-rod dystrophy in miniature longhaired dachshunds as a homologue of human Leber congenital amaurosis. *Genomics* 88(3):293-301, **2006**.
- Meurs KM, Mauceli E, Lahmers S, Acland GM, White SN, Lindblad-Toh K. Genome-wide association identifies a deletion in the 3' untranslated region of striatin in a canine model of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Hum Genet* 128(3):315-324, **2010**.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16(3):1215, **1988**.
- Miterski B, Kruger R, Wintermeyer P, Epplen JT. PCR/SSCP detects reliably and efficiently DNA sequence variations in large scale screening projects. *Comb Chem High Throughput Screen* 3(3):211-218, **2000**.

- Namba K, Nishio M, Mori K, Miyamoto N, Tsurudome M, Ito M, Kawano M, Uchida A, Ito Y. Involvement of ADAM9 in multinucleated giant cell formation of blood monocytes. *Cell Immunol* 213(2):104-113, **2001**.
- Narfstrom K, Katz ML, Bragadottir R, Seeliger M, Boulanger A, Redmond TM, Caro L, Lai CM, Rakoczy PE. Functional and structural recovery of the retina after gene therapy in the RPE65 null mutation dog. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44(4):1663-1672, **2003**.
- Natanaelsson C, Oskarsson MC, Angleby H, Lundeberg J, Kirkness E, Savolainen P. Dog Y chromosomal DNA sequence: identification, sequencing and SNP discovery. *BMC Genet* 745, **2006**.
- Nicholas TJ, Cheng Z, Ventura M, Mealey K, Eichler EE, Akey JM. The genomic architecture of segmental duplications and associated copy number variants in dogs. *Genome Res* 19(3):491-499, **2009**.
- Okumura N, Ishiguro N, Nakano M, Matsui A, Sahara M. Intra- and interbreed genetic variations of mitochondrial DNA major non-coding regions in Japanese native dog breeds (*Canis familiaris*). *Anim Genet* 27(6):397-405, **1996**.
- Olivier M, Breen M, Binns MM, Lust G. Localization and characterization of nucleotide sequences from the canine Y chromosome. *Chromosome Res* 7(3):223-233, **1999**.
- Olsen S. *Origins of the Domestic Dog: The Fossil Record*. Tucson: University of Arizona Press, **1985**.
- OpitGen. [<http://www.optigen.com/>]. **2010**.
- Ostrander EA, Galibert F, Patterson DF. Canine genetics comes of age. *Trends Genet* 16(3):117-124, **2000**.
- Ostrander EA, Kruglyak L. Unleashing the canine genome. *Genome Res* 10(9):1271-1274, **2000**.
- Ostrander EA, Wayne RK. The canine genome. *Genome Res* 15(12):1706-1716, **2005**.
- Paez GL, Sellers KF, Band M, Acland GM, Zangerl B, Aguirre GD. Characterization of gene expression profiles of normal canine retina and brain using a retinal cDNA microarray. *Mol Vis* 12:1048-1056, **2006**.
- Pang JF, Kluetsch C, Zou XJ, Zhang AB, Luo LY, Angleby H, Ardalan A, Ekstrom C, Skollermo A, Lundeberg J et al. mtDNA data indicate a single origin for dogs south of Yangtze River, less than 16,300 years ago, from numerous wolves. *Mol Biol Evol* 26(12):2849-2864, **2009**.
- Parker HG, Kim LV, Sutter NB, Carlson S, Lorentzen TD, Malek TB, Johnson GS, DeFrance HB, Ostrander EA, Kruglyak L. Genetic structure of the purebred domestic dog. *Science* 304(5674):1160-1164, **2004**.
- Parker HG, Ostrander EA. Canine genomics and genetics: running with the pack. *PLoS Genet* 1(5):e58, **2005**.
- Parker HG, VonHoldt BM, Quignon P, Margulies EH, Shao S, Mosher DS, Spady TC, Elkhahloun A, Cargill M, Jones PG et al. An expressed *fgf4* retrogene is associated with breed-defining chondrodysplasia in domestic dogs. *Science* 325(5943):995-998, **2009**.

- Parra D, Mendez S, Canon J, Dunner S. Genetic differentiation in pointing dog breeds inferred from microsatellites and mitochondrial DNA sequence. *Anim Genet* 39(1):1-7, **2008**.
- Parry DA, Toomes C, Bida L, Danciger M, Towns KV, McKibbin M, Jacobson SG, Logan CV, Ali M, Bond J et al. Loss of the metalloprotease ADAM9 leads to cone-rod dystrophy in humans and retinal degeneration in mice. *Am J Hum Genet* 84(5):683-691, **2009**.
- Patterson DF. Companion animal medicine in the age of medical genetics. *J Vet Intern Med* 14(1):1-9, **2000**.
- Petersen-Jones SM. A review of research to elucidate the causes of the generalized progressive retinal atrophies. *Vet J* 155(1):5-18, **1998**.
- Petersen-Jones SM, Entz DD, Sargan DR. cGMP phosphodiesterase- α mutation causes progressive retinal atrophy in the Cardigan Welsh corgi dog. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40(8):1637-1644, **1999**.
- Petersen-Jones SM. Advances in the molecular understanding of canine retinal diseases. *J Small Anim Pract* 46(8):371-380, **2005**.
- Pilot M, Jedrzejewski W, Branicki W, Sidorovich VE, Jedrzejewska B, Stachura K, Funk SM. Ecological factors influence population genetic structure of European grey wolves. *Mol Ecol* 15(14):4533-4553, **2006**.
- Richman M, Mellersh CS, Andre C, Galibert F, Ostrander EA. Characterization of a minimal screening set of 172 microsatellite markers for genome-wide screens of the canine genome. *J Biochem Biophys Methods* 47(1-2):137-149, **2001**.
- Roghani M, Becherer JD, Moss ML, Atherton RE, Erdjument-Bromage H, Arribas J, Blackburn RK, Weskamp G, Tempst P, Blobel CP. Metalloprotease-disintegrin MDC9: intracellular maturation and catalytic activity. *J Biol Chem* 274(6):3531-3540, **1999**.
- Ropstad EO, Bjerkas E, Narfstrom K. Electroretinographic findings in the Standard Wire Haired Dachshund with inherited early onset cone-rod dystrophy. *Doc Ophthalmol* 114(1):27-36, **2007**.
- Salmon Hillbertz NH, Isaksson M, Karlsson EK, Hellmen E, Pielberg GR, Savolainen P, Wade CM, von Euler H, Gustafson U, Hedhammar A et al. Duplication of FGF3, FGF4, FGF19 and ORAOV1 causes hair ridge and predisposition to dermoid sinus in Ridgeback dogs. *Nat Genet* 39(11):1318-1320, **2007**.
- Sargan DR. IDID: inherited diseases in dogs: web-based information for canine inherited disease genetics. *Mamm Genome* 15(6):503-506, **2004**.
- Sargan DR, Aguirre-Hernandez J, Galibert F, Ostrander EA. An extended microsatellite set for linkage mapping in the domestic dog. *J Hered* 98(3):221-231, **2007**.
- Savolainen P, Zhang YP, Luo J, Lundeberg J, Leitner T. Genetic evidence for an East Asian origin of domestic dogs. *Science* 298(5598):1610-1613, **2002**.
- Schlondorff J, Blobel CP. Metalloprotease-disintegrins: modular proteins capable of promoting cell-cell interactions and triggering signals by protein-ectodomain shedding. *J Cell Sci* 112 (Pt 21):3603-3617, **1999**.

- Schmidt H. Der Jagdgebrauchshund: 1, 2, **1989**.
- Schrameyer T, Dekomien G, Pasternack SM, Reinartz BS, Santos EJ, Epplen JT. Long- and short-haired Weimaraner dogs represent two populations of one breed. *Electrophoresis* 26(9):1668-1672, **2005**.
- Seelow D, Schuelke M, Hildebrandt F, Nurnberg P. HomozygosityMapper--an interactive approach to homozygosity mapping. *Nucleic Acids Res* 37(Web Server issue):W593-599, **2009**.
- Shimozawa N, Tsukamoto T, Suzuki Y, Orii T, Shirayoshi Y, Mori T, Fujiki Y. A human gene responsible for Zellweger syndrome that affects peroxisome assembly. *Science* 255(5048):1132-1134, **1992**.
- Sidjanin DJ, Lowe JK, McElwee JL, Milne BS, Phippen TM, Sargan DR, Aguirre GD, Acland GM, Ostrander EA. Canine CNGB3 mutations establish cone degeneration as orthologous to the human achromatopsia locus ACHM3. *Hum Mol Genet* 11(16):1823-1833, **2002**.
- Silberstein M, Tzemach A, Dovgolevsky N, Fishelson M, Schuster A, Geiger D. Online system for faster multipoint linkage analysis via parallel execution on thousands of personal computers. *Am J Hum Genet* 78(6):922-935, **2006**.
- Spinardi L, Mazars R, Theillet C. Protocols for an improved detection of point mutations by SSCP. *Nucleic Acids Res* 19(14):4009, **1991**.
- Stankiewicz P, Lupski JR. Molecular-evolutionary mechanisms for genomic disorders. *Curr Opin Genet Dev* 12(3):312-319, **2002**.
- Starkey MP, Scase TJ, Mellersh CS, Murphy S. Dogs really are man's best friend--canine genomics has applications in veterinary and human medicine! *Brief Funct Genomic Proteomic* 4(2):112-128, **2005**.
- Streitberger K, Schweizer M, Kropatsch R, Dekomien G, Distl O, Fischer MS, Epplen JT, Hertwig ST. Rapid diversification within dog breeds as evidenced by microsatellite marker analyses. *Anim Genet*, eingereicht.
- Suber ML, Pittler SJ, Qin N, Wright GC, Holcombe V, Lee RH, Craft CM, Lolley RN, Baehr W, Hurwitz RL. Irish setter dogs affected with rod/cone dysplasia contain a nonsense mutation in the rod cGMP phosphodiesterase beta-subunit gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(9):3968-3972, **1993**.
- Sundqvist AK, Bjornerfeldt S, Leonard JA, Hailer F, Hedhammar A, Ellegren H, Vila C. Unequal contribution of sexes in the origin of dog breeds. *Genetics* 172(2):1121-1128, **2006**.
- Sutter NB, Ostrander EA. Dog star rising: the canine genetic system. *Nat Rev Genet* 5(12):900-910, **2004**.
- Takahasi S, Miyahara K, Ishikawa H, Ishiguro N, Suzuki M. Lineage classification of canine inheritable disorders using mitochondrial DNA haplotypes. *J Vet Med Sci* 64(3):255-259, **2002**.
- Templeton AR, Crandall KA, Sing CF. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics* 132(2):619-633, **1992**.

- Thauvin-Robinet C, Munck A, Huet F, Genin E, Bellis G, Gautier E, Audrezet MP, Ferec C, Lalau G, Georges MD et al. The very low penetrance of cystic fibrosis for the R117H mutation: a reappraisal for genetic counselling and newborn screening. *J Med Genet* 46(11):752-758, **2009**.
- Tsuda K, Kikkawa Y, Yonekawa H, Tanabe Y. Extensive interbreeding occurred among multiple matriarchal ancestors during the domestication of dogs: evidence from inter- and intraspecies polymorphisms in the D-loop region of mitochondrial DNA between dogs and wolves. *Genes Genet Syst* 72(4):229-238, **1997**.
- Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA et al. The sequence of the human genome. *Science* 291(5507):1304-1351, **2001**.
- Vila C, Savolainen P, Maldonado JE, Amorim IR, Rice JE, Honeycutt RL, Crandall KA, Lundeberg J, Wayne RK. Multiple and ancient origins of the domestic dog. *Science* 276(5319):1687-1689, **1997**.
- Vila C, Maldonado JE, Wayne RK. Phylogenetic relationships, evolution, and genetic diversity of the domestic dog. *J Hered* 90(1):71-77, **1999**.
- Vila C, Seddon J, Ellegren H. Genes of domestic mammals augmented by backcrossing with wild ancestors. *Trends Genet* 21(4):214-218, **2005**.
- Vilboux T, Chaudieu G, Jeannin P, Delattre D, Hedan B, Bourgain C, Queney G, Galibert F, Thomas A, Andre C. Progressive retinal atrophy in the Border Collie: a new XLPR. *BMC Vet Res* 410, **2008**.
- VonHoldt BM, Pollinger JP, Lohmueller KE, Han E, Parker HG, Quignon P, Degenhardt JD, Boyko AR, Earl DA, Auton A et al. Genome-wide SNP and haplotype analyses reveal a rich history underlying dog domestication. *Nature* 464(7290):898-902, **2010**.
- Wayne RK. Molecular evolution of the dog family. *Trends Genet* 9(6):218-224, **1993**.
- Weissenbach J, Gyapay G, Dib C, Vignal A, Morissette J, Millasseau P, Vaysseix G, Lathrop M. A second-generation linkage map of the human genome. *Nature* 359(6398):794-801, **1992**.
- Weskamp G, Kratzschmar J, Reid MS, Blobel CP. MDC9, a widely expressed cellular disintegrin containing cytoplasmic SH3 ligand domains. *J Cell Biol* 132(4):717-726, **1996**.
- Weskamp G, Cai H, Brodie TA, Higashiyama S, Manova K, Ludwig T, Blobel CP. Mice lacking the metalloprotease-disintegrin MDC9 (ADAM9) have no evident major abnormalities during development or adult life. *Mol Cell Biol* 22(5):1537-1544, **2002**.
- Wetton JH, Higgs JE, Spriggs AC, Roney CA, Tsang CS, Foster AP. Mitochondrial profiling of dog hairs. *Forensic Sci Int* 133(3):235-241, **2003**.
- Wiik AC, Wade C, Biagi T, Ropstad EO, Bjerkas E, Lindblad-Toh K, Lingaas F. A deletion in nephronophthisis 4 (NPHP4) is associated with recessive cone-rod dystrophy in standard wire-haired dachshund. *Genome Res* 18(9):1415-1421, **2008**.

- Wolf ED, Vainisi SJ, Santos-Anderson R. Rod-cone dysplasia in the collie. *J Am Vet Med Assoc* 173(10):1331-1333, **1978**.
- Woods CG, Cox J, Springell K, Hampshire DJ, Mohamed MD, McKibbin M, Stern R, Raymond FL, Sandford R, Malik Sharif S et al. Quantification of homozygosity in consanguineous individuals with autosomal recessive disease. *Am J Hum Genet* 78(5):889-896, **2006**.
- Zajc I, Sampson J. Utility of canine microsatellites in revealing the relationships of pure bred dogs. *J Hered* 90(1):104-107, **1999**.
- Zangerl B, Goldstein O, Philp AR, Lindauer SJ, Pearce-Kelling SE, Mullins RF, Graphodatsky AS, Ripoll D, Felix JS, Stone EM et al. Identical mutation in a novel retinal gene causes progressive rod-cone degeneration in dogs and retinitis pigmentosa in humans. *Genomics* 88(5):551-563, **2006**.
- Zeiss CJ, Ray K, Acland GM, Aguirre GD. Mapping of X-linked progressive retinal atrophy (XLPRA), the canine homolog of retinitis pigmentosa 3 (RP3). *Hum Mol Genet* 9(4):531-537, **2000**.
- Zhang Q, Acland GM, Parshall CJ, Haskell J, Ray K, Aguirre GD. Characterization of canine photoreceptor phosphodiesterase cDNA and identification of a sequence variant in dogs with photoreceptor dysplasia. *Gene* 215(2):231-239, **1998**.
- Zhang Q, Baldwin VJ, Acland GM, Parshall CJ, Haskell J, Aguirre GD, Ray K. Photoreceptor dysplasia (pd) in miniature schnauzer dogs: evaluation of candidate genes by molecular genetic analysis. *J Hered* 90(1):57-61, **1999**.
- Zhang Q, Acland GM, Wu WX, Johnson JL, Pearce-Kelling S, Tulloch B, Vervoort R, Wright AF, Aguirre GD. Different RPGR exon ORF15 mutations in Canids provide insights into photoreceptor cell degeneration. *Hum Mol Genet* 11(9):993-1003, **2002**.
- Zigrino P, Steiger J, Fox JW, Loffek S, Schild A, Nischt R, Mauch C. Role of ADAM-9 disintegrin-cysteine-rich domains in human keratinocyte migration. *J Biol Chem* 282(42):30785-30793, **2007**.

Anhang

Tabelle A1 Y-chromosomale SNP- und Mikrosatellitenmarker des Hunds.

Marker	Accession Nummer	Primersequenzen (5'→3')	Enzym	Größe [bp]
Ydog21	CE815383	TCAGAAGAGTAAGTAAGGTGCTGTATGTTA CTTTAGAGAATATGGGATACATGCATG	<i>DdeI</i>	257
Ydog28	CE849381	GCTCAAGAGTTTGTATCAGCCTTG CTAATTCAGGTAACCCAAATGGTTG	<i>Ava2</i>	251
Ydog20	AACN010686104 (324-951)	TCTCCTTTTACACATTTTCTCTCCATT GATACTGAAGAATCAAGGCTGAATGTTA	<i>BseNI</i>	163
YdogN	AACN010403471	TTTCTGAACAGCTAAATTAATTTCTTCTATATT GCCACAGTGATTACAGTTCTGGTT	<i>SsiI</i>	252
YdogG	AACN010496436	CTGCTGTGGAAATCCGGTTTT GGAGACTCTGGGATCAGCC	<i>BsmFI</i>	-
MS41B		ATATTCCTCTAATTTCCCTCT CTGCTCGACCTCTTCTCTG *	-	207
MS97		AGGGAAGTGGAGAATATGCAACAG AGTTTTGTGTGAGCCATCATTGTG	-	251
MS98		GTTAGTTTCTGCCAGGAAGGAC TCAGCTGAGCGGTTTAAAAGTT	-	134
18MS		GTTCAAGTAAAGAAATTAGCATTAAAGTGGTG ATTACAAATATACCCAAAAGAAAGAAATAG	-	349

* Primersequenz aus Olivier et al. (1999)

Tabelle A2 Primersequenzen zur Amplifikation der mitochondrialen DNA des Hunds.

Gene	Primersequenzen (5'→3')	Größe [bp]
<i>ATP synthase subunit 8</i>	TTCAAATCACTACTACCCAGAA GATGACTACTAGTATTGGAATTAGGG	510
<i>ATP synthase subunit 6</i>	CAAAGCATCCTTAGCACACTT TAGGGCTATTGAGTTATAGTG	444
<i>cytochrome b</i>	CTAGTATTCTCCATCCTAATCTTG GAATAGTTTAAAGAAGAATCTCAG	392
<i>D-Loop</i>	GCTCTTGCTCCACCATCAGC ATCGAGATGTCCCATTTGCG	458
	GGGCCATACTAACGTGGG AACTATATGTCCTGAAACCAT	384

* Primersequenzen aus Parra et al. (2008)

Tabelle A4 Mikrosatellitenmarker (n=233) zur Ergänzung des MSS-2-Sets für genomweite Kopplungsanalysen der Rassen Irish Glen of Imaal Terrier, Airedale Terrier und Löwchen mit PCR-Primersequenzen, PCR-Produktgrößen und Repeat-Typ.

Marker	CFA	Typ	F-und R-Primersequenzen (5'→3')	Größe[bp]
366E	01	tetra	TGTAATAGAGACCATATGACTCCCCA TCATAGCAGTTTTATTTTTAACACTCCG	281
448E	01	tetra	CCCTGCCTGTGGTCTTCCT GAAGACTAGAAGTATGAAATTGAGGCATAGT	222
009E	01	tetra	AAGGCTACAACCTTTTTCTTCCATGC CAGAAGTGTTTAACTGATTTTATGAGTAAG	213
425E	01	tetra	GGGAATGGCAGTATATAGAGAATGC ATACAGGTTTCATATTTACTACTGGAAGAT	225
367E	01	tetra	CTAGCAAGTTCCTTTCTGAATTAAC AAGTAGGCAGCCCAATGCAG	254
367E2	01	tetra	TACGCAGGGATGAATAAATGGC CGTAGCCCTGAAACATCCAAAC	214
367E3	01	di	GAATATTTTATACGAAGACCAGCATGG AAATATGAGAGTATACCACTCATAAAGAGGG	216
011E	01	di	TGCGTCACACTGGCAAGTTT TGGCTCAGGTCATGATCCTG	226
012E	01	di	TCTCTGTCTCCATATTTCTGGGA CAGTTCAGGGATGTGGGCA	244
013E	01	tetra	CCTGCATCAAACCTCTGTGGG CCCAACATTCTGTCTGCCAAT	226
FK015	01	di	GGGTCATGTGATCTATTTTGTACCTT TGTCTCCCTGCCCAATCCTA	205
FK016	02	di	CAGTAATGATTAAGAATGTGGAAGAAAAGC GACGAATATCCTACATGGAATGCC	201
FK018	02	tetra	AAGGACTGTTTCAATGGGCAATT CCCACCAAGCGAAGAAGGA	230
FK019	02	tetra	CCTGTGGGATTCACACTAGAAGGT CCTGGCTGGCATGCTCTC	267
368E	02	di	TTAAGGGAGCTGACTTCCAGGA CTGAATGTTTATTGCGTGAATGAATATA	251
020E	02	tetra	TGTAATAGAGACCATATGACTCCCCA TCATAGCAGTTTTATTTTTAACACTCCG	251
446E	02	tetra	CCCTGCCTGTGGTCTTCCT GAAGACTAGAAGTATGAAATTGAGGCATAGT	210
021E	02	tetra	AAGGCTACAACCTTTTTCTTCCATGC CAGAAGTGTTTAACTGATTTTATGAGTAAG	252
447E	02	tetra	GGGAATGGCAGTATATAGAGAATGC ATACAGGTTTCATATTTACTACTGGAAGAT	217
371E	02	tetra	CTAGCAAGTTCCTTTCTGAATTAAC AAGTAGGCAGCCCAATGCAG	260
455E	02	tetra	TACGCAGGGATGAATAAATGGC CGTAGCCCTGAAACATCCAAAC	251
404E	02	tetra	GAATATTTTATACGAAGACCAGCATGG AAATATGAGAGTATACCACTCATAAAGAGGG	251
028E	03	tetra	TGCGTCACACTGGCAAGTTT TGGCTCAGGTCATGATCCTG	203
FK029	03	tetra	TCTCTGTCTCCATATTTCTGGGA CAGTTCAGGGATGTGGGCA	368
401E	03	di	CCTGCATCAAACCTCTGTGGG CCCAACATTCTGTCTGCCAAT	252
374E	03	di	GGGTCATGTGATCTATTTTGTACCTT TGTCTCCCTGCCCAATCCTA	251
442E	03	tetra	CAGTAATGATTAAGAATGTGGAAGAAAAGC GACGAATATCCTACATGGAATGCC	233
FK032	03	tetra	AAGGACTGTTTCAATGGGCAATT CCCACCAAGCGAAGAAGGA	205
364E	03	tetra	CCTGTGGGATTCACACTAGAAGGT CCTGGCTGGCATGCTCTC	212
461E	03	di	TTAAGGGAGCTGACTTCCAGGA CTGAATGTTTATTGCGTGAATGAATATA	222
379E	03	tetra	TCCGTGGAAGAATGGCCTT GCCCAGACTTAACCTTGGTCTATG	258

Tabelle A4 Fortsetzung.

Marker	CFA	Typ	F-und R-Primersequenzen (5'→3')	Größe[bp]
FK040	04	tetra	AACCTGTACATGGTTTTAGAACCTTTGAACC TCTCCCTCTATTTCTCTTTTCCTTT	211
359E	04	tetra	GGGTCAGGAGGTGGAGGC GACCAGCACACCACCCAGTA	327
375E	04	di	TTGGCTTGAGCAAAGTTGGA GGTCTGTATCTGCTATACTGGTAAGG	255
360E	04	tetra	CCACAAATATTCAAACAGTACTTCACG ATGCATTTTGGCCCTTCGC	270
360E2	04	tri	ATTTGCATTCCCCGGAGAG ATGGCAACTGATGTGGTTTAGTC	277
361E	04	tetra	GGATGGAGTCAGACCTTTTGCT GTCTTGAAAACAAAGACCATGCTTC	214
042E	04	tetra	AGCCTAAGGCTGCTTCAAAGG GGATCGAATCCCACATCGG	284
449E	04	tetra	AGAAAACAGTGATACCAGTCTAACACCA AATATGTGTCCACTTACCAAAAAGCTATAG	224
429E	04	tetra	CCTCTGCTCAGCTCTTCTC CAACTTGTGCCTTCCCATCC	233
443E	04	tetra	GTTTAAAGGGCATTGTACCTGGTC CTGCTTCTCACATGCTCATTCTCT	234
381E	04	di	TGTTTCAGCACAGCCAATTTATTC TTCTTTCCTTTTCAACCACTGCTA	254
047E	04	tetra	CATACCTAAACTAAAATCCCTTGCTTCT TGACTGGGTTTTGTTTCTTGCTG	256
FK047	04	tri	TTCCATGGCCTTCTTGCTG AAGAGGGTATCAGTAGATTGGGAAAAG	300
430E	05	tetra	AATCTGTTTGCCCATCCATCTACTC TCCTATTTCAAGGAAGGGCCC	234
430E2	05	tetra	AATCTACACTTCAAAAATGATTAGGGTGG GGGTTTTATTAACCTTGAGGGATGA	224
FK053	05	tetra	TACCCTCCTTCCCTCGGTCA GGTGCATGGAGCCTGCTT	204
054E	05	di	CATCTTCTTTCGACCTGCTTGC CCGAAGGGCTGAGAGGTACC	256
FK054	05	tetra	TATGTCATGATTCTAGGAGAGTAGGCAT CATGAGATCCAGCCCTGTGAT	202
383E	05	tetra	GTGAGCATGTGTTGCCAGTTG TGCTTAGAGGCAGGGCCTT	251
384E	05	tri	GAAGTTGATGTCAGGAAGGGAAAGT TGTGCAGACTGATATAAATGAGGGAT	251
061E	05	di	GAGGATGTCTGGCATATGTTTAGAGTTA TATGACCTGGGTATCCATTCAATTT	221
061E2	05	tetra	CGTAACAGTACTCTCTATTAACCATGAAC AAGCTCCCCCTGCGGA	207
FK062	06	di	GGCTGGTGTGGTTAATGCT CCTATAGGCAAACCAAACAGCAG	205
063E	06	tri	TGCATTTCAAGGCTATGATATGGG TGGAAAACCCAAACTGCTATCC	253
389E	06	tri	AGTTTTGCCTGACAGGTGCTTT TGGAGACCCAGGATCGAATC	255
402E	06	tetra	TCGCAGACCTGTCCACACTC GTCTCCAATTCCCACACCA	261
450E	06	tetra	GAATAACTACAAATTAGGAATCTACTTGTGGA CGTGATTTAATTTGAGCTGGAACC	214
390E	06	di	AGCCTCTCCTACCCTTAGTGCA TTGACAATGTGCAGCTGGATG	253
390E2	06	tetra	TCCATGGCTACTGTACTTCCAAGA CTTCTGCAGGATATCTGTATTCATCTAAA	202
071E	06	tetra	CAAGGTTGGGAGTTGCCCT TCCCTTCTTTATTTCTGTTCACTGC	258
074E	07	tri	GTGAATGTTAGTATATGTAAGGCATCTGG GTTAGAGGCTAATTTCCCTGTAGGTTT	253
074E2	07	di	CGGGATCGAGTCCCATGTT	236

Tabelle A4 Fortsetzung.

Marker	CFA	Typ	F-und R-Primersequenzen (5'→3')	Größe[bp]
FK074	07	tetra	CCTGCTTATAATCCCTTGGATATTTTC AAAGCTACGCAGAGCCATGAA	233
392E	07	tetra	GCAGCTCTGAGCTCTAAGTCTG CCTCCTCCTAAAAACATGTGGACTAA	369
FK078	07	tetra	AGGAGGATGAATTTTTACGATTTTACCT ACCCACCCCTCCGTCTGT	246
393E	07	tri	GACTTAGCCAGAAACAACAATACCTG GGAATGGAAATTGTACCTCAACTGA	205
079E	07	tetra	CCTGCTCAGAAACATCCTGTCTAT CCTCCCTTCCCCCTTCTT	209
391E	07	tetra	CTTTCGATGACTCCACATTCCAA CCCCACTGACATGGCAACA	256
454E	07	tetra	GTTTTTCATCCAATCCCTTACCAATTA GATCTCCGGGTTGTGGGT	204
FK081	07	di	TCTTGCCCTAATGATGCTCCA GCGTCCCTCAAAGAGTTTAACTCTTA	219
394E	08	tri	AAAAACCTATGCTGGTAAGATCT GATCAAACACCAAGTTGTGTCT	233
084E	08	di	AAAAGGATATAAAGTGGAAAGCTTCTTATCTC TGTACTTTTTCCCTATACCCCTCTACT	216
451E	08	tetra	AACTGCGCCGCTTCA GTATCCCAGAGCCTCGCACC	254
434E	08	tetra	ATCTGGCTCCCTGCATGG CCTGTGGGAGAGTCTAACAAAATAAATAA	251
365E	08	tetra	GGCCTTCAGCTTTTCTTAACAAGT GTCAAAGCCGTCACAGGACA	399
FK089	08	di	GAGGTGCATGTCGCTTTTTACTC GATGCGTGAGAAAGGAGGGA	256
FK091	09	tetra	ACGCAATGCATAACTGCTGC AGAAATGGGCCACTGTGGAA	216
FK095	09	tetra	TTTCTGCTCCAGAGTTGCAA TGCCGACTCCTGGAAAAATG	202
397E	09	tetra	TCCAAATATTGTATTTGTTCCAACCTTTATT GACTTAAGCCAGCCATGTCCTT	206
097E	09	di	GCTGGTGGAGTGGGTTCTT GCAGACACTGAAGGGACCAGA	227
354E	09	tetra	CCTCATGTCAATCCCTGGGTAG AAAAAGACTAGGGGCACCTGTGTG	303
353E	09	tetra	GGATCCTAAGCCAATTCCTCCTC AAACATCTGCTCAGGACTCTGGA	378
102E	10	tetra	CAGATCTGGACGTAACATTTGCTC TGACTTTTACTCTTTATTTCTTATTCTTGTGTC	211
104E	10	tetra	AGCACAAGTATTCACCAATGGG GGCTTAAAAGAGATGAGAACTATTTGCTA	272
105E	10	tetra	TCAGAAACTCAAGTGTAAAGCTGATGA AATCCTCCCGTGCTTACC	224
FK108	10	tetra	TCAGACATCCTGTAGATCAGTGTCATT ACTGCCAAGTAAATTGAGAGAAAGTTC	207
107E	10	di	AAATTGGAATAATACCACCACTCACTTC TGAGACTGATAAAGTGTACTGACCTGCT	207
395E	10	tri	CTAGAGTGGGTGCTGGTAGCTATACTG CAAAGTCCAAGGGCCAAA	202
113E	11	tetra	CCGTATGTGAATGTGACGCTG TTTCAAACAATTTTAAATCAAGTTGCC	216
441E	11	tetra	CGCGATCCTGGAGTCTCTG AATTAGGAAGTTTCCACCAGAATGG	236
118E	11	di	TCACATTTATCCTGCTCATCTTCAA CCCCTCCTCAGGCTCTGC	327
427E	11	tetra	TGTTGTTAGTCTGGGTTCTACAGTGA TGCCATTGGCTTTTCTGGT	227
396E	11	tetra	AGGTTCCATGAAGATTAAGACTTGAA AATCACATCAGCAACTAACTCATCC	234
120E	11	tetra	GTTAGTGTCTTCTGTTCTGTAATTATCGA GGACACAGGCAGAGGGGAGAAG	255

Tabelle A4 Fortsetzung.

Marker	CFA	Typ	F-und R-Primersequenzen (5'→3')	Größe[bp]
120E2	11	tetra	CATTCTGACAGACGAGCATGC TGAAAAATGGGTGGAACCAAA	242
FK121	11	di	CTTGACTATGGCAATGTCAAAGGA CCATTCCCAGGATTCATACTTGAT	201
122E	12	tetra	GGGAGATGAGGCATTCCAGA GGGAGAGCAGAGAGGTGCGC	254
122E2	12	di	AGCAGTCAGCCCACCTAAATTC TTTTACAACCTGCTGCCAGGA	201
FK123	12	di	ATTCTCCCCTGGACATTAAGGTC ATGCCTAATAATATAGTGCAACTATATACAATTGAC	238
124E	12	di	AAGTACTGTTTTGAGAACTGTTGTTTCAGT ATGTTGCCCCACTCCAA	206
126E	12	tetra	CAAGCCCATTCCTTACCTC AAATGTGAACCTGCTGGCTTTTAATAAT	229
428E	12	di	AAAGGGCTCTTGAGAATCTTAAAACA TCTGGCTACATAACCATTAATAAAAAGTAAAAT	225
399E	12	tri	GATGACCTATTTCTTACCCCATC CCCTCATTGTGTTTTATTTATGAGACTATTT	251
399E	12	tetra	TAATTCTGAGACCAGTGACTCCACC CCAGCCTTGCATTGGGC	251
FK129	12	di	GTTTCTTAATGCTTTCACCTCTGTTG AATCTTAAAAAAAAGATTAGGCCCAATTT	201
129E	12	di	AAGTCCAAAATGGTGTCTGGTG GCATAGTTGATTTGCTAGCCAGAGA	241
FK130	12	di	GAAATATGGTCAAGCCAGCACTT TGAGCTTAAACCATTCCATTACCAAT	209
131E	12	tetra	TGATAGTGATGATTCGTCCTACAAGTG GAATGCCCTACAGTGAGCCTCTATA	257
135E	13	tri	GCTAGGATGGAGACATGATATTTCC TGTTCCAGACTATTTTTCCTTGATGCT	255
FK135	13	tetra	CCTGAAAAGTTCATAATGGTTCAGG CCCATATATTTTTCAAGAAGGCATATTCT	209
435E	13	tetra	GTGCATGGAGCCTGCTTCTC AATTTTTCTCCTCAGTTTGTACC	223
FK141	14	tetra	CACCAGGTGCTGTAAGTGTGTGA GGACTCTTAGCAAAATCAATCTAGCCTC	230
FK141.2	14	tetra	TTGGGTA AAAATGGTCCATTGGTATA CTCAATCCCAGGACCCAG	204
410E	14	tetra	TCTTAGAAAAGTACACAGACTCTCATTGATC GATTGCTCCTATACAAAATTTCTAATCCTT	215
415E	14	tetra	GCCGATACTATTAGCAGGAAGGGT AAATTCTGAGTGTAATGGCCTAAATAAAC	323
149E	15	tetra	GCTAGAAAACTCTCCCCAGCAA GCTGGGTCTTCATATTGACCT	235
355E	15	tetra	TTCTCCAAATCTATCAGCTTTCCAT GTGAGAAAGATTATGAGAGGTGAAGATATC	297
152E	15	tetra	AAGGATACTGTATAACCACACTAGCAAATTT TCACTGCACACAAAATACCTAGAAATG	211
414E	15	tetra	ACAGAGTGCAGTTTCACCTCCAT AATCCAAGCCAGCTCTGATCC	255
416E	15	tetra	CTGGAACCTCTCATAGACATACCATTTG TTTTCTATTTCAATCTCAGCGTCTC	301
155E	15	tetra	CTAAAATATTCTGCTGCAAGTTGGCT TCAGTGATGAGATAGCTGAGCTTATTC	219
356E	15	tetra	CCTGATAAGAAGACTGTTCCCTCC GATTTGAACTTTCTGTGTTAGATATTTCTGT	290
456E	15	tetra	TAAGTTTCAAGAAGTAGTATTCCTATCGGA GCAATGACTTGGGCCACTCT	207
160E	16	tetra	ATGTTGAAATGTTAAAAGCTCTCCTTT TGTGTTGACATTTGAGTATTTTCTACCTG	269
160E2	16	tetra	CTTTATGGAAGAGCTTTGTTGAAGTGTA TCACCAACTGTCTCAGGGAAACT	216
411E	16	tetra	GAGGGCAAAGAGTGCTCCTTC TTTCCAAATCTTCATGGGTGC	239

Tabelle A4 Fortsetzung.

Marker	CFA	Typ	F-und R-Primersequenzen (5'→3')	Größe[bp]
161E	16	tetra	TCCTCTGCCCTTCACCCC TGATGCACTGATTTTCTACCTCGTATAC	201
409E	16	tetra	GAATGGAGAAATGCAAATAGCTGA GATAAAGCCCTGCATAGGATTCC	241
417E	16	di	ACCAGAGTCAGACAGCCAACTG AAGGCACAATAAAAAATATCTGATATATGAAG	313
FK417	16	tetra	ATTTGAATAAGCCTGAGGCTTACATG ATTGCCAGCCCTTCTAAAACTCTAA	256
408E	16	tetra	ACTGATCTTTACCTCTGGATGTTAGG CAGGTCATTGATCTCAGGCTCA	222
166E	17	tetra	CCACAGGCACATTGATCTGC GGTGACCAAATATCATGTTTGCA	225
167E	17	tetra	TCTAAATGACCATCACAGATGGATG TTGTAGCCAAACAGGAGATGTGTAAT	203
412E	17	tetra	GTTTTTGCTGTGCAACCATCC TCAGAATTGAGAGAATTCACAACCTTAC	237
413E	17	tetra	GAACAGTGCAGGGAGATTGTGT TTGAATCTTCCCAACAAGGGG	397
413E2	17	tetra	GTGATTAGCGTGACCCACAAGTC TCATTATATTATGCAGTCACCATGATCTTA	253
FK172	17	di	TGCAACATGTGGGACATACTTATATTT GAGCTGTAAGGAAGTAGTGGGGTATAATAGA	221
FK172.2	17	di	TATGCTGGGTACTATGTCTACAGGAGTC TCCTCAGTGGTTTGGTATGGG	212
176E	18	tetra	GGTTTGTGAAAAATCCTCTTCGC TCCCACCTCCCTAGAGCATAACA	201
418E	18	tetra	AAGTGAGCGGAGAGACACAGC CGTTAGGGACCTTCAAAGAGA	405
180E	18	tri	GTGATCTCAGCCATAAACTGTCCC CTGCAGTCAACCACACTGCAC	206
180E2	18	tetra	GGCCATGAGATATCCTGAGACACTG CAGGACCCAGGATCATGC	404
419E	19	di	AGGCTCACAATCCCTCTCATA TAGATTTGATACCTCCCTGAGTCC	198
440E	19	tetra	AATTCCAAGCCTCCTTAATACTACATGA AGGAGGTTGCCAGGCAGAT	259
FK190	20	tetra	CTGGGACATCCTGAGGCCT GCTTTTTACCTATATTCATGTGAAC	228
420E	20	di	CCACCTGCAGAACCACAAATG GCATAATGGGAAGAGGCCAG	221
387E	20	tetra	CCATTGAGATGAGCATTATGTTGC TCTCCTCAACTTGGCCAGC	201
421E	20	tetra	CTGCGCCACCCAGGG ACCGGATCCTAATTAAGGTGCA	263
422E	20	tetra	GCAATGGTAAATGACAATAGCAATAC TCACCATATGAATATGGGTGGATAC	218
196E	20	tetra	GGGATCATGACCTGAGCTGAA GCTCCTGCCCTGAGCACAT	229
197E	20	di	TTGCTGCTTCTGTCTCCGC GAGAAGCTGCTGGCCAGTA	217
439E	21	di	CCTCTGCATTATTCATTGTTGTG TTGTAAGTTGACTATATGGCAGGCA	201
452E	21	tetra	AGCAGATTAGATTTGCCTTACAAAGAT AAAGTATTGATGGCTAATGGAGGACTA	220
FK201	21	di	GATTTGGCATGGCCAACG CAGTAAACTAGCCAGACTGTGAGACC	228
FK201.2	21	di	AGGCCACGCCCTGAAAA TAATTGCTATCCTCTACCACACAAATACT	216
423E	21	tetra	CCACCATGTGGGAGTTGTTTCT TAAATATGAAAGGTGGTGGGTGTGT	268
386E	21	di	GACACAGGTCACACGTGCTTGT TCTCATCAAATTAAGCCAAAGATCTT	183
FK205	22	di	TGAAGCTTTTAACAAACGCAGATAAT CTTCACCAGTCTCAGATTGCC	209

Tabelle A4 Fortsetzung.

Marker	CFA	Typ	F-und R-Primersequenzen (5'→3')	Größe[bp]
380E	22	tetra	TTGATCTTAGACCGGCATTGG ATGCTTGCTTCACCCTAATACTAGC	202
208E	22	tetra	TTTAGCTCTCATACCTTTTTAGTGCCA CACAAACCTGCATATAGTTAGATACAGATG	296
436E	22	tetra	ATCAAAATATCATCCTTAAATAGTTTGCTTT CATGACTGATTGAGATAACAATCACATTCT	381
210E	22	tetra	GAGCATCAGGCTCCCCAAA CAGAGGTGGCCATCTTAACCA	208
453E	22	tetra	GGCAGACTCTGTTCAATCACTGA GAAGAATAATAGATAAACCCTATAGGCCTTC	241
211E	22	tetra	CCTACACATAGCTTGCTTCTCCCT TGGTGCCAAGCTTTGAGAATT	249
212E	22	tetra	AACCAGGGACTCCCAAGAATG CAGCGTCTGCCTATGGCTTAG	315
212E2	22	tetra	GTGTGTAGTGGCTTCCCTGATTTT TTTACTTACACATTGGGCATGTTC	227
FK213	23	tetra	GGCTAGGAGACGCCAATAAGAGAA AATCTCTTTCATGTAAGTGAACCA	248
FK213.2	23	tetra	GGGCTCAGTGAGGTAAGTATCCAA GGAATGTACCCTTCTCCTTTCTGAA	229
213E	23	tetra	TCATCCCCTCAAATAGTGTAAGGG GCTGACAGGGTCTGGAAGAAGA	237
444E	23	di	GATGTGGGTATGGTTGTATAAATTTTCTT CATCTTATTTCTATTTCTCAAGGTTAGTAACA	233
216E	23	tetra	GACTGTCTGCCATGTGTGTAATAATC CATCCTTGGCTACCATATCTCCC	206
218E	23	tetra	CAAGCTGACTCTATAGTAGGATCATGAGAC TCCTAAGGTCATAAACTGGAACTTTC	224
378E	23	tetra	AGGGCAGGGAGTATTCACCTG GCTAAGTCATTGGCTTTCTCCAAAA	240
222E	24	di	GCTTTGCCTTCTATGTAGGAAGTGA GATTTTAATAGCACCCGTTGGC	218
224E	24	tetra	ACGTGATCCCAATTTCCGG GGGTGTCAGTGTAATAGTGAGGGTATC	292
225E	24	di	CTCGTGTGAGACTAGCGCTCC TGCACGCTACCCAGTTATATTGG	225
FK226	24	tetra	GGGCCAAAGGCAGATGC CCACCCCTCCAAGGAAAAAC	249
227E	24	tetra	AGCATCTGGAGACTGTAGTGACCTC TCTCGGAGTCCTGGGATCAA	322
231E	25	tetra	AAAAAGAGAAGACCGGAGATCCC GATTTTAAACTGCCCTATGGCCG	317
445E	25	di	GAGAGCCCGAGACTTTCTGAGA CAGGTGGTAAGAAAAGACTGTTGCTT	213
233E	25	tetra	ATTTTGTGATGACGGTCGGG GACTTTAATGTTCCACAGGGCTTTC	288
234E	25	tetra	TTTTAGGACAGGAACACAGAAAAGTG GCCATACAGATGTCCCAGAGAATATTC	301
235E	26	tetra	GAGACAGCGTGTGATCTACTTCTAGGAC TCTTACAGGAAATCACTTACCCACTG	382
236E	26	tetra	AGGAAAATGACAGGCTGTGAAAA ATTCCAAACTCTGTCTGATTAGAAGT	209
236E2	26	tetra	ACTGGCTTACGTTGATATGGCAA GATCGAATCCACATCGGG	206
236E3	26	tetra	TCAAGTGCTTATCCTGAAAATGTTGT CCTGCATGGAGCCTGCTT	230
FK237	26	tetra	CAGGACACTCCTGTGATTATCAATTAG GCAACTGGTGGGATGGAAAA	285
457E	26	di	CAGAAGCTACAGAGCCAGACCTT CCTGCATCGGAATCTGCC	211
458E	27	tetra	TCCTGCCAGGTCATTAAGAGTACC TCTTCTCTGCCTATGTCTGCC	238
243E	27	tetra	AGGTAGTTCTCACTGCTGTCAAACAG GACAATGGAATTTTGCCAGTAGC	207

Tabelle A4 Fortsetzung.

Marker	CFA	Typ	F-und R-Primersequenzen (5'→3')	Größe[bp]
459E	27	tetra	TTTGACTTCAGAATGTTTCCTTACTGT GCATTATCTGACTTCCCAAATCAATT	246
250E	28	di	GTTCTGGCTACACAAGATACCACG TGATAAAACCAGAATGAATGGCTATG	224
437E	28	tetra	GGACCTCCCTTCTTTTTGTG GAGTCTGCTTCTCCCTCTGCC	201
251E	28	di	AGGCCACTCTGGCTTCCC CAGCTTTGGATCTGAGGTGGAG	204
377E	28	tetra	AAGAGGAAAACTGTGGAGCACA AAAGAAATGCTAGGGCAACCCT	251
256E	29	tetra	GACACCATTCCAGGAGTAGAGGG TGGTTCATAGGTTTGAGCCCC	359
FK362	29	di	TGGAAGCAAAAAAGCTGTCAAC CCTCACCATTCTTTTGTGCATTTT	267
362E	29	tetra	GCCCTATACTTCTATCCCCATTT TCACTTCATGTACTAACCTCCACCAT	254
363E	29	tetra	TCTTCAAACATTTATTCTGGAGGG ACATGATTCAAACTATTAGACAAAAGCT	368
FK258	29	di	TGCCAAGAGCCTACCCTACAATAA TCAAAGGTCTAAGCCAATAGTGAGG	204
259E	29	tetra	CATATGGGTTTTGCCTCCCC GCCCAAGTCTAGCTCACAATGA	255
426E	29	tetra	TCGGAAGAATTTTCATAGCATGTAAAT TTTAAAAAAGTCAACACATAATAGCACAAA	251
358E	29	tetra	TTCAGGGTTTAGACTTTACCCTGAA ATCAGGCACATTAGACTAGCACAGA	247
260E	29	tetra	CAGGGAGTCTGCTTCTCCCTCT GAAGTCATTACGTATCAGGGTGTGAA	208
432E	31	di	TTCCTTAGCCACTGCAGAATTTT CATTCTTGCTACCTCAGGACCTAAGT	209
271E	31	tetra	AAGCTAGAACTCAGGAAAGATGTGCTA TGACTGCAGATCTTGAGACTTTTCA	273
438E	31	di	TGCACAGTCAAGGTTCTGGC CACACAGTACACATATTTCAATAGGGTTTC	281
273E2	31	tetra	TGTGATGCATCAGAAATAAACTGGTC GAATTTTAAATATTCACAAGAGATTAGCATAAC	323
273E	31	tetra	AGGAACTCCAGGTGTGATTAGCA CTTGTGGAAGCCTAGCAATGAA	201
275E	32	tetra	GTGCACTGTACTTTCATCCATTTTC AGCCCAACTCATAGGATGCCT	306
FK275	32	tetra	TGACACCTGACAATTTAAAGTGTTCA TTTGTGCTTAGAACATCAATAGATACATG	253
FK275.2	32	tetra	GTTTTCAAGTGCCAAGTTACACATG GATGTGGGACTCGATCCCC	227
276E	32	tetra	ATGTCCATCCAACCATCCCTC TCCGTCCCCTGACCTGTTT	215
FK276	32	tetra	ACTGCAGTGACAAACAATGGCTAC TGACCTGCTTTTTTGCATTTCG	211
388E	32	di	CAGTGGTCCATTTTCCTTCAG AACCTTTTTGGCAATGTAGTGTTC	261
388E2	32	di	ACATGGTTGTAGCAATCCAGGAAT TTCCAATGCCAGGCTTATCC	206
282E	33	di	GTGATTGTCCTTGTTTTGAGAGAGAC ACTTGACAAGTGAATTCACAGA	217
FK285	33	tetra	GCTCAACTATAGCAACTAATTTCTACATGG TGAGTTTTCTTAATGACAGATTTATTTCTT	242
286E	33	tetra	GGCCTGTTTTCTGGCAATTT CTAGAAGCTCCTGGGTCGAGAG	221
288E	34	tetra	GGTTAAGAGTCATGTTTACAAAAAAGGAT CCTTCCTTTTCTTAATAAAAAGATATAATTGC	254
289E	34	tetra	CAGAAGTTAGTAGAAGATATTTGGTTGACAC GGATTACATATCATATTCTTACAACAAAGCTAAA	257
433E	34	tetra	TCAACCCTCCTCTAGTCACCTAAACT TGACCTCAAGCAGCTTATTCCA	221

Tabelle A4 Fortsetzung.

Marker	CFA	Typ	F-und R-Primersequenzen (5'→3')	Größe[bp]
294E	35	di	GTGGCTCTTAGAAGCAATCTTGG TAAAAGGTCTTTGGGGCTCCTG	308
294E2	35	tetra	AAAGCTTATCTAGTCCAAGAGGCAAG TGGGTGGCTCAGTCAGTTAAGTC	245
460E	37	tetra	AGTCCCACATCAGGCTCCC GGATAAATGAATAATGAATGGCTGG	246
308E	38	tetra	CCATTGTGTTCTGGAGGCAAA AAATGCCTGTGATGCATGTCA	206
352E	38	tetra	AAAAAACGCAGTTTGCACCA AAATTGGGTCTATGATGTGAGCTATG	299
309E	38	tetra	GGTGCATTCTCCTTTGGCTTAT CAGGCTAGGCCTCTGTGTTTATA	255
FK310	38	tetra	GTGTTCCAAAAATTGGTCAGCC GCTCTTCTCTGAACTCCCGTAAA	258
FK310.2	38	tetra	TATATACATGCTAACTTTATGCGTTCATG TGTACCCTGCGTGGACTCC	314
FK310.3	38	tetra	TGAGATTAGGAGTGGAAAGCGG AATATACAGACTGTTATGCTCCTACATTGC	297
310E	38	tetra	GCTGGAGGGAGAATTAGGT GCTGCCATATTCTCTTCTG	303

Tabelle A5 Mikrosatelliten- und SNP-Marker für die Feinkartierung homozygoter Kandidatenregionen der Rassen Irish Glen of Imaal Terrier (G), Airedale Terrier (A), Löwchen (L) und Saarloos Wolfhund (S) mit PCR-Primersequenzen, PCR-Produktgrößen und Repeat-Typ bzw. verwendetem Restriktionsenzym.

Marker	CFA	Typ/ Enzym	F-und R-Primersequenzen (5'→3')	Größe [bp]
G11FK73.7	11	di	GTGTGAAGGAATTGGTCCAAGG GCTGGAAGACGTACAGAAGAATCA	257
G11FK74.1	11	tetra	AGATGAAAACCTCAGGAGCACCAGT CCAGGGTGTCCTCCGGGA	255
G11FK74.3	11	di	CGTTTTATTTTTACTATTTAAAGTGTGGCTACTAA TGTTTCTCTCCATTAAGCAGAATATTTATC	254
G11FK74.8	11	tetra	GACAGAGATGGCACCCAGGT AATCCTAGCCTTATGTTTATTTATACTCTTCT	320
G11FK75.1	11	di	CATCGCTGATTCGCACATCCAGTGGCTCAGATGGCC CCAATTAGTCTTGAACATGATGGTTTAA	254
G11FK75.5	11	tetra	TGTAGCCACCTGTGCTTTTCTC CATTTTTATACTCGCCTGGCCTA	230
G16FK26.2	16	di	GCAGGCAACAGGCTATTTTCA AGCCCAAGCCACTTACCCAA	324
G16FK27.76	16	di	CTTCATCTACAAAATGGAAGTACATACCA GGTAAACTCTCTCTTGTCTGGACCA	263
G16SNP27.84	16	<i>HindIII</i>	AATGACCTGATATAGATGAGTCTATGAACATAG CACTTGACAAGTTGCCAAGGAG	186
G16SNP28.25	16	<i>EcoRV</i>	ATGTGCACTTCTGAATTGTGTCTCT GGTGCCCAAAATTTGATCGTA	223
G16FK28.4	16	tetra	AACCTAATTCAGTTTTTCAGTGGTTTATC CCGCTCGTGCTCTCTCATT	210
G16SNP28.57	16	<i>TspRI</i>	TTTAAACCATGTGTACTTTTGTATGGAATAC TGATTATCTTTGTAGAAAATTCAGTGATATG	243
G16FK28.58	16	tetra	CCAGAAAATGTTTAAATGTGTTATTTTCATAT TCAAGTACACCACTCAGGCGC	273
G16SNP28.59	16	<i>SsiI</i>	AGGGAGAAAGGATAACTGGATATTATGT TTATCAATACTAATTATGACCAAATCAGTTTAAAC	245
G16SNP28.60*	16	<i>AluI/ MboII</i>	AGACTGTGCCACCTACACTGGAG ATAACCAGTGACTGAAGCAACATATCTATA	391
G16SNP28.78	16	<i>BfmI</i>	GATAGAGGTTCTAATTCAGATGGCA TCAGTCTCTACTATCAAATTCATGTGGATT	202
G16FK28.8	16	tetra	GGATATCTACCTGATTAAAGATTTGGTGA AAGATAAAGGGAAGAACTTATATTATGGTAA	268
G16SNP28.93	16	<i>Tsp45I</i>	TGCAAGAATGGAAATTAGGAGATG AATAACTGACTCACTCTGAATTTAAAGCAC	257
G16SNP28.98	16	<i>MnII</i>	CAGAACTAATAAGCAAATACAGCAAAGTT TCTAGTTTAAAGTGATAAGCCTGTCACCTT	195
G16FK29.39	16	penta	TACATAAGCAGCCACTGTCATATCAATAC TCGGTTTCAATTTGGAGCAAGG	279
G16SNP29.41	16	<i>MboII</i>	CTCAGAGAGGGTATGAAATTTTGCTT AAGAGGAGAGTTAACAGTATATGCAAAGAG	203
G16FK29.42	16	tetra	CATCAACACATTCAAAACAACCTGG GTCATTAGAAATATACATCTGAAGTTAGACTCTG	265
G16SNP29.421	16	<i>DdeI</i>	GGTGGGTCAGGAAGTATTGAG AAATACCTGCCCGGGACAA	251
G16SNP29.422*	16	<i>RsaI/ Bst1107I</i>	TGGGAATTGATTGAGGGCC TTTCACCAAAAACCTCTGTAGTACAGC	243
G16FK29.50	16	tetra	CTGGCACCCAAGAATTAGTATGG TGGGCATGAAACCTTTTCAGA	253
G16FK30.02	16	tetra	CCTGGGATCGAGCCCC CAGGCAAAGCGTCCGTTTAC	286
G17FK61.2	17	tetra	CAAAATCAAGAGTTAGATGCTTAACCAGA TTCCCCTGCTCACAGGCAT	178
G17FK61.9	17	tetra	AATTTTAGAAGACCCATTATCTGAAGTCTC CGAAATTCAGGGTCCACC	201
G17FK63.0	17	di	TTGTGAAGAGGGCAAGTGTATCAG GCAGGCTCCATGCAGGG	236
G17FK63.1	17	di	CTTTCACTTTTATGCAATGTGAGCTCTA CTGATGAACAAAACCTCAGGTGGG	289

Tabelle A5 Fortsetzung.

Marker	CFA	Typ/ Enzym	F- und R-Primersequenzen (5'→3')	Größe [bp]
G17FK63.2	17	di	CTCCGCGCTCTCAATATAAATTAATC CGCGATCCTGGAGACCTG	264
G17FK64.0	17	tetra	TCCCTGCACAGCCAGAG CCATGTAGCGGACCCAGTG	275
G18FK15.1	18	tetra	GCTTGAGTCCCTCTCCTTTGCT GCAAGATGATTTTTAGAAAGTTAAGAAGGT	266
G18FK15.6	18	di	TCTCTTTGCTAACTTCCTTGGAGTATG GATGTCTAATCTCCCCTAATGGAAAA	252
G18FK22.7	18	di	TTTTACTCCTATCACATGTTTATGGAAAA GGTATGTGTAAGAGTCTGGTAGAGACTCAG	253
G18FK23.1	18	tetra	TACCTACCGAATGAAGATGACAATTT CCAGTCAGAGTTATTTTGATGAGCC	246
G18FK25.8	18	di	CCAAGATTCCTGGTGGGT GGTGGCTCAGCGGTTTAAAG	256
G18FK25.9	18	di	TGAGGAGCTCTAGTTTGCCTACATT TGGACAAGTTGGTTTGGAGCTAGTTAA	238
G18FK27.1	18	tetra	TTATTTGATCCTAATGCCTGTGAGATTA AGCCCCATCCAACAGGAAA	221
G26FK6.1	26	di	TCACCAAACCAAAATGCAAGC TCTGATGTGATCCCATTGAACTG	257
G26FK6.5	26	tetra	ACCACTCCCCAGACAGCTACAC GTTATACACCACAACAAGAAGGATACAAA	252
G26FK7.0	26	tetra	ACACACAGAACACAGGGCTGC TCTGCCCCGAAAAATGTATG	221
G26FK7.1	26	di	TCATTTCTGCTGCTGAGGG CAGCACTGCTGGAGATGCC	269
G26FK7.3	26	tetra	TGTGGGATCAAGCCCCAC ACAAACCAATGAGTGCAAAACACATA	289
G26FK7.8	26	tetra	GGTCTACCATGCAGCAATTCAA GCATATCTTTCTAAAAGGTAGCCATTTG	241
G26FK8.4	26	di	GGCAGGACAGGATCTGATTGAC TCAAAAAGGCTGCTTGCTAAACAC	214
G29FK7.4	29	di	CATCATGACTTTCTTCCAGAGAGTTC GGTGACTGGGTGATGGGC	251
G29FK7.6	29	di	CTCTAGTGGCTAATGGAGCTGAACA TTGAAAACAAGAAAGGATCTCAGAAAAAT	268
G29FK7.7	29	di	AGCTTCTCCTCCACAGCAAATTT CCAACATTAGAATAATAATATCCATACCTAGTA	372
G29FK7.9	29	tetra	TTGAACTCTTTAGACATCATTCTCAC GATGAGCACTGGGTGTTATTCTACA	270
A3FK10.8	03	tetra	CCACGTCAGGCTCCCG GCCCTTAATTCCTGATTAATCACAT	258
A3FK10.9	03	tetra	CCATGCCTTGTTGACATAGCA TCAGGCTCCCTGCATGGA	301
A3FK11.0	03	tetra	CCCAGCCCCGTATCAGG TTATTGAATAGGACAAAGAAAACAGATTATACT	259
A8FK12.9	08	tetra	CATGGAGCCTGCTTCTCCC GATTTCTATTTCCCTAGTTCTGAGTGTTG	252
A8FK13.7	08	tetra	CTGCCAACCCCTGAATGTG GGCTAGAAATCGTAAATAATGCAGC	268
A10FK36.2	10	tetra	TGGGCTCCAATGAATCCG TTAGACCATCTCTCACAGCTCTCCT	269
A10FK36.4	10	tetra	TTGGCTCAGGGCCTGATC GTCCCCAGCCCCTTTCC	266
A10FK37.0	10	tetra	GCCCCATCTGCCCCTG GTGCACTTCTTGCTGGGCTAG	288
A11FK21.9	11	tetra	ACCGCTGAGCCACCCA GCACTGACTAACAATACAGCTCAATCA	268
A11FK23.2	11	tetra	GGTGCATGGAGCCTGCTT TCCACTCATAACAAGTGTACTGCAAA	249
A11FK23.6	11	tetra	GGCCCAGGATTTAACTGATTTACTT CCACACTAGGCTCCTCGCC	262

Tabelle A5 Fortsetzung.

Marker	CFA	Typ/ Enzym	F- und R-Primersequenzen (5'→3')	Größe [bp]
A11FK61.5	11	tetra	ATTAATGTCAAGTAAAAGTAAATTTTCAGAGCA CCAGCCCTCACGATCTTGTC	231
A11FK61.6	11	tetra	CTGTGATTAAAAACAAGATGTTAAGAGTGTAG AGATGCTTACAGAGGTTAGTGACTTTCC	259
A11FK63.9	11	tetra	GGTTGTGAGTTTAAAGCCCCTG TCAGAAATCTACATTCAGAATTTGGC	264
A11FK65.2	11	tetra	CTTCCAATCCACTCGATGG CATAAGATGGCAACAAAGTATCTAGGA	257
A11FK66.8	11	di	CCTGAGTGGCTAAGAGCATGC AAAACCTCTGTCCCATAGAATTCATATT	206
A11FK66.9	11	di	TATCTCCCTTGTCTACCTGCTGAACTA ACAAAGTAACGTTCTTGAGTTGAAATTT	267
A11FK67.7	11	tetra	TTCTGGCAATACCACAGAAAGAATT ACAACCAAGGAGAAAAGATAAGGG	252
A11FK68.2	11	tetra	AATCAGAGTATTTTTTCATTCTCCCCTAAT GCTAACTGAGCGAATGGACAAA	269
A11FK68.7	11	tetra	CACGGATGTACGCTGATGGT CCATATCCAATTTCTCCTGTTTGC	238
A11FK68.9	11	di	GCATGGAGCCTGCTTGAGA TCCAGTCTGTGGGTCATTTCC	258
A11FK69.4	11	tetra	TCTGCCTTTGGCCCAGG GGGCAACTACTTTGAATTATTTTAGTGG	262
A16FK16.1	16	di	GTGGCTCAGTGGTTTCGCA CATCCTTAGCAGTTTCATTTAGCAAC	266
A16FK16.4	16	tetra	GGCTCTCTGAGAAGACGAGCAC TTCCTAGCCCTTCATCAGCAA	257
A16FK18.3	16	tetra	GGTGGAAAGACAAAAAAGGCC CCACGTCGACTCTGTGCT	246
A21FK14.1	21	tetra	GGTTTGGTGCCACGTTCTTT GGATTGAGTCCCACATTGGG	251
A21FK26.7	21	di	CCAGGAATGGAGATCTAATGCC CCCGATTGCTCATGTGCTCT	241
A21FK27.1	21	di	TGTTCTAAGAAAGGAGATGTTTCAGAGC TTAAAGACTACAACAGAAGCCAATAAAAA	301
A21SNP27.20	21	<i>AluI</i>	CCTTGTGTACAGTTTCCAGTTCATTAA GGGTCTCATAGCCATTTCTAGTAGTTTG	251
A21SNP27.21	21	<i>BsuRI</i>	CGAGTCCCACATCAGGCAC AATAATACATGAAAATGATTTACACATGAATAAG	242
A21SNP27.24	21	<i>Tsp45I</i>	CACTTGTGATGCAAGGAACATATATA TGCTGTCAGTACCTCCATCCTG	327
A21SNP27.56	21	<i>Tail</i>	GGCATCCCCACTAAATTAACCT TTTGGTAATACTGTGCATTATCAATCTTC	233
A21SNP27.85	21	<i>AluI</i>	CTAATTGGCCCTTGAGGCTAAG TCTGCCCCAGAGACGACTGT	169
A21FK28.1	21	di	GAGGGAGAAGCAGGCTCCA CTGCTCTGTAAAATGCAATTCAC	274
A21SNP28.42	21	<i>TaqI</i>	GGGTGCAAGAGGGTGAGCT TTTCCTGGGAGGGCCTGTA	218
A21FK28.6	21	di	TTTTAACCCACAGGGCTGAGAGT TCTTTGCAGCAGCCTGAGAG	262
A21FK29.1	21	di	CTAGGGAGGGTTACAAATTGAAGATG GGAAGTTGGTCTGCACTGTCCT	255
A21FK29.5	21	tetra	CCTGTGTTGGGTTCTGGGC CACCTCACTCACCATCTTGGC	232
A21FK34.7	21	tetra	CATATTGAATCATAATGTTGTAAACCTGAAAT TTTCTCACATCTTCTCAGGACCTCT	259
A21FK35.7	21	di	AGAAGGCCAGAAGGTAGATCCC CCTGTGCATCTACCTCAGAACTACTT	262
A21FK36.5	21	tetra	GCATGGAGCCTGCTTCTCC TTGCTCCACATTCTAAAATACGTAAGA	254
A24FK23.8	24	tetra	GCATTCTTATTTCCCACTGAGGC CCTTCTGTGAAGTTTTTCCACATTAC	254

Tabelle A5 Fortsetzung.

Marker	CFA	Typ/ Enzym	F- und R-Primersequenzen (5'→3')	Größe [bp]
A24FK24.6	24	tetra	GAGGGAGAAGCAGGCTCCAT AGCTTTAACTTGCACAGGACACAC	251
A24FK25.4	24	di	CAGGGCCTGATCCTGGAGA GGCAGGGTGTGAGTCCTAACC	254
A24FK25.5	24	tetra	GTTCTGTGCCAACAAACAGTG GGCCAGAGGTCTCCTTGGGA	266
A24FK26.7	24	tetra	GTGCCAGCCAGGTGTCCTT AGAGTTCAACATTTGAGTTTGGCTC	270
A30FK37.0	30	tetra	TAACCTGCATATTCCTGTGCG TGAATACTCTGTAAAGGCCAGCA	252
A30FK37.6	30	tetra	GCTTTTGTAAATAGTGGAGACTTGAAA AAGACAAAAAATCAATAAAACAAGCC	221
A31FK25.8	31	tetra	AAAGGGATATTTTCTGTGAAAAGT TTAATGAATCTTGTGATGCTGCA	243
A31FK26.9	31	tetra	TCCTGGGATCAAGTCCCACA GGAAGAGACCTTAAGTATCACCTAGCCT	265
L1FK54.7	01	di	CAAGCTGGATGGTTAAGAAAATCA GAGGGAAATACAGCAACATCGTC	242
L21FK27.4	21	tetra	TTGAGTGTCTGCCTTTGGCTC TCTGCCTTTGTCTTGCCTCTG	251
L21FK43.6	21	di	CAAGCTCTATGGTCCCCCGT AGAGGATCTTGGCAGGGTCTC	258
L29FK27.9	29	di	TCAAACCCCAAACCTCTCTACCC TTAATGCCCTTCTCAAGCCTA	247
L29FK28.2	29	tetra	CTGACCACTTCATATATCAATAGTATATTACTG GGTCACTGCTATTATGCTTTGCA	279
L29FK28.4	29	tetra	GACCCGGGAACATGACCTG ATGCATATTTGCCATTTAACCTAAGAC	257
L18FK38.5	18	di	CATCTTGCATGAAAGTGGAATCC CAAGGCCTAGAAAGTGGCAGA	254
L18FK39.6	18	tetra	TGTGCACATTAAGGAGTTCAAAGTATTT GCAGGCTCCGTGTAGGGA	258
L28FK14.3	28	di	ATCAAGGTGGAGGAACAAGGAC TTTTAAAGAGATGATTCTGGCTGCT	251
L32FK24.5	32	di	TTCAGAGGACATTATTGATGCCTC ACTGCTAATAGTATATGCAAAAACACCC	282
S12FK67.0	12	tetra	GCCCACGAAGCTGAATTAATCTAT AGCTAGGCTATGTATGTGGGTAAGGT	249
S17FK28.0	17	tetra	CCTGGGATTGAGTCCCACAT TCTGATTGGCCAGGGTGAA	263
S22FK11.0	22	tetra	AGGTCATTGCTGCCCCAA GTTCTGTATGCCCTTTATCTAGCTAA	337
S22SNP12.1	22	<i>MspI</i>	CACGGCTGGTGAGGAACC CAAGGACACTTTTCAGGGAGGA	186
S22FK12.3	22	di	ATTTCCCAAATTTTGAAGTACCCA CTGTGAGCTCTTAAGACCATTCTGC	231
S22FK14.0	22	di	TACCAAAATTGAAGTTGGTAGTCAAACCT AATGCCTAGTACACCATAAGTGAATAATTTA	227
S22FK15.2	22	tetra	GTGAGATGGTAAAGGACTAATTTAAGTAGAGC AATTGGAGGTAGCAACTACAAGATGTC	251
S22FK16.0	22	di	ACCAGCAGTTCCTCAAGGTGATC GCCTCAAAAAATTTTAAAACCGG	343
S22SNP16.3	22	<i>AluI</i>	CATGTCTTTAGCTAAAATACTGTCTATACTCC AAGAGAACTGTCAAAAATAGGCACC	181
S22FK20.1	22	tetra	GGAAAATTTAATTCATGGCCCAG GATCAAGATTCATGTTTCGGCG	251
S22FK22.9	22	tetra	TAAACAGCTTCTCTCAGGGCAGT CCCTGCTAAGCAGCCAGTG	211
S22FK36.5	22	tetra	CTGTTTTCTGATCAAAGTACTTCTTGTTTG CAGGTCATGATCTCAGGGTCTC	257
S22FK37.5	22	di	CTGAAATAAAAATGTATTATCTACTTTGTAGCAAT AATATAGCTCCACATAGAGGTTCTGCTTA	204

Tabelle A5 Fortsetzung.

Marker	CFA	Typ/ Enzym	F- und R-Primersequenzen (5'→3')	Größe [bp]
S22FK38.1	22	tetra	TTGGTTTCAGCTCCTCAAATTTTC CAGCTCATGCAAGGACTCTGC	263
S22SNP38.3	22	<i>NlaIII</i>	TGTATTCACAGACATTTTCATATCCAGAT TGGAAAACATCAACTTGCAGAGC	220
S30FK23.2	30	tetra	TGCCTTCCATTCCCAAATTC CTCACTTCCAGCAGCTCAACC	261
S30FK23.5	30	di	GGTAGTTGGGGGAAGGATAA CCAGAGGAGCTTTAGCAGCATAAA	222
S30FK24.0	30	di	TGACACAATTAAGTGACAGAAACATCC AAATGGTGTGGTGTAAATGTGCC	252
S31FK18.7	31	tetra	TCCCTGAGTTTGAATTAGGATTAA TTCTCCCTCTGCCTATGTCTCTG	263
S31FK20.2	31	di	ACCTGACTGTTGCATTAATCTCTGC AGGGTGACACAAAATGAACAAAAC	289
S31SNP21.2	31	<i>Mbol</i>	AGAATTTTGAGTGGGAACTTGATGTC TCAACCACTGAGCCACTCAGG	263
S34FK16.9	34	di	TTCTATAATGCCAGCAACAAACCA GATGCCCAGGTGGCTCAGT	254
S34FK18.3	34	di	TTAGCTTTAAAATAGTCTCAGTTCTCATCTGTT CATATTTGCACCCCAGCTCCTA	252
S35FK17.5	35	tetra	TTAGGACAGGAATCAAGTCTTGTTTT ATTCTGGAGTCCTGGGATCAAGT	266
S35FK18.9	35	tetra	GGATCTTGCATAACCTCTCTGAAAA ATAAGACTAAGCATTAGCAAGAGCCA	265

* Fragment umfasst 2 SNPs

Tabelle A6 Primersequenzen für Kandidatengene *ADAM9*, *PPIP5K2*, *PXMP3*, *PLEKHBI* und *ARHGGEF17* mit Angaben von chromosomaler Lokalisation, PCR-Produktgrößen und Enzymen für die SSCP-Analyse.

Name	CFA	F-und R-Primersequenzen (5'→3')	Größe [bp]	Enzym
ADAM9Ex1	16	GGGTTTTAGCTTTAGCGGCG ACACAAATCTCAGAGGTCCCTGAG	390	
ADAM9Ex2	16	GCACTCAGCTTTTGATTTCCATTAC CTGGCCAACACAATCCCTG	277	<i>AluI</i>
ADAM9Ex3	16	GTAGTTACAAGTTCTGTAAAACAATTCAG CCCAAAATAGTATGGCTTTTCCATAC	392	<i>MseI</i>
ADAM9Ex4	16	TACTGCTTGTGAGTTGTGTTCTTAGTTG TTGGTTGTGCAATATACAGTCTTGTG	252	<i>Sau3A</i>
ADAM9Ex5	16	TAAGATGCCAGTAGTATAAACAAAATTGTTAG AATGACCTGATTTAGAAAAGAGTGATAGGT	292	<i>AluI</i>
ADAM9Ex6	16	TCTATACCATGGTGCCCTTTTTATATAT CACAATTTTTAACACTTTAGTCTGAGCC	374	<i>Sau3A</i>
ADAM9Ex7	16	GGTTGGTGTGTTGTTGTGGAATAC CTCACTTCTCATCTGCTTTTCATGAA	199	
ADAM9Ex8	16	CAGAGGAAATATTGGGATTCTTATCTTC TTCCACTCTGGTATAACCCAGTT	216	
ADAM9Ex9	16	TGTTTTATTTTTAGTTGTGTTACTTCATCGT GCAGAAGTTACTATTCTGACCATTTCCA	324	
ADAM9Ex10	16	AGTTTAAGCTTATCCAAAGGAATAAGAGC GTTCTAATGCAGATGTCCAAAGGTAA	219	
ADAM9Ex11	16	AGACTGTCATCATCATAGTGATTAATTTCC AAGAAACACTTATCTACGGTACCATGTTAAG	298	
ADAM9Ex12	16	TAAATATTCACCTTCTTGTGGTTGAGG GCCAGTTGCCCAAAGCAA	320	<i>Sau3A</i>
ADAM9Ex13	16	GAGGCTGGTTAGAAAAGAAGATTTAGATC ACTTCAAACCTTGCAAACAAGTGGC	325	<i>EcoRI</i>
ADAM9Ex14	16	TTTATGGATCTAAATACTGTGGCTTCAA CAGGAGAGAGAACAGGTGAACTTCA	406	<i>NlaIII</i>
ADAM9Ex15	16	TTTAGAAGGTAATGTGGCAGTTGATC GCCAGCAGTCACAAGGAGTTATAA	304	<i>EcoRI</i>
ADAM9Ex16	16	TTAGATTCCTTCAACTAAATATCAATAAACTT AAACAGTTGAAAAACAGCCATTCTTA	467	<i>AluI</i>
ADAM9Ex17+18	16	CGCTCTAATTTCTTGGCCAC CTGACATGGGCCATTTGCA	561	<i>TspRI</i>
ADAM9Ex19	16	GTCAGTTTCACTTTTGAACAATGTGAA CCCTGCTAAATCTTAGAACCTATTTT	380	<i>AluI</i>
ADAM9Ex20	16	AGGATTAACACGTGTGAATGCTGT GAAATTATCCATGTTATTGCTATATCCATG	353	<i>HindIII</i>
ADAM9Ex21	16	TGTATCCCACATTCAGTGGCAA GACATTAACCTGGGTTTATTCTG	300	<i>HibPII</i>
ADAM9Ex22	16	TGCTGTTGTTAGGCTTGAATGATG AAATAACATAATCCATGTTTCGGTGC	477	
PPIP5K2Ex1	3	TGCCAACTAGCTGTCATCACAA GCAAAAATGTCTTCACAATTTAGAGAGT	360	
PPIP5K2Ex2	3	TGAAAAACATATTTAGAGTTTGTATTAAGTCA CAAAATGGTAACATCACTGATCTGTG	389	
PPIP5K2Ex3	3	TGAAATTAACCTTTTATGGGAAGTGAC TTAATGTATATGAAAAACCTGATGCC	291	
PPIP5K2Ex4	3	AGACTTGAAATCTATGCCTTTTTAAATAATAC ATAGAAAAGAAGTGCCTCGAAAGTATGT	252	
PPIP5K2Ex5	3	AAATCGTACATTATCCAAGTTTTCTTTATAT CCTGAATGATACAGTCTTATTTAATCTTAGTT	382	
PPIP5K2Ex6	3	ATTTTTTGGTAATATCTAAGATGGAAATACA TCCAGAATAGAGTCTATCCCCGG	301	
PPIP5K2Ex7	3	CTTTTGATTTGTGCTGCTGTTTTT TACTTCTCCAATTAATGCCCATATAAC	353	
PPIP5K2Ex8	3	TATGTTGTAATAAGAAAACTGTGAATCCTAA TGGATTCTGAGTAGCTGGTATGCA	268	
PPIP5K2Ex9	3	TCTAATGCACCAGTTTAGACCTGCTA GGTGGACCCCTCAAAGCATA	462	

Tabelle A6 Fortsetzung.

Name	CFA	F-und R-Primersequenzen (5'→3')	Größe [bp]	Enzym
PPIP5K2Ex10	3	TTTGAAATGGTAAAAGATGGTTCTAAATAAG AGCCAGTTTTTCTACATGATGTGTAA	293	
PPIP5K2Ex11	3	AGGACACACAGTATCTGAAATCCATAG CATGATGAGAGAGCACTGGGTG	310	
PPIP5K2Ex12	3	TGTTGGTTTTAAATCACTAATGGCAA AGCAATAAAGTGCAGAAAGATCAAAC	285	
PPIP5K2Ex13	3	ATTACAAATAGAAGGTGGCACTTAAAC GGATAGAAGTCAAAGTTAACAGAACCTCATT	384	
PPIP5K2Ex14-15	3	AAAGAGTGTTCGTGACAGAAGCAA TGCTGAATTTACAGGGTATTAGCT	775	
PPIP5K2Ex16	3	GAAATGGTAGATTAGCTATATTATTAGTAAGG AATTGAGAAGGGACACACAGGG	515	
PPIP5K2Ex17	3	GGTCATTTTCAGTTTTGATATGGAATT AGCTATTATTCTTTTGTGACGTATGT	409	
PPIP5K2Ex18	3	GTATCATTCCCTTCCTTCTAATAGTTCTA AAAGTTATGGGTTTTATAGAGATGAAAACC	476	
PPIP5K2Ex19	3	CACTTGCTTTTTTTCACITCTACCA GGTGGGAAGTCAACTGTTGGAG	506	
PPIP5K2Ex20	3	ACCCCTCCATTGTGGTTGG TGACTTCATTACAAATTCAAAGAACCATA	329	
PPIP5K2Ex21-22	3	TTTGTGTGGTGTCACTCAGGATTA TGGGACAAGAATTGAAGGACATT	501	
PPIP5K2Ex23	3	ACATGTGCTTCAACTGACTTCCC TTCCACACTCCATAATTAAGCTGTA	363	
PPIP5K2Ex24	3	TTTTGCCCCCTTCTCACTT TGTTGCTCTGAATGCGGGT	251	
PPIP5K2Ex25	3	ACAGCTTATTAACCTTTGTCTGTCTGG ATACAGGTTAAATAAAAACATAAGCATAGCAT	301	
PPIP5K2Ex26	3	AGCTAAGTGTGGTAAGAGCCATGTTA CCAGTTGAATCAGTGGACTTAGGC	324	
PPIP5K2Ex27	3	GGAAAGACCTAACCATAACAGTTCTA TAATAAAAATAATAAAAATAATAATCCT	271	
PPIP5K2Ex28	3	TGTAATGTATATTCATAACTCCACTAAATATG AAAACACAAGCTATTATTATTCTCCAAT	303	
PPIP5K2Ex29	3	TGAACATGAATTGCTTGTGAAAATC GTATACGGAAAAACATAAATTACTTGCTT	292	
PXMP3Ex4.1	29	GCCCTGGTCAGTTGCGTATC GGTCGTAGCAGCGCTCTTCTA	483	
PXMP3Ex4.2	29	TTTTTCCCCGAAGCTGAGGTA CCGCTTGTGGCTAGTGTATTGTC	459	
PXMP3Ex4.3	29	TGGTTTTGCAGAGTTTCTGATTTTT AAGATACCTGAACAGTATGCTCAGGAT	411	
PLEKHB1Ex1	21	AGGACGATTTTTCTGGACTCTGTG TTCGGAGAACAGGGACTGTTG	290	
PLEKHB1Ex2	21	ATTAGCAGGCTTACCCTTGTATTATG CTGACAAGCCCACTTCCCC	294	
PLEKHB1Ex3	21	GGGATTCTGGGAGCCTGTC TGGGAGGGCCATGGC	288	
PLEKHB1Ex4	21	GGATCAGAGGACGTTGGCAA TCAGAAGGCCAGTGAGGAG	301	
PLEKHB1Ex5	21	CGAGCCTGGCTTGAGAAGG CCACAGAAGCCTATTCACACATATATA	256	
PLEKHB1Ex6	21	TGGTAGGGCCTGTAAAAGCTCT GGATATGACCGGGCCAG	276	
PLEKHB1Ex7	21	AAGTGGTTTTGTGGGCCTAGAA CCGCCTGGGAAAATCCA	279	
PLEKHB1Ex8	21	TCTGCCTCTGTGTCATGGGTTG TCTTAGTGGAGGGTCAGGTCAAGTA	305	
ARHGEF17Ex1.1	21	CCCCAAACCCCTTAC GGCGCGTCGAAGCG	417	
ARHGEF17Ex1.2	21	CAGCCTCTCGCCGTCG GCCTCCTCCCCTCGGTCC	365	

Tabelle A6 Fortsetzung.

Name	CFA	F-und R-Primersequenzen (5'→3')	Größe [bp]	Enzym
ARHGEF17Ex1.3	21	ACGCCACCTCCTCGGAC GAGAGGGAGCTTCCAGGCC	421	
ARHGEF17Ex1.4	21	GCCACCGCTGGGAGG GCCGGCTCTGGTCCAAC	509	
ARHGEF17Ex1.5	21	CAAGGGCATTGAGAGATGGAG CCGTCATCTGCTGGGC	508	
ARHGEF17Ex1.6	21	AGGTGTTTGAGAAGATCCAGCG GCCACTGGAAGCCCTGC	526	
ARHGEF17Ex1.7	21	TGGCCCCAGCTGTGGAT CTAGTCTGGTCTCATCGGCTT	523	
ARHGEF17Ex1.8	21	CCGGAGCAGTCATCAGGAA CAGCGCTCCTGGCCC	470	
ARHGEF17Ex2	21	GCCTCAAAGGCCAGGGAT TTCCATCTCTCCTCTAGTCTCAATC	306	
ARHGEF17Ex3	21	GCCCAGGTGATTTCTGTGTG CATCCCCTTCCAGGAGGC	333	
ARHGEF17Ex4-5	21	AACCAGGATAGGATGAGGTGGA TCAGCCCCAACCAGGTAGG	560	
ARHGEF17Ex6	21	CTCTCTGCAGTCCACCTATAGTCACT GGTCGTGACTGTGATTCCAGG	351	
ARHGEF17Ex7	21	CCACCCATCTCTGGCCATAT TGAGGGCTCTGCCCCA	417	
ARHGEF17Ex8-9	21	ACAACAGGAGTCCCAGGTGG CCTGGTCACAGTTCTTACAGGAGAG	494	
ARHGEF17Ex10	21	GTCAGGCCACTCCCCACAC GCTGTATTTTCCCCTTGCAGTAA	375	
ARHGEF17Ex11	21	GCTCTGTCCCCAGCTGAGG CCAAAGCACAGGACTCAGGATT	521	
ARHGEF17Ex12	21	AAAGCTACTCATCAGGGTCCAGG GGCGACTGTAATGTTCAAGACATATAC	423	
ARHGEF17Ex13	21	TGTACGTGTATATTGGGAATTCATGC CCACCCATCACCCCGAT	381	
ARHGEF17Ex14	21	CTTGCGGACGAGGTGGG CTGAGACTTGATTCCATGCCTTT	483	
ARHGEF17Ex15	21	GGGAAGGGAGAACAGCAGTG TCCCCGTGGGTTTCAGG	502	
ARHGEF17Ex16	21	GGGAGGAGATGGTGGTGGGA GGCCAGCAAAGCAGGGA	271	
ARHGEF17Ex17-18	21	CTTCAGGAGCCATAGCCATTCTA AGAGATGCTTTTTTATGGCCCC	666	
ARHGEF17Ex19-20	21	GTTTGGAGTGAGTTGTAGGTGGGG TTAAATAGAGTCCAGGATCCCTGG	724	
ARHGEF17Ex21	21	TCCCCACAGAACTGTGC AGCGGGCTGAGGGCA	363	

Tabelle A7 Primersequenzen mit Lokalisations- und PCR-Produktgrößenangabe für die Mutations- und Genomsequenzanalyse des *ADAM9*-Gens bei Irish Glen of Imaal Terriern.

Name	CFA	Primersequenzen (5'→3')	Größe [bp]
ADAM9IVS14+2100_F	16	TGGGGCTGGATATAACAACTTATCCTTA	495
ADAM9IVS14+16II_R	16	GGGATATGTAATTGCTGCTGTAGCTA	
ADAM9IVS14+16II_F	16	CCACAGTAGCTACAGCAGCAATTACAT	446
ADAM9IVS14+16_R	16	CACGGTGGCCTACCTGTCA	
ADAM9IVS14+16_F	16	GTAGGCCACCGTGATGTTTTG	493
ADAM9IVS14+3462_R	16	TTTCACCAAAAACCTCTGTAGTACAGC	
ADAM9IVS16+11121_R	16	AAGGAGCAATCGGAAAAGTCTAACTTAG	607
ADAM9IVS3+7285_F*	16	GGTATCAATAGCACATAGATATCAAACCATTA	552
ADAM9IVS3+7813_R	16	TGACAAAGCTTCCCATTTAATTCA	
ADAM9IVS3+7725_F	16	TTTCTAGATGACCCTTGGAAAATCTC	472
ADAM9IVS3+8194_R	16	GGGAGTCTGCTTCTCCCTCTACC	
ADAM9IVS3+7912_F	16	CCATAGAAAATTGTAAGATATTCATAGAAATTTGTC	840
ADAM9IVS3+8765_R*	16	CTAAGAGCTTTCAATCTCTGGAGGG	
ADAM9IVS3+12498_F	16	AACCTTATTTGTACCTTTCCCTCTGAGA	781
ADAM9IVS4+72_R	16	TTGGTTGTGCAATATACAGTCTTGTG	
ADAM9IVS3+12646_F	16	CAAGACTGTTTCATGAGCTTTTCACTT	534
ADAM9Ex4_R	16	CTGTACATCGGGATGGTCTGAGA	

* Primer für LongRange-PCR (Fragmentgröße 1467bp)

Tabelle A8 cDNA-Primersequenzen mit Lokalisations- und PCR-Produktgrößenangabe für die cDNA-Analyse des *ADAM9*-Gens bei Irish Glen of Imaal Terriern.

Name	CFA	Primersequenzen (5'→3')	Größe [bp]
ADAM9cDNA5UTR_F	16	AAATGATGGAGCAGGCCGGAG	398
ADAM9cDNAEx4_R	16	CTGTACATCGGGATGGTCTGAGA	
ADAM9cDNAEx2_F	16	ACGAAGAGAAGCCCCTAGGC	490
ADAM9cDNAEx7_R	16	GAACAGCTCCACATATCGGGTC	
ADAM9cDNAEx6_F	16	CAAAACAGTCTCTCATTTTGAGCAC	539
ADAM9cDNAEx10_R	16	ACGTTAATCCCGCCTGCG	
ADAM9cDNAEx10_F	16	CTGCGGGAATGGCATTGT	566
ADAM9cDNAEx14_R	16	CTGAATAAAAACATCTGGCTGACAG	
ADAM9cDNAEx14_F	16	AGGAAAAACCAACGAATGTGATG	540
ADAM9cDNAEx17_R	16	CCATGTCCATGACACTTTTCTGA	250*
ADAM9cDNAEx17_F	16	ATCTGTAGAACTTCCAGTGTGTAATGC	583
ADAM9cDNAEx22_R	16	AAATTCAAGTGAGGGAACTATATAAAGGA	

* cDNA-Fragmentgröße bei gPRA-erkrankten Glens mit Deletion von Exons 15 und 16

Tabelle A9 qRT-PCR-Primersequenzen mit Lokalisations- und PCR-Produktgrößenangabe für Expressionsstudien.

Name	CFA	Primersequenzen (5'→3')	Größe [bp]
ADAM9 Ex15_F	16	TGATGTGAATTCTAAAGGTG	151
ADAM9 Ex16_R	16	AATAATAGCAGGCACGATTC	
GAPDH_F	27	TGTCCCCACCCCAATGTATC	100
GAPDH_R	27	CTCCGATGCCTGCTTCACTACCTT	
GNAT1_F	20	GCTCGCGTGTCAAGACCAC	109
GNAT1_R	20	ATCCACTTCTTGGCTCTGAG	
CCDC66_F	20	CAAGACAGTCTACATTTAAACAATACTCCA	114
CCDC66_R	20	AGTGGATTATTTTCATCCAGGACAGA	

TTCAAATCACTACTACCCAGAAAACCGATAACCAAATCTGCTAAAATGCTGGTCAACATAATCCTTGAGAAAA
 CAAATGAACGAAAATCTATTGCTTCTTTGCTGCCCCCTCAATAATAGGTCTCCCTATTGTGGTACTGATCGTC
 ATATTCCTTCCATTTTATTCCCAACACCCAGTCGCCTAATCAATAATCGGTTAATCTCCATTCAACAATGACTA
 ATTCAACTAACATCAAACAAATACTAGCAATTCATAACCAAAGGGACGAACCTGAGCTCTCATACTTATATCA
 CTAATCTATTTATTGGCTCAACTAACTACTTTGGACTATTACCTCACTCATTACGCCACAACACAACCTCTCT
 ATAAACCTCGGAATAGCAATCCCCCTATGAGCAGGACAGTAATTACCGGTTCCGCTATAAACCACAAAGCATCC
 TTAGCACACTTTCTACCCCAAGGCACCCCTCTCCCCCTAATCCAATACTAGTAGTCATCGAAACTATTAGTCTA
 TTTATTCAACCCATGGCTCTAGCCGTTGATTAACCGCAATATTACTGCAGGACACCTCCTAATCCATTGATT
 GGAGGGGTACCTTAGCTCTTATCAATATTAGCGGACCACAGCTTTTATCACTTTTATTATTCTAATCCTACTT
 ACGATCCTAGAATTGCTGTTGCCTAATTCAAGCCTATGTTTTTACCTTACTAGTGAGTCTATACTTACATGAC
 AACACCTAATGACCCACCAAACCTCAGCTTACCACATAGTCAACCCAAGCCCATGACCGCTGACAGGGGCCCTTT
 CTGCCCTCCTTATAACATCGGGTCTTATCATATGATTTCACTATAACTCAATAGCCCTA

Abbildung A1 Mitochondriale Referenzsequenz U96639 einschließlich des *ATP synthase subunit 6* Gens, des 3'Bereichs des *ATP synthase subunit 8* Gens und des 5'Endes des *cytochrome c oxidase subunit 3* Gens mit variablen Positionen (dunkelgrau) sowie den identifizierten Sequenzvariationen darunter (hellgrau).

CTAGTATTCTCCATCCTAATCTTGGCATTCATTCCAATCTCCACACATCTAAGCAACGCACATAATATTCGG
 CCCCTTAGCCAATGCCTATTCTGACTTTTAGTCGCCGATCTTCTCACTTAACATGAATTGGAGGACACCAGTT
 GAGCACCCCTTTCATCATTATCGGACAAGTCGCTTCAATCTTATATTTACCATCTTATTGATCCTAATACCAACA
 GTTAGCGTTATCGAAAACAACCTTCTAAAATGAAGAGTCTTGTAGTATAATCATTACCTTGGTCTTGTAACCA
 AAAATGGAGAGTAACCGCCCTCCCTAAGACTCAAGGAAGAAGCTCTTGCTCCACCATCAGCACCCAAAGCTGAGA
 TTCTTCTTAAACTATTC

Abbildung A2 Mitochondriale Referenzsequenz U96639 einschließlich dem 3'Ende des *cytochrome b* Gens mit variablen Positionen (dunkelgrau) sowie den identifizierten Sequenzvariationen darunter (hellgrau).

GCTCTTGCTCCACCATCAGCACCCAAAGCTGAAATTCTTCTTAAACTATTC CCTGACACCCCTACATTCATATAT
G

TGAATCACCCCTACTGTGCTATGT CAGTATCTCCAGGTAAACCTTCTCCCTCCCCTATGTACGTCGTGCATTA
T G T T C T

ATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATAATATTATATCTTACATAGGACATA TAACTCAATCTCATAA
G CC CT C G

TTCACTGATCTTTCAACAGTAAATCGAATGCATATCACCTTAGTCCAATAAGGGCTTAATCACCATGCCTCGAGAAA
C T C A G C A C

CCATCAACCTTGCTCGTAATGTCCCTCTTCTCGCTCCGGGCCATACTAACGTGGGGTTACTATCATGAAACT
T

ATACCTGGCATCTGGTTCTTACTTCAGGGCCATAACCTTATTTACTCCAATCCTACTAATCTCGCAAATGGGAC
C T G TC T A

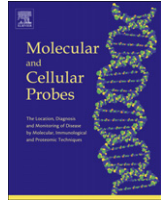
ATCTCGATGGACTAATGACTAATCAGCCCATGATCACACATAACTGTGGTGTGCATGCATCTGGTATCTTTTAATT
T T

TTTAGGGGGGCAATCTGCTATCACTCACTACGACCGCAACGGCACTAACTCTAACTTATCTTCTGCTCTCAGGG
G - T T

AATATGCCCGTCGCGGCCCTAATGCAGTCAAATAACTTGTAGCTGGACTTATTCATTATCATTTATCAACTCAGC
G C

CATAAATCAAGGTGCTATTCAGTCAATGGTTTCAGGACATATAGTT
TG

Abbildung A3 Mitochondriale Referenzsequenz U96639 einschließlich eines Teils der D-Loop-Sequenz mit variablen Positionen (dunkelgrau) sowie mit den identifizierten Sequenzvariationen darunter (hellgrau).



Generalized progressive retinal atrophy in the Irish Glen of Imaal Terrier is associated with a deletion in the *ADAM9* gene

Regina Kropatsch^{a,*}, Elisabeth Petrasch-Parwez^b, Dominik Seelow^c, Annegrit Schlichting^b, Wanda M. Gerding^a, Denis A. Akkad^a, Joerg T. Epplen^a, Gabriele Dekomien^a

^a Department of Human Genetics, Ruhr University, Universitätsstrasse 150, 44801 Bochum, Germany

^b Department of Neuroanatomy and Molecular Brain Research, Ruhr University, Universitätsstrasse 150, 44801 Bochum, Germany

^c NeuroCure Clinical Research Centre, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Dorotheenstrasse 96, 10117 Berlin, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 July 2010

Accepted 26 July 2010

Available online 4 August 2010

Keywords:

Generalized progressive retinal atrophy

Irish Glen of Imaal Terrier

ADAM9 gene

Deletion

Mutation

ABSTRACT

Generalized progressive retinal atrophy (gPRA) belongs to a group of inherited retinal diseases which are associated with gradual vision loss in various dog breeds, including the Irish Glen of Imaal Terrier (GIT). By genome-wide homozygosity mapping using SNP arrays and fine mapping of candidate regions, we assigned the gPRA candidate locus in this breed to canine chromosome 16. The respective region is syntenic with human chromosome 8 comprising the *ADAM* metallopeptidase domain 9 (*ADAM9*) gene. *ADAM9* represents a strong candidate gene for canine retinal disease because mutations have previously been shown to cause autosomal recessively inherited human cone-rod dystrophy, a retinal disorder affecting photoreceptor function. Sequence analysis of *ADAM9* in affected and carrier GITs revealed a deletion of exons 15 and 16 which alters the reading frame leading to a premature stop codon. This mutation was absent from 34 other dog breeds. A variable and, at times, very late onset of gPRA was confirmed in GITs by a relatively mild retinal degeneration at an advanced age. Hence, the identification of the genetic defect underlying gPRA in the GIT represents a suitable model for cone-rod dystrophy of humans, with superior potential to elucidate functional consequences of the recently described null mutations in the human *ADAM9* gene.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Generalized progressive retinal atrophy (gPRA) encompasses a group of genetically heterogeneous retinal disorders of domestic animals [1]. The disease is characterized by progressive degeneration of the retina, finally leading to blindness [2]. Several forms of gPRA are similar to their equivalent retinitis pigmentosa (RP) in humans, a group of the most common human inherited retinopathies [2]. To date, canine gPRA has been associated with 11 genes and 1 genetic region [3–15]. In dogs, gPRA is most commonly inherited in an autosomal recessive (AR) manner. Various forms of gPRA can be classified based on the timing of the onset and the rate of progression of disease [1]. A late onset form of gPRA has been described in the breed Irish Glen of Imaal Terrier (see Fig. 1A, GIT; Fédération Cynologique Internationale group 3, section 1, standard No. 302). GITs represent an ancient breed, originating in the Glen of Imaal in Wicklow County, Ireland. Originally, this breed was developed as a general working dog, proficient in herding and

hunting, particularly fox and badger [16]. The breed standard was first established in 1934 by the Irish Kennel Club. In GITs, gPRA is inherited in an autosomal recessive manner, with an onset of disease of 6 years on average. Thus far, the underlying gPRA-causing mutation in the GIT has been unknown. Therefore, the molecular genetic basis of gPRA in this breed was studied using genomic mapping. The gPRA locus of GITs was assigned to a region on chromosome (CFA) 16 showing synteny with human chromosome 8 (8p11.22) by autozygosity mapping using arrays comprising genome-wide single nucleotide polymorphisms (SNPs) [17]. This region includes a disintegrin/metalloprotease-like gene, *ADAM9*, a member of the multifunctional ADAM protein family. Mutations in *ADAM9* have been shown to cause a form of human cone-rod dystrophy (CRD) [18], which belongs to a group of progressive retinal dystrophies that affects the function of photoreceptors.

2. Material and methods

2.1. Dogs and humans

All dogs originated from the common breeding population of pure-bred GITs in which gPRA is transmitted in an AR manner.

* Corresponding author. Tel.: +49 234 322 5764; fax: +49 234 321 4196.

E-mail address: regina.kropatsch@rub.de (R. Kropatsch).

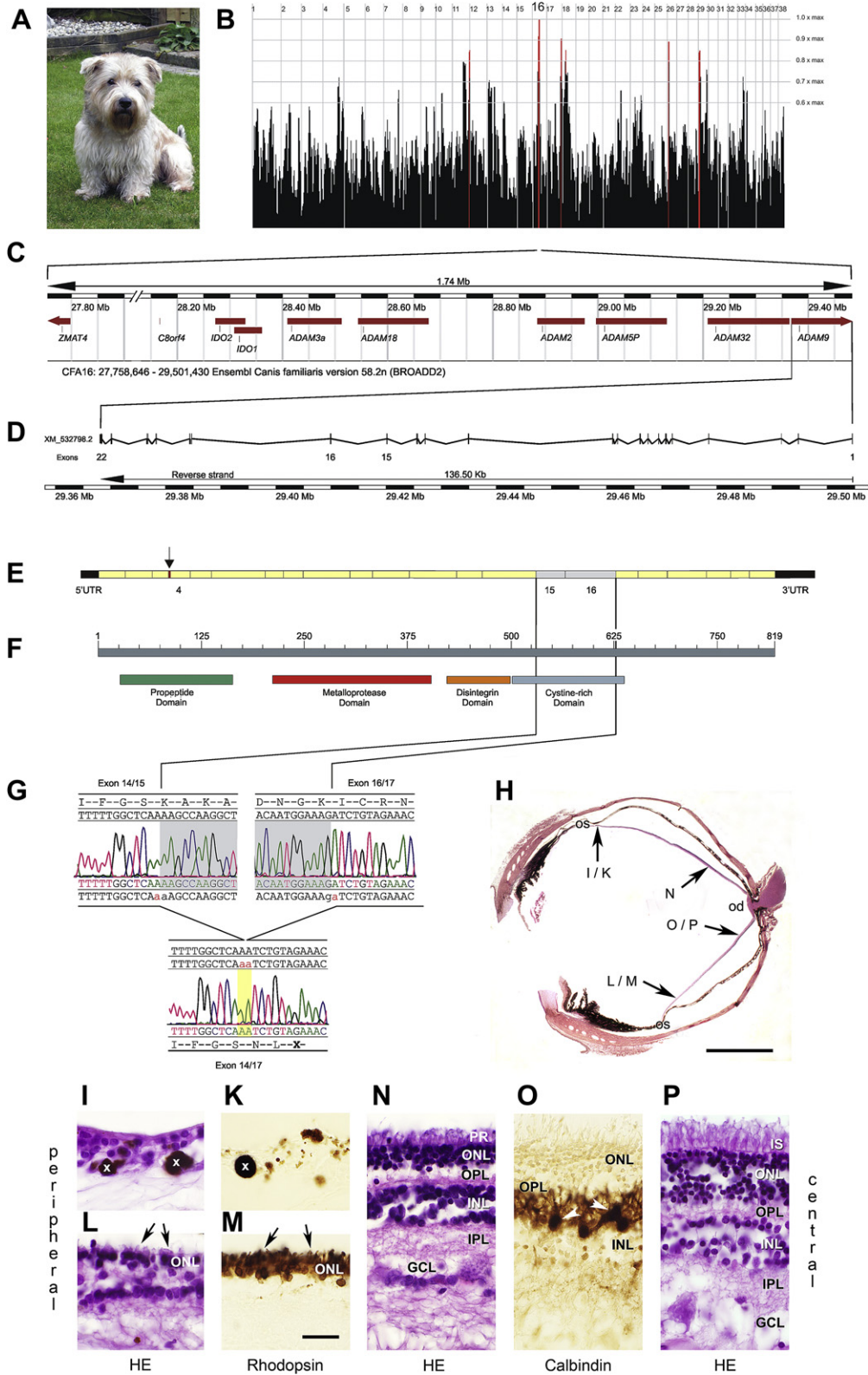


Fig. 1. The candidate region on CFA16 as identified in gPRA-affected Irish Glen of Imaal Terriers (GIT) via homozygosity mapping, including all candidate genes, the newly identified *ADAM9* mutation as well as the morphological and immuno-histochemical characterization of a gPRA-affected GIT eye. A GIT. B Genome-wide distribution of homozygous DNA sequence regions using SNP array based homozygosity mapping in 12 gPRA-affected GITs as compared with 12 controls. Homozygosity scores are plotted against the physical position of 38 autosomal chromosomes. Highly homozygous regions are indicated in red bars. C Physical map of candidate genes in the fine mapped gPRA critical region comprising 1.74 Mb. D Exon/intron structure of *ADAM9* gene (Ensembl accession: XM_532798.2). E cDNA structure of the *ADAM9* gene including exons 15 and 16 (EMBL accession: FR667706), the site of deletion as well as the newly detected 5'-part of exon 4 (EMBL accession: FR667709) as identified by cDNA investigation and indicated in red and with an arrow. (Parts C–E and are modified from Ensembl and NCBI databases, respectively.) F Protein sequence of *ADAM9* with its main domains shaded in different colours. G Chromatograms of part of *ADAM9* cDNA exhibit the wild-type sequences of exon–exon boundaries 14/15 and 16/17 as well as the respective cDNA sequence of this region resulting from the deletion of both,

Veterinary ophthalmologists confirmed the gPRA status of affected and unaffected dogs by ophthalmoscopy, as documented in certificates of eye examinations. For SNP genotyping, we used the genomic DNA of 12 gPRA-affected GITs and 12 controls which were predominantly gPRA-affected dogs of various breeds with known gPRA mutations (Schapendoes: $n = 5$, Sloughi: $n = 1$, Kuvasz: $n = 1$, Entlebucher Mountain Dog: $n = 1$, Airedale Terrier: $n = 2$, Lowchen: $n = 2$). Three pedigrees, comprising 32 GITs, including 10 gPRA-affected dogs, were available for the fine mapping of homozygous regions. In addition, a larger cohort of GITs ($n = 138$, including 14 gPRA-affected GITs) predominantly from a large pedigree with multiple inter-breeding events was used for the analysis of the mutation. Blood samples of 383 healthy dogs from 34 breeds, 60 gPRA-affected dogs from 28 breeds and two wolves [19] were also included in this study. Blood samples were received from the owners of the dogs, in cooperation with breeding clubs. Genomic DNA was isolated from peripheral blood cells using a standard protocol [20].

For cDNA and quantitative reverse transcription real-time PCR (qPCR) analysis, eyes and muscle tissue from a gPRA-affected 10.5-year-old GIT (which had been reported to have lost night vision previously and had severely impaired day-time vision) as well as from a healthy Saarloos Wolfhound were obtained from veterinarians. Informed consent of the owner was obtained and the fundus status of the dog's eyes was documented. Eyes and muscle tissue were collected following euthanasia of the dog because of terminal disease.

2.2. Genome-wide SNP genotyping

Using the Affymetrix Canine Genome 2.0 Array "Platinum Panel" containing 49,663 SNP markers, genome-wide SNP genotyping was conducted on 12 cases and 12 controls. SNP genotypes were obtained according to the human 500 K array protocol, as described previously [17] except for the purification of PCR products which was undertaken with magnetic beads (AmPure, Beckman Coulter, Krefeld, Germany). Detailed information regarding the Canine Genome 2.0 Array is available at <http://www.broadinstitute.org/science/projects/mammals-models/dog/canine-array/canine-array>. Identification of extended homozygosity regions was achieved using the program HomozygosityMapper [21] in all affected individuals based on SNP genotypes by comparison to controls.

2.3. Fine mapping using microsatellite and SNP markers

Fine mapping of homozygous candidate regions was carried out using microsatellite markers in related dogs of particular pedigrees, as described previously [22]. Three microsatellite markers (derived from an extended, yet unpublished marker set with superior coverage as compared with the MSS-2 set [23]) were used in order to characterize the approximate localization of the candidate region (24.7–29.9 Mb) on CFA16. For fine mapping, twenty-one additional markers (8 microsatellite and 13 SNP markers) were selected in

candidate regions using UCSC genome browser (May 2005 assembly) and CanFam2.0 SNP database (Broad Institute of MIT and Harvard; May 2005 assembly). Microsatellites were amplified by PCR under standard conditions [24].

For SNP analysis, PCR conditions were the same as for microsatellite amplification, except for the concentration of primers (10 pM). PCR products were digested with specific restriction endonucleases, depending on the SNP-containing sequence. Primer sequences for all markers used in this study are available from the authors upon request.

2.4. Haplotype and linkage analyses

In the homozygously typed candidate region on CFA16 (27.76–30.02 Mb), haplotype analysis was performed using the data for 6 microsatellite and 6 SNP markers (16FK27.76, 16SNP27.84, 16SNP28.25, 16FK28.58, 16SNP28.59, 16SNP28.78, 16SNP28.93, 16FK29.39, 16SNP29.41, 16FK29.42, 16FK29.50 and 16FK30.02) in order to reveal key cross-over events in the GIT pedigrees. These marker systems were newly established for fine mapping of CFA16 based on the dog genome sequence (UCSC; May 2005) using the TANDEM Repeat Browser. Two-point linkage analysis of candidate regions was performed using Superlink-online 1.0 software (<http://bioinfo.cs.technion.ac.il/superlink-online/>) employing an autosomal recessive model of inheritance, complete penetrance and a disease allele frequency of 0.001.

2.5. ADAM9 genomic sequence and mutation analyses

The genomic *ADAM9* sequences (chr16:29,366,778–29,504,714, CanFam2.0) were compared with an *in silico*-predicted *ADAM9* mRNA (accession XM_532798.2) in order to verify exon–intron boundaries. Since the CFA16 genomic sequence is publicly available under accession NC_006598 and includes a gap in intron (IVS) 3 in the canine *ADAM9*, the respective region was amplified by long-range PCR (expand high fidelity PCR system; Roche, Mannheim, Germany) and sequenced directly. All coding exons and exon–intron boundaries together with 5'- and 3'-untranslated regions of *ADAM9* were investigated. Novel identified sequences of *ADAM9* exon 4 were verified by overlapping cDNA analysis. For mutation analyses and deletion size estimation in *ADAM9*, parts of IVS14 and IVS16 were amplified by PCR using different primer combinations, in order to identify the recombination breakpoints.

2.6. cDNA analyses

Total RNA was isolated from retina and muscle using peqGoldTriFast™ reagent (peqLab, Erlangen, Germany) or the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturers' instructions. The cDNA was amplified from total RNA using a primer to the 3'-UTR of the *ADAM9* gene and Omniscript reverse transcriptase (Qiagen). Exon-overlapping PCR products were purified from agarose gels (Illustra GFX PCR DNA and gel

exons 15 and 16, in affected dogs leading immediately to a premature stop codon (EMBL accession: FR667708). Exon–exon boundaries are indicated in lower case and additionally shaded in light yellow in case of the cDNA of affected dogs. Last and first nucleotide of exon 14 and 17, respectively are marked in red. The exon 15/16 deletion is shaded in light grey. H Haematoxylin–eosin (HE)-stained paraffin section of the entire retina at the level of the optic disc (od) of a 10.5 year-old gPRA-affected GIT. Several sections of peripheral and central retinal areas (I–P) are marked by arrows and shown in higher magnification. I In outer-most peripheral areas close to the ora serrata (os) the affected retina shows complete loss of all retinal layers and numerous pigment deposits (×). K The depicted area lacks rhodopsin signal. L In adjacent peripheral areas remnants of photoreceptors (arrows) and retinal layers are detected. M The extremely shortened photoreceptors (arrows) and the thin line of outer nuclear layer (ONL) are rhodopsin-immuno-positive. N In the central retina all layers are clearly identified in the HE-stained section, but the preservation of the retinal layers varies. In some areas the ONL is thin and the photoreceptors (PR) are disorganized and shortened. O Calbindin-immuno-staining in regions with a thin ONL shows regular staining of the horizontal cells (arrowheads) in the inner nuclear layer (INL) and their processes in the outer plexiform layer (OPL). P In other central areas the inner segments (IS) of the photoreceptors are better preserved, and rods and cones are clearly distinguishable in the HE section. Inner plexiform layer (IPL); ganglion cell layer (GCL); bar in H = 1 cm; bar in M for I–P = 20 μm. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

band purification kit, GE Healthcare, Freiburg, Germany) and analysed directly on a capillary DNA sequencer MegaBACE 1000 (GE Healthcare).

2.7. Quantitative reverse transcription real-time PCR (qPCR) analysis

For qPCR, total RNA from the retinae of a gPRA-affected GIT and a healthy Saarloos Wolfhound as well as from muscle tissue (Saarloos Wolfhound) was reverse-transcribed into cDNA using High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) according to the manufacturer's instructions. The qPCR was performed using my-Budget 5xEvaGreen QPCR Mix II (ROX; Bio-Budget Technologies, Krefeld, Germany), as described by the manufacturer with the one-step-plus RT-PCR detection system (Applied Biosystems). In order to avoid amplification from potentially contaminating genomic DNA, the primers spanned intron/exon boundaries. Baseline and threshold values were set automatically and threshold cycle (CT) values were determined using one-step-plus software (Applied Biosystems). Relative RNA expression was calculated using the $\Delta\Delta$ -CT method [25] with normalization to the house keeping gene *GAPDH*.

2.8. Histology and immunohistochemistry

The enucleated eye from the gPRA-affected GIT was fixed in 4% paraformaldehyde for 3 days, cut sagittally at the level of the optic nerve and washed in phosphate-buffered saline for 4 h. The eye was embedded in paraffin, cut serially into 15 μ m-sections, mounted on Superfrost Plus slides (Menzel, Braunschweig, Germany) and dried at 40 °C. Every 10th section was stained with haematoxylin–eosin (HE) for subsequent morphological reference. For a further evaluation of the integrity of the retina, other sections were immunostained employing a previously described protocol [6]. The sections were incubated with a monoclonal anti-rhodopsin antibody (MAB5316, Chemicon, Temecula, CA 92590, USA; 1:5000 dilution) in order to assess the integrity of photoreceptors. Alternatively, a polyclonal anti-calbindin D-28k antibody (CodeNo. Cb-38a, Swant, Belinzona, Switzerland; 1:10000 dilution) was used for the staining of horizontal cells.

3. Results

3.1. Mapping the gPRA locus and identification of an *ADAM9* partial deletion

Genome-wide SNP array genotyping was performed on 12 gPRA-affected GITs and 12 control dogs of different breeds using the Affymetrix Canine Genome 2.0 Array covering ~50,000 SNPs. Autozygosity mapping revealed 9 homozygous regions on 6 different chromosomes. The highest score of homozygosity was revealed on CFA16 from 24.7 to 29.9 Mb (Fig. 1B), a region showing synteny to chromosome 8 of humans (8p11.22).

3.2. Fine mapping and mutation detection

Prior to fine mapping of the candidate region 24.7–29.9 Mb on CFA16, 3 microsatellite markers were used to establish an approximate localization. None of these markers was identified as a tightly trait-linked marker in GITs. Additional fine mapping with 8 microsatellite markers in this candidate region on CFA16 revealed a homozygous state of one marker (16FK28.58) for all affected dogs from 3 pedigrees comprising 33 healthy and gPRA-affected GITs, with a LOD score of 3.71 ($\theta = 0.000$). In order to narrow the candidate region and to exclude recombination events, 13

additional SNPs were genotyped. These SNP markers revealed cross-over events at 27.76 Mb and 29.50 Mb, delimiting a region containing the following genes: *ADAM9*, *ADAM32*, *ADAM5P*, *ADAM2*, *ADAM18*, *ADAM3a*, *IDO2*, *IDO1*, *C8orf4*, *ZMAT4* (Fig. 1C). Comparisons with the RetNet database (<http://www.sph.uth.tmc.edu/retnet/>) revealed *ADAM9* (Fig. 1D) as a candidate gene, because mutations herein have been described to cause CRD in humans [18].

Comparisons within data in public databases revealed a gap region in IVS3 of canine *ADAM9* sequence. Among other regions, the sequence of this gap as well as the region next to exon 4 was analysed. The missing DNA sequence of IVS3 could be identified by long-range PCR. However, the last 213 bp of this intron as well as the first 4 bp of exon 4 (Fig. 1E), including its splice donor site identified here, differed from the canine reference sequence in the NCBI database. Additional comparisons indicated that IVS3 of *ADAM9* harbours many repetitive sequence elements. Sequence analysis of *ADAM9*, including exon–intron boundaries, revealed a homozygous deletion of exons 15 and 16 in a gPRA-affected GIT. PCR-based screening of exons 15 and 16 in 443 dogs of 34 different breeds (including 60 gPRA-affected dogs) and two wolves proved the presence of these two exons. Mutation screening in all 170 GITs investigated here, which predominantly belonged to a large pedigree with multiple inter-breeding events, identified 49 (28.8%) and 75 GITs (44.1%) which were homozygous and heterozygous, respectively, for the deletion. The mutation carrier frequency was ~50% in this population. In 25 GITs typed to be homozygous for the deletion, gPRA has not yet been confirmed phenotypically.

In order to determine the genomic size of the *ADAM9* deletion, the recombination breakpoints in IVS14 and IVS16 were analysed by PCR-amplification employing various primer sets. Through UCSC database comparisons, a 1,298 bp region was identified in IVS14 (chr16:29422131–29423428) that is virtually almost identically repeated in IVS16 (chr16:29398910–29400207). Between these direct repeats, the unequal recombination event has apparently occurred to produce the deleted allele. The DNA sequences of the deleted and the non-mutated regions revealed no sequence differences. Thus, the exact breakpoint cannot be pin-pointed within this duplicated region. Therefore, the deletion comprised a maximum of 24,712 bp.

3.3. Haplotype analysis

This analysis in the region surrounding the *ADAM9* mutation (27.76–30.02 Mb) was performed using 12 informative markers from a total of 21. Two microsatellites were typed as monomorphic and 7 SNPs were either homozygous for all GITs investigated or represented rare variants that were not present in the GITs. In the pedigrees investigated, key cross-over events were identified by microsatellites at 27.84 Mb, 29.5 Mb and 29.39 Mb, the latter being localized in IVS1 and IVS16 of *ADAM9* gene, respectively (Fig. 2).

3.4. cDNA analyses of the candidate gene *ADAM9*

The alignment of canine and human *ADAM9* cDNAs revealed a homology of 92%. The cDNA analysis confirmed the expression of the newly identified exon 4, which was inconsistent with information available from the NCBI database. Comparison of retinal cDNA from a gPRA-affected GIT and an unaffected Saarloos Wolfhound revealed complete exon-skipping of exons 15 and 16 of the *ADAM9* gene only in the gPRA-affected GIT. Similarly, in the affected GIT, exons 15 and 16 were also absent from muscle tissue. In cDNA prepared from blood from a healthy Weimaraner, *ADAM9* exons 15 and 16 were present. In addition, a region encoding a novel *ADAM9* alternative cDNA transcript without exon 12 (EMBL accession: FR667707) was identified in blood and muscle tissue from healthy

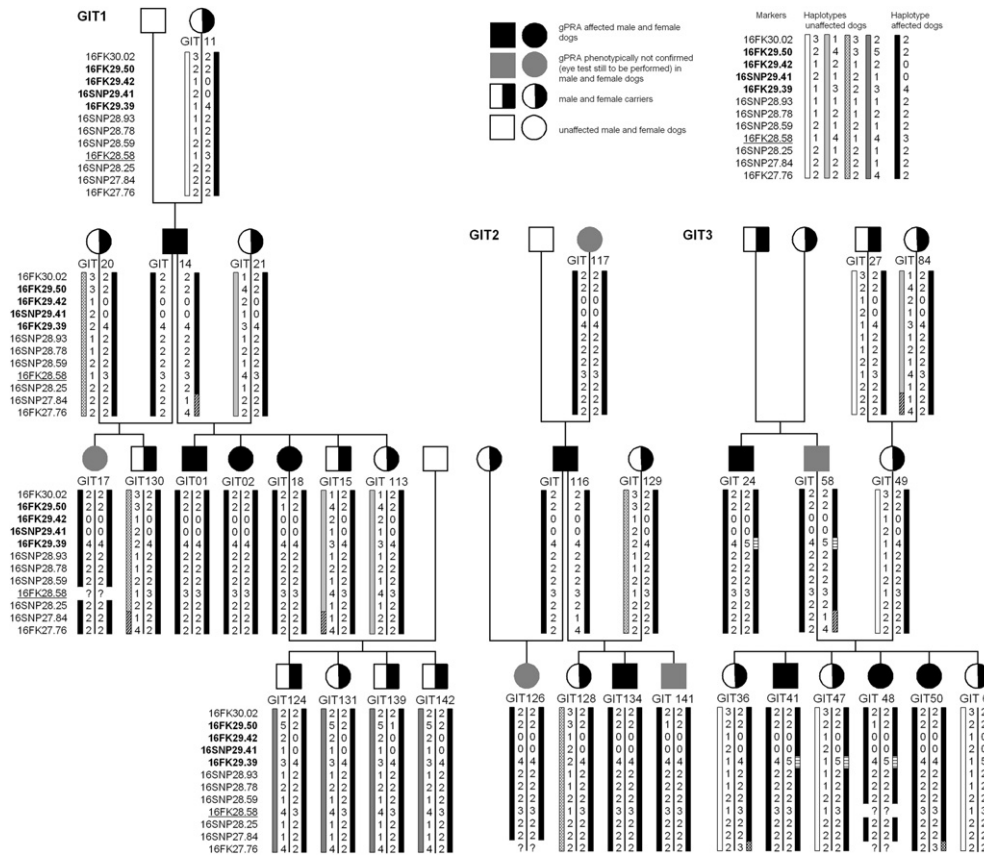


Fig. 2. Haplotype analysis using 12 fine-mapping markers in a homozygous candidate region of chromosome 16 in Irish Glen of Imaal Terrier (GIT) pedigrees in which gPRA segregated. Microsatellite markers were used for identification of recombination breakpoints as indicated by different shading patterns. Bold type markers are located in the *ADAM9* gene. The underlined marker (16FK28.58) refers to the gPRA-linked marker showing a LOD score of 3.71 ($\theta = 0.000$). Distinct marker alleles are indicated by numbers (1–5), ‘0’ accounts for the deleted allele. As indicated (?), several markers could not be typed even after several trials.

dogs but not in the retina. The cDNA sequence for *ADAM9* identified in the healthy dog comprised 2460 bp encoded by 22 exons and is inferred to encode a protein of 819 amino acids (aa) (Fig. 1F). The conceptual translation of the cDNA from the affected dog led to a premature stop codon at position c.1599 in exon 17, resulting in a truncated protein of 534 aa (c.1592_1881del p.Lys531AsnfsX2).

3.5. Expression levels, assessed by qPCR analysis

From the data of the EST database (www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene) it can be concluded that the *ADAM9* gene is expressed in a wide range of tissues. Using qPCR, cDNAs were amplified from retinal RNAs from gPRA-affected GITs and a healthy dog as well as from muscle tissue from a healthy dog. RNA expression of *ADAM9* exons 15 and 16 in the retina from the affected GIT was used as a negative control. The retina-specific expressed gene *GNAT1* served as positive control for retinal expression and could be shown to be highly expressed in the retina from the non-affected dog but not in muscle tissue. As indicated, RNA expression of *GNAT1* in the gPRA-affected GIT was decreased as compared with the non-affected dog. Similarly, *CCDC66*, and *ADAM9* expression levels were reduced in the gPRA-affected GIT with highest reduction of *ADAM9* expression compared to the healthy dog (Fig. 3).

3.6. Histology and immunohistochemistry

Retinal degeneration of the gPRA-affected GIT was investigated in HE-stained sections over the entire retina (Fig. 1H). Exclusively

a small hem of the peripheral retina, close to the ora serrata, exhibited a total loss of retinal structure and showed large pigment deposits (Fig. 1I). These completely degenerated areas lacked rhodopsin (Fig. 1K). In adjacent peripheral areas, remnants of retinal layers were detected (Fig. 1L) with rhodopsin-positive, shortened photoreceptors and some outer nuclear cells (Fig. 1M). For the mid-central and central retina, most areas showed preserved layers with varying degrees of degeneration (Fig. 1N–P). Regions close to the optic disc often displayed reduced and disorganized photoreceptors with a thin outer nuclear layer (Fig. 1N), whereas, in corresponding central areas, nuclear layers were thicker and the photoreceptors readily detectable, having clearly distinguishable rods and cones, as documented in HE-stained sections (Fig. 1P). Calbindin-immuno-staining revealed regular staining of horizontal cells and their processes (Fig. 1O).

4. Discussion

In the present study, autozygosity mapping, based on canine genome-wide SNP arrays, was applied to map the causative mutation for gPRA in affected GITs. Previously obtained unpublished results from microsatellite-based linkage screening of several hundred genome-wide spread markers with our gPRA-specific extended MSS-2 set had failed to localize the gPRA region for this canine breed. Evidently, SNP arrays provide a superior marker coverage than microsatellite sets [26]. Hence, these tools were used successfully in order to map canine disease loci for distinct recessive disorders in previous studies [17,27–29].

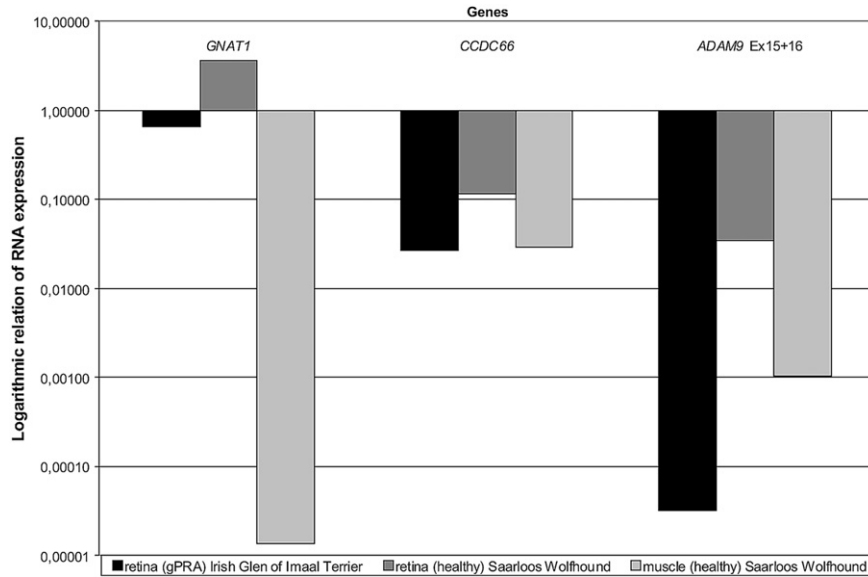


Fig. 3. Expression analysis by qPCR of different genes in the retinae of a gPRA-affected Irish Glen of Imaal Terrier and a healthy Saarloos Wolfhound as well as in muscle of a healthy Saarloos Wolfhound. Expression levels were normalized with reference to the house keeping gene *GAPDH*.

Autozygosity mapping is an effective method to map rare, recessive diseases, including gPRA, in inbred populations [30]. The GIT comprises a limited gene pool due to the founder effect and the low registration rate (<100) of new puppies each year [31].

After mapping gPRA to a region of ~5 Mb on CFA16, we identified a large deletion, including 2 exons, in the candidate gene *ADAM9* in gPRA-affected and carrier GITs in homozygous and heterozygous states, respectively. This gene is a member of the ADAM protein family, a group of metalloproteases which belong to the zinc protease superfamily. This family comprises membrane-anchored glycoproteins which are characterized by a N-terminal pro-domain, followed by a metalloprotease domain, a disintegrin motif and a cysteine-rich region, an epidermal-growth factor (EGF) repeat, a trans-membrane domain and a cytoplasmic tail with potential SH3 ligand domains [32]. ADAM proteins are involved in fertilization, myogenesis, neurogenesis and protein ecto-domain shedding [33]. In humans, 19 *ADAM* genes have been described [34]. Mutations in *ADAM9* have been identified to cause human CRD [18]. The protein ADAM9 is a catalytically active metalloprotease-disintegrin and involved in diverse processes [38]. ADAM9 is ubiquitously expressed in diverse human tissues and highly conserved between humans and mice [32]. ADAM9 orthologues do not exist in the invertebrates *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans*, implying particular functional significance in vertebrates [39], including the eye [18]. As published previously, ADAM9 function is associated with cones or regions of high photoreceptor density [18]. The present qPCR results support these findings indirectly in that there was a lack of significant *ADAM9* expression in the gPRA-affected GITs as compared with *CCDC66* expression. The latter gene is predominately located in the inner segments of photoreceptors [6]. In contrast, reduction of RNA expression of *GNAT1*, which is specific to outer segments of rod photoreceptors, is decreased to a minor degree in the gPRA-affected GIT when compared to the relative reduction in *ADAM9* expression. This indicates that, in respect of the very late onset of gPRA in GITs, rods are still present in the GIT investigated in this study.

The identified deletion in *ADAM9* was not present in any of 34 other canine breeds investigated, indicating that the deletion may be specific to GITs. Retinal cDNA analysis confirmed that both exons are expressed in healthy dogs but not in gPRA-affected GITs.

The deletion of exons 15 and 16 leads to a frame shift, resulting in a premature stop codon and, consequently, in a truncated protein of 534 aa. Thus, the presumptive truncated ADAM9 protein in the GIT breed contains a signal peptide, metalloprotease and disintegrin domain and only the first 29 aa of the cysteine-rich domain. The cysteine-rich domain of ADAM9 protein is responsible for cell adhesion [35] and cell fusion [36] which, consequently, are impaired when only a truncated form of ADAM9 protein is present. The deletion in *ADAM9* gene comprised a maximum of 24,712 bp. It was not possible to accurately size the deletion, because the recombination breakpoints were localized in duplicated, highly homologous DNA elements in IVS14 and IVS16. Here, the DNA sequence identity exceeded 97%, obviously favouring recombination via unequal crossing-over [37].

The exon 15/16 deletion was predominantly detected in gPRA carriers and affected GITs, but this mutation was also identified in homozygous state in 25 of 170 GITs investigated, in which the gPRA had not yet been confirmed by expert eye testing. The relationship information for the pedigrees was not questioned, based on the molecular genetic testing using many DNA markers. After renewed consultations with the keepers, clinical signs were recorded at 6–9 years of age in four of these GITs homozygous for the gPRA mutation. The earliest gPRA signs in the GIT population investigated were obvious in a ~2-year-old GIT. Thus, the time of onset of gPRA in this breed was inferred to vary from 2 to 9.5 years of age. A possible explanation for such phenotypic variability includes functional compensation and/or yet unstudied disease-modifier genes. Such modifier genes could encode other members of the ADAM family or additional functional compensatory proteins. In this context, it is noteworthy that ADAM knock-out mice develop normally, are viable and fertile, and show only a mild and very late retinal disease phenotype [18,39]. In addition, cases of incomplete penetrance in recessively transmitted diseases have been described, for example, for cystic fibrosis [40] and in patent ductus arteriosus (PDA), a congenital heart disease in humans [41].

In conclusion, the mechanisms of functional preservation in homozygously deleted GITs at advanced age have yet to be clarified. Hence, a diagnostic test has been established, that clearly distinguishes between GITs at risk of acquiring gPRA symptoms (deletion in the homozygous state) versus those without risk of developing

disease (heterozygous and homozygous wild-type). However, the test does not predict the time of onset of disease. Therefore, dogs harbouring the mutation in homozygous state would have a relatively high risk to develop gPRA, but the variable disease onset could appear at an advanced age and symptoms would not become phenotypically evident. In this context, the number of GITs that died early, because of cancer, is relatively high in the population investigated herein.

Acknowledgements

The authors thank the 'Gesellschaft zur Förderung Kynologischer Forschung e.V.' for funding as well as Huub van Benthum, Theo Peters, Jean Rogers and Stefanie Blänkner. We are grateful to Hans-Werner-Habbes, Marlen Löbbecke-Schumacher and Katja Rumbach for expert technical assistance. Moreover, we thank breeding associations, breeders and dog owners for supporting this study by providing blood samples. We also thank all veterinarians, particularly Dr Bedford from the UK, for ophthalmoscopy of most GITs investigated in this study.

References

- Petersen-Jones SM. A review of research to elucidate the causes of the generalized progressive retinal atrophies. *Vet J* 1998;155(1):5–18.
- Petersen-Jones S. Advances in the molecular understanding of canine retinal diseases. *J Small Anim Pract* 2005;46(8):371–80.
- Acland GM, Ray K, Mellersh CS, Langston AA, Rine J, Ostrander EA, et al. A novel retinal degeneration locus identified by linkage and comparative mapping of canine early retinal degeneration. *Genomics* 1999;59(2):134–42.
- Clements PJ, Gregory CY, Peterson-Jones SM, Sargan DR, Bhattacharya SS. Confirmation of the rod cGMP phosphodiesterase beta subunit (PDE beta) nonsense mutation in affected rcd-1 Irish setters in the UK and development of a diagnostic test. *Curr Eye Res* 1993;12(9):861–6.
- Dekomien G, Runte M, Godde R, Epplen JT. Generalized progressive retinal atrophy of Sloughi dogs is due to an 8-bp insertion in exon 21 of the PDE6B gene. *Cytogenet Cell Genet* 2000;90(3–4):261–7.
- Dekomien G, Vollrath C, Petrasch-Parwez E, Boeve MH, Akkad DA, Gerding WM, et al. Progressive retinal atrophy in Schapendoes dogs: mutation of the newly identified CCDC66 gene. *Neurogenetics* 2009;11(2):163–74.
- Kijas JW, Cideciyan AV, Aleman TS, Pianta MJ, Pearce-Kelling SE, Miller BJ, et al. Naturally occurring rhodopsin mutation in the dog causes retinal dysfunction and degeneration mimicking human dominant retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(9):6328–33.
- Kijas JW, Miller BJ, Pearce-Kelling SE, Aguirre GD, Acland GM. Canine models of ocular disease: outcross breedings define a dominant disorder present in the English mastiff and bull mastiff dog breeds. *J Hered* 2003;94(1):27–30.
- Kukekova AV, Goldstein O, Johnson JL, Richardson MA, Pearce-Kelling SE, Swaroop A, et al. Canine RD3 mutation establishes rod-cone dysplasia type 2 (rcd2) as ortholog of human and murine rd3. *Mamm Genome* 2009;20(2):109–23.
- Mellersh CS, Boursnell ME, Pettitt L, Ryder EJ, Holmes NG, Grafham D, et al. Canine RPRIP1 mutation establishes cone-rod dystrophy in miniature longhaired dachshunds as a homologue of human Leber congenital amaurosis. *Genomics* 2006;88(3):293–301.
- Petersen-Jones SM, Entz DD, Sargan DR. cGMP phosphodiesterase-alpha mutation causes progressive retinal atrophy in the Cardigan Welsh corgi dog. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40(8):1637–44.
- Wiik AC, Wade C, Biagi T, Ropstad EO, Bjerkas E, Lindblad-Toh K, et al. A deletion in nephronophthisis 4 (NPHP4) is associated with recessive cone-rod dystrophy in standard wire-haired dachshund. *Genome Res* 2008;18(9):1415–21.
- Zangerl B, Goldstein O, Philp AR, Lindauer SJ, Pearce-Kelling SE, Mullins RF, et al. Identical mutation in a novel retinal gene causes progressive rod-cone degeneration in dogs and retinitis pigmentosa in humans. *Genomics* 2006;88(5):551–63.
- Zeiss CJ, Ray K, Acland GM, Aguirre GD. Mapping of X-linked progressive retinal atrophy (XLPR), the canine homolog of retinitis pigmentosa 3 (RP3). *Hum Mol Genet* 2000;9(4):531–7.
- Zhang Q, Acland GM, Parshall CJ, Haskell J, Ray K, Aguirre GD. Characterization of canine photoreceptor phosducin cDNA and identification of a sequence variant in dogs with photoreceptor dysplasia. *Gene* 1998;215(2):231–9.
- Osborn C. The native dogs of Ireland. Dublin: The Irish Kennel Club; 1984.
- Karlsson EK, Baranowska I, Wade CM, Salmon Hillbertz NH, Zody MC, Anderson N, et al. Efficient mapping of mendelian traits in dogs through genome-wide association. *Nat Genet* 2007;39(11):1321–8.
- Parry DA, Toomes C, Bida L, Danciger M, Towns KV, McKibbin M, et al. Loss of the metalloprotease ADAM9 leads to cone-rod dystrophy in humans and retinal degeneration in mice. *Am J Hum Genet* 2009;84(5):683–91.
- Lippmann T, Pasternack SM, Kraczyk B, Dudek SE, Dekomien G. Indirect exclusion of four candidate genes for generalized progressive retinal atrophy in several breeds of dogs. *J Negat Results Biomed* 2006;5:19.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16(3):1215.
- Seelow D, Schuelke M, Hildebrandt F, Nurnberg P. HomozygosityMapper – an interactive approach to homozygosity mapping. *Nucleic Acids Res* 2009;37(Web Server issue):W593–9.
- Jagiello P, Gencik M, Arning L, Wiczorek S, Kunstmann E, Csernok E, et al. New genomic region for Wegener's granulomatosis as revealed by an extended association screen with 202 apoptosis-related genes. *Hum Genet* 2004;114(5):468–77.
- Guyon R, Lorentzen TD, Hitte C, Kim L, Cadieu E, Parker HG, et al. A 1-Mb resolution radiation hybrid map of the canine genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(9):5296–301.
- Dekomien G, Epplen JT. The canine Recoverin (RCV1) gene: a candidate gene for generalized progressive retinal atrophy. *Mol Vis*; 2002:8436–41.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} method. *Methods* 2001;25(4):402–8.
- Kruglyak L. The use of a genetic map of biallelic markers in linkage studies. *Nat Genet* 1997;17(1):21–4.
- Drogemuller C, Becker D, Brunner A, Haase B, Kircher P, Seeliger F, et al. A missense mutation in the SERPINH1 gene in Dachshunds with osteogenesis imperfecta. *PLoS Genet* 2009;5(7):e1000579.
- Drogemuller C, Karlsson EK, Hytonen MK, Perloski M, Dolf G, Sainio K, et al. A mutation in hairless dogs implicates FOXI3 in ectodermal development. *Science* 2008;321(5895):1462.
- Salmon Hillbertz NH, Isaksson M, Karlsson EK, Hellmen E, Pielberg GR, Savolainen P, et al. Duplication of FGF3, FGF4, FGF19 and ORAOV1 causes hair ridge and predisposition to dermoid sinus in Ridgeback dogs. *Nat Genet* 2007;39(11):1318–20.
- Lander ES, Botstein D. Homozygosity mapping: a way to map human recessive traits with the DNA of inbred children. *Science* 1987;236(4808):1567–70.
- Lindblad-Toh K, Wade CM, Mikkelsen TS, Karlsson EK, Jaffe DB, Kamal M, et al. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature* 2005;438(7069):803–19.
- Weskamp G, Kratzschmar J, Reid MS, Blobel CP. MDC9, a widely expressed cellular disintegrin containing cytoplasmic SH3 ligand domains. *J Cell Biol* 1996;132(4):717–26.
- Schlondorff J, Blobel CP. Metalloprotease-disintegrins: modular proteins capable of promoting cell–cell interactions and triggering signals by proteolytic domain shedding. *J Cell Sci* 1999;112(Pt 21):3603–17.
- Seals DF, Courtneidge SA. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev* 2003;17(1):7–30.
- Zigrino P, Steiger J, Fox JW, Loffek S, Schild A, Nischt R, et al. Role of ADAM-9 disintegrin-cysteine-rich domains in human keratinocyte migration. *J Biol Chem* 2007;282(42):30785–93.
- Namba K, Nishio M, Mori K, Miyamoto N, Tsurudome M, Ito M, et al. Involvement of ADAM9 in multinucleated giant cell formation of blood monocytes. *Cell Immunol* 2001;213(2):104–13.
- Stankiewicz P, Lupski JR. Molecular-evolutionary mechanisms for genomic disorders. *Curr Opin Genet Dev* 2002;12(3):312–9.
- Deuss M, Reiss K, Hartmann D. Part-time alpha-secretases: the functional biology of ADAM 9, 10 and 17. *Curr Alzheimer Res* 2008;5(2):187–201.
- Weskamp G, Cai H, Brodie TA, Higashiyama S, Manova K, Ludwig T, et al. Mice lacking the metalloprotease-disintegrin MDC9 (ADAM9) have no evident major abnormalities during development or adult life. *Mol Cell Biol* 2002;22(5):1537–44.
- Thauvin-Robinet C, Munck A, Huet F, Genin E, Bellis G, Gautier E, et al. The very low penetrance of cystic fibrosis for the R117H mutation: a reappraisal for genetic counselling and newborn screening. *J Med Genet* 2009;46(11):752–8.
- Mani A, Meraji SM, Houshyar R, Radhakrishnan J, Mani A, Ahangar M, et al. Finding genetic contributions to sporadic disease: a recessive locus at 12q24 commonly contributes to patent ductus arteriosus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(23):15054–9.



ORIGINAL ARTICLE

On ancestors of dog breeds with focus on Weimaraner hunting dogs

R. Kropatsch¹, K. Streitberger², T. Schulte-Middelmann¹, G. Dekomien¹ & J.T. Epplen¹

¹ Human Genetics, Ruhr University, Bochum, Germany

² Institute of Systematic Zoology and Evolutionary Biology with Phyletic Museum, Friedrich-Schiller-University, Jena, Germany

Keywords

Ancestors; canine breeds; mtDNA; polymorphisms; Y chromosome.

Correspondence

R. Kropatsch, Human Genetics, Ruhr University, Universitätsstrasse 150, 44801 Bochum, Germany. Tel: +49 234 322 5764; Fax: +49 234 321 4196; E-mail: regina.kropatsch@rub.de

Received: 15 September 2009; accepted: 25 March 2010

Summary

Paternally inherited Y chromosomal markers and maternally inherited mitochondrial (mt) DNA sequences were investigated in 27 dog breeds (*Canis familiaris*), of which the Weimaraner hunting dog was studied in greater detail. Altogether, nine potentially polymorphic markers of the Y chromosome were examined as well as parts of the canine mt genome (1947 base pairs) in 111 male dogs and four wolves for comparison. Twenty Y chromosomal and fifty-nine mitochondrial DNA (mtDNA) haplotypes were identified in the canine breeds and wolves. In 34 Weimaraners, four distinct Y chromosomal haplotypes were observed as well as three mtDNA types thus reflecting at least four male and three female ancestors for the current population in Germany. Tracing patri- and matrilineages, several entries in the Weimaraner stud book cannot be reconciled with the male-only, Y chromosomal neither the female-only, mt inheritance patterns, respectively. The investigated breeds represent 9 of 10 groups defined by the *Fédération Cynologique Internationale* (FCI). The level of Y chromosomal and especially mtDNA diversity was immense considering the relatively small number of individuals investigated per breed. Unique haplotypes were found only in a few breeds and the wolf. Other haplotypes were shared among several breeds, also across different FCI groups, suggesting that these canine breeds had common male and female ancestors.

Introduction

Dogs (*Canis familiaris*) exhibit immense variability in phenotypic traits such as size, shape, coat colour, conformation and behaviour, resulting from selection as enforced during breed creation in recent centuries (Parker *et al.* 2004; Lindblad-Toh *et al.* 2005; Sundqvist *et al.* 2006). In fact, dogs have become the most phenotypically diverse of all domesticated animal species: More than 400 distinct breeds are known worldwide, 350 are currently registered by the *Fédération Cynologique Internationale* (FCI). These breeds have been clustered in 10 groups of related breeds according to their geographic origin, morphology or function in human

activities. As hunting dog, originally designated Weimar pointer, the Weimaraner is categorized in FCI group 7, the pointing dogs, comprising 36 breeds from 12 different countries providing the standards. The Weimaraner represents a comparatively old breed of hunting dogs originating in Germany, where the first breed standard was established in 1878 (Schmidt 1989). This breed consists of two varieties (Schrameyer *et al.* 2005) distinguished by their coat types, the more common short-hair (SH) and the long-hair variety (LH). Weimaraners are bred to fulfil the many needs of the central European hunter and represent an interesting model for genetic investigations into working dogs.

Phylogenetic analyses indicate that purebred dogs were domesticated from their wild ancestor, the grey wolf (*Canis lupus*), ~15 000 years ago (Olsen 1985; Vila *et al.* 1997; Savolainen *et al.* 2002; Boyko *et al.* 2009) in southern China (Pang *et al.* 2009). Dogs are investigated genetically not only concerning their geographic origins (Savolainen *et al.* 2002) but also concerning evolution (Vila *et al.* 1997) and backcrossing with wild canids (Vila *et al.* 2005). In general, these population genetic studies have mainly been based on analyses of mitochondrial DNA (mtDNA) with its maternal pattern of inheritance. This allows for conclusions regarding maternal gene flow and phylogenetic relationships within and among breeds, and wild canids. In addition, several Y chromosome analyses have been published (Bannasch *et al.* 2005; Sundqvist *et al.* 2006; Parra *et al.* 2008) which reflect evolutionary events in the paternal lineages of dog breeds.

Recent studies based on autosomal microsatellites identified a high level of heterogeneity across all examined breeds including the Weimaraner (Irion *et al.* 2003; Schrammeyer *et al.* 2005). Yet because of comparatively high mutation rates, autosomal markers are less useful for phylogenetic analyses (Irion *et al.* 2003), and they are not informative regarding questions of male or female ancestors. Apart from genetic variations within and among breeds, analyses of Y chromosomal and mtDNA haplotypes could also provide information on sex-specific contributions at the time of breed origin. Therefore, we examine here genetic relationships in a cohort of 34 male German Weimaraners based on both mtDNA and Y chromosomal markers to estimate minimal numbers of male and female ancestors. Simultaneously, the accuracy of (historical) stud books can be evaluated in this respect. For comparison, we investigated the same marker set in 26 additional dog breeds representing 9 of the 10 FCI groups and four wolves.

Material and methods

Sample collection

The study population comprised 111 male individuals and two female controls representing 27 canine breeds from 9 of 10 FCI groups (group 1: Australian Cattle Dog, Berger des Pyrénées, Kuvasz, Saarloos Wolfhound, Schapendoes; group 2: Dobermann, Entlebucher Mountain Dog, Tibetan Mastiff, Shar Pei, German Pinscher, Miniature Schnauzer, Standard Schnauzer, Giant Schnauzer; group 3: Airedale

Terrier; group 4: Dachshunds; group 5: Chow Chow; group 7: Irish Setter, Large Munsterlander, Weimaraner; group 8: Cocker Spaniel, Golden Retriever, Labrador Retriever; group 9: Miniature Poodle, Tibetan Terrier; group 10: Borzoi, Saluki, Sloughi) as well as four wolf specimen from a free-ranging population in Romania. Thirty-four male Weimaraners (11 SH and 23 LH) of different German stud book lines from a previous study (Schrammeyer *et al.* 2005) were characterized for Y chromosomal markers and mtDNA. Simultaneously, 77 additional sires were investigated representing 26 breeds (average: three individuals per breed) and four grey wolves. Blood samples were received from the owners of the animals in cooperation with breeding clubs. Genomic DNA was isolated from peripheral blood cells according to standard protocols (Miller *et al.* 1988).

Markers and DNA amplification

Nine canine markers located on the Y chromosome were selected. Five Single nucleotide polymorphisms (SNPs) (Natanaelsson *et al.* 2006) and four microsatellites (Bannasch *et al.* 2005; Natanaelsson *et al.* 2006) were amplified with different primers (Table S1) by PCR in a thermocycler (Biometra, Göttingen, Germany). For SNP amplification, a 10 μ l PCR reaction mixture containing 50 ng DNA in GeneCraft 1 \times PCR buffer, 0.5 U Taq Polymerase (Genecraft, Münster, Germany), 0.2 mM of each dNTP, 10 pM of each primer and varying concentrations of MgCl₂ was run in 96-well microtiter plates (Thermowell Costar, Corning, NY, USA). PCRs were performed under standard PCR conditions (Dekomien & Eppelen 2002) of 59°C annealing temperature and 30 cycles in a thermocycler (Biometra). PCR products were digested depending on the SNP-containing sequence with different restriction enzymes (Table S1). The presence of SNP alleles was checked by analysing PCR products with agarose gel electrophoresis and by staining with ethidium bromide.

The 'tailed primer PCR' was used for microsatellite typing (Jagiello *et al.* 2004). This method requires three oligonucleotides for amplification: a tailed forward primer (tailed F), a reverse primer and a fluorescence-labelled primer (labelled F) corresponding to the 5'-tail sequence of tailed F. PCR conditions were the same as for SNP amplification except for the primer concentrations which were as follows: 0.2 pmol tailed F; 2.5 pmol labelled F and 2.5 pmol reverse primer. PCRs for microsatellite amplification were also performed under standard

PCR conditions (Dekomien & Eppelen 2002) of 60°C annealing temperature and 30 cycles in a thermocycler (Biometra). Electrophoreses were run using GE Healthcare standard protocols for genotyping on the automated capillary DNA sequencer (MegaBACE 1000; GE Healthcare, Freiburg, Germany). PCR products of the microsatellite markers were diluted (each 1:10), and 2 µl of this dilution was mixed with 0.5 µl of MegaBACE_{TM} ET-R Size Standard and 2.5 µl loading solution (70% formamide, 1 mM EDTA). The alleles observed for each microsatellite were sized and scored using the MegaBACE Fragment Profiler software version 1.2 (GE Healthcare).

Mitochondrial DNA and sequencing

For mtDNA sequencing, a fragment of the canine mtDNA (NCBI accession number U96639; 1947 bp) comprising the *ATP synthase subunit 6* gene, a segment from the 3' end of the *ATP synthase subunit 8* gene, a portion at the 5' end of *cytochrome c oxidase subunit 3* gene, part of the *cytochrome b* gene including the 3' end and a portion of the canine mt D-loop sequence (15458–16124 bp) was amplified using different pairs of primers (Table S2). In addition to the highly variable mt D-loop sequence, conserved mt coding regions were investigated as internal control and to confirm different substitution rates identified for these regions. Sequencing reactions were carried out by the dideoxy chain termination method using the Dyanamic ET Terminator kit (GE Healthcare) according to the manufacturer's instructions. Sequences were run on an automated capillary DNA sequencer (MegaBACE 1000; GE Healthcare). Sequences were edited, assembled and aligned using the program SeqMan (DNASTar, Madison, WI, USA). For mt D-loop amplification, the primer sequences of Parra *et al.* (2008) were employed. The NCBI database was used for all mtDNA sequence comparisons with published sequences.

Statistical analyses

Genealogical relationships among Y chromosomal and mtDNA haplotypes identified in 27 breeds and four wolves were estimated by constructing phylogenetic networks based on the statistical parsimony method (Templeton *et al.* 1992) by using the software TCS 1.21 (Clement *et al.* 2000). The connection limit was set to 95% which allowed connections for up to 15 and 18 steps for Y chromosomal and mtDNA haplotypes, respectively.

Results

Y chromosomal and mtDNA variability in Weimaraners

Y chromosomal polymorphisms as well as mtDNA sequences were initially investigated to gauge the accuracy of historic stud book information of the current Weimaraner population in Germany. Analysis of Y chromosomal markers revealed that three of nine markers were monomorphic in 34 male Weimaraners. We identified four Y chromosomal haplotypes or patrilineages, with haplotype Y2 being the most frequent (50%) across all Weimaraners (Table 1). Two patrilineages (Y1, Y3) were unique to SH Weimaraners. In addition, three different mtDNA haplotypes or matrilineages were identified, two of these (M1, M2) were only observed in this breed, with haplotype M1 being most frequent (67.7%; Table 1). Haplotype M2 differs from M3 only in a single position (nucleotide 8479) in the *ATP synthase subunit 6* gene. This exchange appears to be unique to Weimaraners, as has been underscored by extensive database searches. Concerning the accuracy of old Weimaraner stud book information, we identified inconsistencies in a few matri- and patrilineages where historical records cannot be reconciled with the inferred relationships based on Y and mt haplotype data.

Alignments of mt D-loop sequences from pointer breeds investigated in this study (Weimaraner, Large Munsterlander) and several pointing dog breeds from Spain (German Shorthaired Pointer, Deutsch Drahthaar, Epagneul Breton, English Pointer, English Setter; Parra *et al.* 2008) revealed diverse haplotypes, whereby altogether 25 polymorphic sites were identified in both studies (Table S3). We identified 14 nucleotide variations in mt D-loop sequences, which were not observed in pointer breeds from

Table 1 Haplotype distribution of Y chromosomal markers and mtDNA sequences as investigated in the Weimaraner breed. The Y chromosomal haplotypes consist of the marker combination *Ydog28-Ydog21-Ydog20-41B-MS650-MS466*

Haplotype	Y chromosomal (%)	mtDNA (%)
Y1	7 (20.6)	
Y2	17 (50.0)	
Y3	3 (8.8)	
Y4	7 (20.6)	
M1		23 (67.7)
M2		6 (17.6)
M3		5 (14.7)
Σ individuals	34	34

Spain. Five variable positions detected in Spanish pointer breeds (Parra *et al.* 2008) were not present in the two pointer breeds of our study.

Y chromosomal and mtDNA polymorphisms in various canine breeds

Six Y chromosomal polymorphisms were analysed in 77 male dogs representing 26 breeds in addition to Weimaraners. In total, 18 distinct haplotypes were observed (Table 2). Diversity in Y chromosomal haplotypes was evident across breeds, also among breeds of the same FCI group, with seven different haplotypes (38.9%) in FCI group 2 (eight breeds) and FCI group seven (three breeds), respectively (Table 2). Several Y haplotypes were shared among breeds of different FCI groups. Haplotype Y2 was observed in eight breeds of five different FCI groups (Table 2). In contrast, some Y chromosomal haplotypes were specific to a single breed. In total, eight breeds (the Berger des Pyrénées, Dobermann, Tibetan Mastiff, Shar Pei, Large Munsterlander, Weimaraner, Tibetan Terrier, Saluki) showed 10

unique haplotypes (56% of all haplotypes), as did the four wolves exhibiting two unique haplotypes (Table 2).

Haplotype parsimony networks based on different Y chromosomal markers resulted in a network with three loops and several multifurcations (Figure 1). Haplotype Y2 was calculated as root with the highest out-group weight. This haplotype was also identified to be the most frequent haplotype present in several different breeds, followed in frequency by haplotypes Y12 and Y13.

MtDNA sequencing revealed 84 variable positions in 1947 bp (Figures S1–S3) resulting in 55 distinct haplotypes for all investigated breeds (average 2 per breed). Eighty-two per cent of the different mtDNA haplotypes found in 65% of all dogs were specific for a single breed (Table 2). High genetic diversity of mtDNA sequences with 30 variable positions was also identified in the investigated wolves: four distinct mtDNA haplotypes in four animals. Thereof 13 sequence variations were exclusively identified in wolves and not in any dog breed studied here (data not shown).

Table 2 Distribution of mtDNA and Y chromosomal haplotypes defined in four wolves and 27 dog breeds according to *Fédération Cynologique Internationale* (FCI) grouping. Designations in bold type indicate unique haplotypes for a given breed investigated here. The most frequent haplotypes in the different FCI groups are underlined and/or italicized, respectively

FCI groups	Dog breed (<i>n</i> = 111)/wolves (<i>n</i> = 4)	mtDNA haplotypes	Y chromosomal haplotypes
1	Australian Cattle Dog (<i>n</i> = 2)	<u>M7</u> , M14	Y5
	Berger des Pyrénées (<i>n</i> = 3)	<u>M5</u> , M16 , M17	Y6
	Kuvasz (<i>n</i> = 3)	M27 , M28 , M29	<u>Y2</u> , Y4
	Saarloos Wolfhound (<i>n</i> = 6)	M4 , M39	Y8
	Schapendoes (<i>n</i> = 3)	M13, M41 , M42	<u>Y2</u> , Y15
2	Dobermann (<i>n</i> = 2)	M22 , M23	Y9
	Entlebucher Mountain Dog (<i>n</i> = 3)	<u>M6</u>	Y10
	Tibetan Mastiff (<i>n</i> = 1)	M37	Y14
	Shar Pei (<i>n</i> = 5)	M43 , M44 , M45 , M46 , M47	Y16
	German Pinscher (<i>n</i> = 3)	M11, M13, M38	Y12
	Miniature Schnauzer (<i>n</i> = 4)	M8, M10, M32 , M33	Y12, Y13
	Standard Schnauzer (<i>n</i> = 5)	M3, M34 , M35 , M36	Y13
3	Giant Schnauzer (<i>n</i> = 2)	<u>M7</u> , M12	Y4, Y13
	Airedale Terrier (<i>n</i> = 2)	M8, M12	<u>Y2</u>
4	Dachshund (<i>n</i> = 3)	<u>M6</u> , M10, M51	<u>Y10</u> , Y15
5	Chow Chow (<i>n</i> = 5)	M9, M19 , M20 , M21	Y5
7	Irish Setter (<i>n</i> = 2)	M25 , M26	Y12, Y13
	Large Munsterlander (<i>n</i> = 6)	<u>M7</u> , M8, M24	<u>Y2</u> , Y11
	Weimaraner (<i>n</i> = 34)	M1 , M2 , M3	Y1 , <u>Y2</u> , Y3 , Y4
8	Cocker Spaniel (<i>n</i> = 1)	M18	Y8
	Golden Retriever (<i>n</i> = 2)	M5, M30	Y12
	Labrador Retriever (<i>n</i> = 1)	M31	Y8
9	Miniature Poodle (<i>n</i> = 3)	M9, M11, M59	<u>Y2</u>
	Tibetan Terrier (<i>n</i> = 3)	M52 M53 M54	Y17 , Y18
10	Borzoi (<i>n</i> = 2)	<u>M6</u> , M15	<u>Y2</u>
	Saluki (<i>n</i> = 2)	<u>M5</u> , M40	Y7
	Sloughi (<i>n</i> = 3)	M48 M49 , M50	<u>Y2</u>
	Wolf (<i>n</i> = 4)	M55 , M56 , M57 , M58	Y19 , Y20

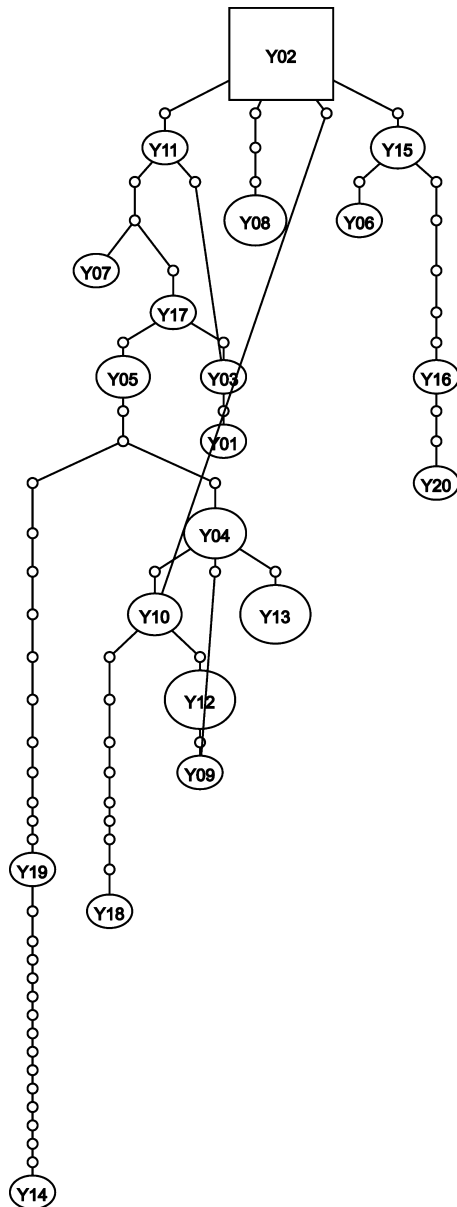


Figure 1 Haplotype parsimony network showing genealogical relationships among Y chromosomal haplotypes of 27 dog breeds and four wolves. Haplotypes have been connected with a 95% connection limit. The size of each oval is proportional to the frequency of the haplotype in several breeds; therefore haplotypes present in more than one individual of the same breed were counted only once. Haplotype Y02 was calculated as out-group (square).

Significant mtDNA haplotype sharing was evident between breeds of different FCI groups. The most frequent mtDNA haplotypes across different FCI groups were M5, M6 and M7 identified in three groups each (Table 2). Haplotype parsimony networks based on mtDNA sequences resulted in a network with five loops and many multifurcations

(Figure 2). Haplotype M0 was set as root which corresponds to the reference sequence of Kim *et al.* (1998) and haplotype M3 was calculated as out-group. Additionally, several subclusters of haplotypes for dogs of different breeds and independent of FCI grouping were identified. Haplotype M3 of the Weimaraners *e.g.* in FCI group 7 clustered together with haplotypes M17, M19 and M36 found in Berger des Pyrénées, Chow Chow and Standard Schnauzer, respectively, corresponding to FCI groups 1, 5 and 2.

Discussion

Our Y chromosomal and mtDNA data suggest that four male and three female forebears, respectively, are represented in the current Weimaraner breed in Germany. Of course, the observation of these patri-lineages and matrilineages only provides minimal estimates of male and female ancestors in the current population, given that *e.g.* several male Weimaraner dogs with identical Y chromosomal haplotypes have been involved. Furthermore, we only investigated parts of the mt genome which could lead to underestimation of the number of female founders as described previously (Pang *et al.* 2009). In some recent Weimaraner individuals, patri- and matrilineages cannot be reconciled with the corresponding records of the historical stud books, thus representing false parentage information somewhere along the breeding history lasting for >130 years. These discrepancies could be explained by accidental puppy exchanges, selective manipulation or instances of multiple siring.

In Weimaraners, we found two breed-specific Y chromosomal haplotypes (Y1, Y3), exclusively identified in the SH variety. Lack of these haplotypes in LH Weimaraners could be explained by the fact that respective paterfamilias never transmitted these haplotypes together with the recessively inherited LH disposition, a missense mutation in the *FGF5* gene (Housley & Venta 2006). Haplotype Y2 was most frequent in Weimaraners, and it is also shared with seven other breeds (the Kuvasz, Schapendoes, Airedale Terrier, Large Munsterlander, Miniature Poodle, Borzoi and Sloughi). Similarly, haplotype Y4 is shared with two other breeds (the Kuvasz and Giant Schnauzer), suggesting that the latter represent ancient haplotypes of common ancestors. In contrast, the two mtDNA haplotypes (M1, M2) were specific for Weimaraners. Haplotype M2 differed from haplotype M3 in only one nucleotide variation in the *ATP synthase subunit 6* gene which was not

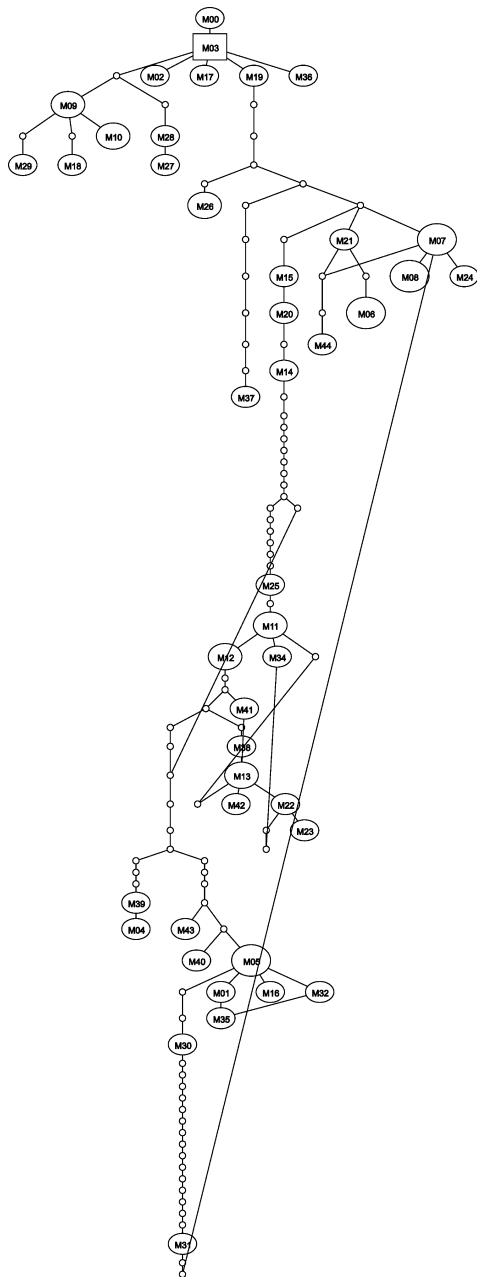


Figure 2 Haplotype parsimony network showing genealogical relationships among mtDNA haplotypes of 27 dog breeds and four wolves. Haplotypes are connected with a 95% connection limit. The size of each oval is proportional to the frequency of the haplotype in several breeds; therefore haplotypes that were present in more than one individual of the same breed were counted only once. Haplotype M03 was calculated as out-group (square), and haplotype M00 was set as root which corresponds to the reference sequence of Kim *et al.* (1998).

found in any other investigated breed. Because according to all published data, this variation is lacking in other breeds, the identified sequence variation may not have originated before breed establishment

or was subsequently reduced in frequency, *e.g.* by drift (Vila *et al.* 1999).

Comparisons of mtDNA haplotypes did not reveal shared mtDNA haplotypes between several pointing dog breeds from Spain (Parra *et al.* 2008) and the Weimaraners as well as the Large Munsterlanders investigated here. Thus, the hunting dog breeds analysed in our study do not share demonstrably materfamilias with Spanish pointer breeds (Parra *et al.* 2008). The lack of shared mtDNA haplotypes is surprising based on the fact that domestic dogs universally share a common gene pool and the findings that more than 300 dogs sampled in Europe share four of the 10 haplogroups found in Eurasia (Pang *et al.* 2009). An explanation could be attributable to distinct genetic structures in breeds from different geographic regions which is consistent with previous findings of only regionally distributed mtDNA haplogroups (Pang *et al.* 2009). Nevertheless, comparing with other studies (Okumura *et al.* 1996; Savolainen *et al.* 2002; Takahashi *et al.* 2002; Wetton *et al.* 2003), we found identical D-loop haplotypes with other dog breeds, suggesting that these breeds share common female ancestors. In general, genetic differentiation was apparent in our study, because of the number of unique Y chromosomal haplotypes found in several breeds. We identified 56% of the haplotypes exclusively in one breed, similar to the result of 40% specific haplotypes identified in 50 dog breeds in a larger study (Bannasch *et al.* 2005). Unique haplotypes were identified for both the Y chromosome and for mtDNA, yet one cannot distinguish between breeds according to identical haplotypes except perhaps for three breeds (11.1% of all breeds). In the majority of breeds, haplotype sharing (of two or more distinct haplotypes, respectively) was obvious, albeit less than six individuals were investigated per breed only. These facts do not allow for breed differentiation as concluded previously (Bannasch *et al.* 2005; Parra *et al.* 2008).

Defining breeds based on mtDNA haplotypes failed because of relatively high degree of shared haplotypes among very different breeds (18.2%). On the other hand, high diversity of distinct haplotypes exists within breeds (81.8%). Similarly, no clear breed differentiation by mtDNA haplotypes was observed in previous studies (Okumura *et al.* 1996; Vila *et al.* 1997; Savolainen *et al.* 2002; Parra *et al.* 2008). Lack of mt differentiation between breeds could therefore be a consequence of a higher number of founders at the origin of breed formation as suggested by previous studies (Vila *et al.* 1999; Parker & Ostrander 2005). Other explanations include subsequent introgression of foreign dogs into an

established breed or the fact that mtDNA evolution is too slow with respect to the time elapsed since modern dog breeds existed (Parker *et al.* 2004; Bannasch *et al.* 2005; Sundqvist *et al.* 2006).

The grey wolf is the ancestor of all dog breeds (Olsen 1985; Vila *et al.* 1997). As inferred from nuclear DNA comparisons, wolves differ from dogs only by 0.04% sequence divergence (Lindblad-Toh *et al.* 2005). In addition, mtDNA haplotypes of dogs are similar to those found in wolves as a consequence of subsequent back-crossing events which lead to greater variability in dog breeds (Vila *et al.* 1997, 2005). In our study, high mtDNA variability appeared unique for the wolves investigated. Contrary to previous findings, no haplotypes identified in wolves were shared with dog breeds, therefore suggesting sampling bias. All four wolves investigated stemmed from a population from Romania, where perhaps little back-crossing had occurred between the wolf population and investigated dog breeds. This suggestion is supported by published data on wolf populations in Eastern Europe which display spatial genetic structure, although there are no obvious physical barriers (Pilot *et al.* 2006). Geographic specificity of wolf haplotypes unique to a particular region has also been reported (Vila *et al.* 1997). Alternatively, the lack of shared haplotypes could reflect the loss of wolf-specific haplotypes in the course of breed development. Regarding the lack of breed-specific mtDNA haplotypes as a result of founding and drift effects, we suggest that the identified haplotypes are old. Therefore, selected popular sires and dams may have been involved also in the development of early dogs in the domestication process long before modern dog breeds were formed.

Analyses of autosomal microsatellites had shown that distinct dog breeds can be differentiated genetically, and individuals belonging to the same breed had similar genotypes (Zajc & Sampson 1999; Koskinen 2003; Parker *et al.* 2004; Sundqvist *et al.* 2006). Hence, we asked whether various dog breeds exhibit genetic variation in male and female ancestors. Several haplotypes are shared among breeds of different FCI groups, both for Y chromosomal and mtDNA. Haplotype sharing between breeds yields evidence for a common or shared origin (Bannasch *et al.* 2005). A previous study (Sundqvist *et al.* 2006) indicated that there exist sex-biased differences in founding breeds, identifying a smaller number of males than females being involved in the development of most breeds. Our data on haplotype parsimony networks based on both different mtDNA and Y chromosomal haplotypes of the investigated breeds

and wolves demonstrated clustering among haplotypes corresponding to breeds of distinct FCI groups. Haplotypes Y2 and M3 were calculated as out-groups, suggesting that these are most ancient haplotypes of all investigated dogs here. Regarding coalescent theory, these haplotypes could well correspond to recent common ancestors of all other haplotypes identified in this study. In case of haplotype Y2 being the most ancient and additionally the most frequent haplotype in several breeds, this finding could be taken as hint that dogs generally share also a common Y chromosomal pool as it was identified for mt genome (Pang *et al.* 2009). Finally, our results do not support the classification of breeds in FCI groups corresponding to common morphology or function with regard to the clustering together of quite dissimilar dog breeds such as the Berger des Pyrénées, Chow Chow, Standard Schnauzer and Weimaraner.

Acknowledgements

The authors thank the 'Gesellschaft zur Förderung Kynologischer Forschung e.V.' for funding this research. We thank all involved breeding associations, breeders and dog owner for supporting this study especially in providing the blood samples.

References

- Bannasch D.L., Bannasch M.J., Ryun J.R., Famula T.R., Pedersen N.C. (2005) Y chromosome haplotype analysis in purebred dogs. *Mamm. Genome*, **16**, 273–280.
- Boyko A.R., Boyko R.H., Boyko C.M., Parker H.G., Castelano M., Corey L., Degenhardt J.D., Auton A., Hedimbi M., Kityo R., Ostrander E.A., Schoenebeck J., Todhunter R.J., Jones P., Bustamante C.D. (2009) Complex population structure in African village dogs and its implications for inferring dog domestication history. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **106**, 13903–13908.
- Clement M., Posada D., Crandall K.A. (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol. Ecol.*, **9**, 1657–1659.
- Dekomien G., Epplen J.T. (2002) The canine Recoverin (RCV1) gene: a candidate gene for generalized progressive retinal atrophy. *Mol. Vis.*, **8**, 436–441.
- Housley D.J., Venta P.J. (2006) The long and the short of it: evidence that FGF5 is a major determinant of canine 'hair'-itability. *Anim. Genet.*, **37**, 309–315.
- Irion D.N., Schaffer A.L., Famula T.R., Eggleston M.L., Hughes S.S., Pedersen N.C. (2003) Analysis of genetic variation in 28 dog breed populations with 100 microsatellite markers. *J. Hered.*, **94**, 81–87.
- Jagiello P., Gencik M., Arning L., Wiczorek S., Kunstmann E., Csernok E., Gross W.L., Epplen J.T. (2004)

- New genomic region for Wegener's granulomatosis as revealed by an extended association screen with 202 apoptosis-related genes. *Hum. Genet.*, **114**, 468–477.
- Kim K.S., Lee S.E., Jeong H.W., Ha J.H. (1998) The complete nucleotide sequence of the domestic dog (*Canis familiaris*) mitochondrial genome. *Mol. Phylogenet. Evol.*, **10**, 210–220.
- Koskinen M.T. (2003) Individual assignment using microsatellite DNA reveals unambiguous breed identification in the domestic dog. *Anim. Genet.*, **34**, 297–301.
- Lindblad-Toh K., Wade C.M., Mikkelsen T.S., Karlsson E.K., Jaffe D.B., Kamal M., Clamp M., Chang J.L., Kulbokas E.J. 3rd, Zody M.C., Mauceli E., Xie X., Breen M., Wayne R.K., Ostrander E.A., Ponting C.P., Galibert F., Smith D.R., DeJong P.J., Kirkness E., Alvarez P., Biagi T., Brockman W., Butler J., Chin C.W., Cook A., Cuff J., Daly M.J., DeCaprio D., Gnerre S., Grabherr M., Kellis M., Kleber M., Bardleben C., Goodstadt L., Heger A., Hitte C., Kim L., Koepfli K.P., Parker H.G., Pollinger J.P., Searle S.M., Sutter N.B., Thomas R., Webber C., Baldwin J., Abebe A., Abouelleil A., Aftuck L., Ait-Zahra M., Aldredge T., Allen N., An P., Anderson S., Antoine C., Arachchi H., Aslam A., Ayotte L., Bachantsang P., Barry A., Bayul T., Benamara M., Berlin A., Bessette D., Blitshteyn B., Bloom T., Blye J., Boguslavskiy L., Bonnet C., Boukhgalter B., Brown A., Cahill P., Calixte N., Camarata J., Cheshatsang Y., Chu J., Citroen M., Collymore A., Cooke P., Dawoe T., Daza R., Decktor K., DeGray S., Dhargay N., Dooley K., Dooley K., Dorje P., Dorjee K., Dorris L., Duffey N., Dupes A., Egbiremolen O., Elong R., Falk J., Farina A., Faro S., Ferguson D., Ferreira P., Fisher S., FitzGerald M., Foley K., Foley C., Franke A., Friedrich D., Gage D., Garber M., Gearin G., Giannoukos G., Goode T., Goyette A., Graham J., Grandbois E., Gyaltsen K., Hafez N., Hagopian D., Hagos B., Hall J., Healy C., Hegarty R., Honan T., Horn A., Houde N., Hughes L., Hunnicutt L., Husby M., Jester B., Jones C., Kamat A., Kanga B., Kells C., Khazanovich D., Kieu A.C., Kisner P., Kumar M., Lance K., Landers T., Lara M., Lee W., Leger J.P., Lennon N., Leuper L., LeVine S., Liu J., Liu X., Lokyitsang Y., Lokyitsang T., Lui A., Macdonald J., Major J., Marabella R., Maru K., Matthews C., McDonough S., Mehta T., Meldrim J., Melnikov A., Meneus L., Mihalev A., Mihova T., Miller K., Mittelman R., Mlenga V., Mulrain L., Munson G., Navidi A., Naylor J., Nguyen T., Nguyen N., Nguyen C., Nguyen T., Nicol R., Norbu N., Norbu C., Novod N., Nyima T., Olandt P., O'Neill B., O'Neill K., Osman S., Oyono L., Patti C., Perrin D., Phunkhang P., Pierre F., Priest M., Rachupka A., Raghuraman S., Rameau R., Ray V., Raymond C., Rege F., Rise C., Rogers J., Rogov P., Sahalie J., Settupalli S., Sharpe T., Shea T., Sheehan M., Sherpa N., Shi J., Shih D., Sloan J., Smith C., Sparrow T., Stalker J., Stange-Thomann N., Stavropoulos S., Stone C., Stone S., Sykes S., Tchuinga P., Tenzing P., Tesfaye S., Thoulutsang D., Thoulutsang Y., Topham K., Topping I., Tsamla T., Vassiliev H., Venkataraman V., Vo A., Wangchuk T., Wangdi T., Weiand M., Wilkinson J., Wilson A., Yadav S., Yang S., Yang X., Young G., Yu Q., Zainoun J., Zembek L., Zimmer A., Lander E.S. (2005) Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature*, **438**, 803–819.
- Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F. (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.*, **16**, 1215.
- Natanaelsson C., Oskarsson M.C., Angleby H., Lundeberg J., Kirkness E., Savolainen P. (2006) Dog Y chromosomal DNA sequence: identification, sequencing and SNP discovery. *BMC Genet.*, **7**, 45.
- Okumura N., Ishiguro N., Nakano M., Matsui A., Sahara M. (1996) Intra- and interbreed genetic variations of mitochondrial DNA major non-coding regions in Japanese native dog breeds (*Canis familiaris*). *Anim. Genet.*, **27**, 397–405.
- Olsen S. (1985). *Origins of the Domestic Dog: The Fossil Record*. University of Arizona Press, Tucson.
- Pang J.F., Kluetsch C., Zou X.J., Zhang A.B., Luo L.Y., Angleby H., Ardalan A., Ekstrom C., Skollermo A., Lundeberg J., Matsumura S., Leitner T., Zhang Y.P., Savolainen P. (2009) mtDNA data indicate a single origin for dogs south of Yangtze River, less than 16,300 years ago, from numerous wolves. *Mol. Biol. Evol.*, **26**, 2849–2864.
- Parker H.G., Ostrander E.A. (2005) Canine genomics and genetics: running with the pack. *PLoS Genet.*, **1**, e58.
- Parker H.G., Kim L.V., Sutter N.B., Carlson S., Lorentzen T.D., Malek T.B., Johnson G.S., DeFrance H.B., Ostrander E.A., Kruglyak L. (2004) Genetic structure of the purebred domestic dog. *Science*, **304**, 1160–1164.
- Parra D., Mendez S., Canon J., Dunner S. (2008) Genetic differentiation in pointing dog breeds inferred from microsatellites and mitochondrial DNA sequence. *Anim. Genet.*, **39**, 1–7.
- Pilot M., Jedrzejewski W., Branicki W., Sidorovich V.E., Jedrzejewska B., Stachura K., Funk S.M. (2006) Ecological factors influence population genetic structure of European grey wolves. *Mol. Ecol.*, **15**, 4533–4553.
- Savolainen P., Zhang Y.P., Luo J., Lundeberg J., Leitner T. (2002) Genetic evidence for an East Asian origin of domestic dogs. *Science*, **298**, 1610–1613.
- Schrammeyer T., Dekomien G., Pasternack S.M., Reinartz B.S., Santos E.J., Eppel J.T. (2005) Long- and short-haired Weimaraner dogs represent two populations of one breed. *Electrophoresis*, **26**, 1668–1672.
- Sundqvist A.K., Bjornerfeldt S., Leonard J.A., Hailer F., Hedhammar A., Ellegren H., Vila C. (2006) Unequal contribution of sexes in the origin of dog breeds. *Genetics*, **172**, 1121–1128.

- Takahasi S., Miyahara K., Ishikawa H., Ishiguro N., Suzuki M. (2002) Lineage classification of canine inheritable disorders using mitochondrial DNA haplotypes. *J. Vet. Med. Sci.*, **64**, 255–259.
- Templeton A.R., Crandall K.A., Sing C.F. (1992) A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics*, **132**, 619–633.
- Vila C., Savolainen P., Maldonado J.E., Amorim I.R., Rice J.E., Honeycutt R.L., Crandall K.A., Lundeberg J., Wayne R.K. (1997) Multiple and ancient origins of the domestic dog. *Science*, **276**, 1687–1689.
- Vila C., Maldonado J.E., Wayne R.K. (1999) Phylogenetic relationships, evolution, and genetic diversity of the domestic dog. *J. Hered.*, **90**, 71–77.
- Vila C., Seddon J., Ellegren H. (2005) Genes of domestic mammals augmented by backcrossing with wild ancestors. *Trends Genet.*, **21**, 214–218.
- Wetton J.H., Higgs J.E., Spriggs A.C., Roney C.A., Tsang C.S., Foster A.P. (2003) Mitochondrial profiling of dog hairs. *Forensic Sci. Int.*, **133**, 235–241.
- Zajc I., Sampson J. (1999) Utility of canine microsatellites in revealing the relationships of pure bred dogs. *J. Hered.*, **90**, 104–107.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Figure S1 Mitochondrial reference sequence U96-639 including the *ATP synthase subunit 6* gene, a 3' portion of *ATP synthase subunit 8* gene and the 5' end *cytochrome c oxidase subunit 3* gene with variable posi-

tions (dark grey) as well as identified sequence variations below (light grey).

Figure S2 Mitochondrial reference sequence U96-639 including the 3' end of the *cytochrome b* gene with variable positions (dark grey) and identified sequence variations below (light grey).

Figure S3 Mitochondrial reference sequence U96-639 including a portion of D-loop sequence with variable positions (dark grey) and identified sequence variations below (light grey).

Table S1 Single nucleotide polymorphisms (SNPs) and microsatellite markers on the Y chromosome.

Table S2 Primer sequences for canine mtDNA amplification.

Table S3 Different mtDNA haplotypes identified in 27 dog breeds and 4 wolves, indicating the variable sites in the mt D-loop sequence numbered according to reference sequence (NCBI accession number U96639, Kim *et al.* 1998). mtDNA haplotypes were denominated according Savolainen *et al.* (2002). Sequences not yet comprised in previous publications were grouped together with their respective clades. Two new haplotypes observed in wolves could not be assigned to existing clades beyond doubt. Dots refer to identical nucleotides when compared to the reference sequence and hyphens indicate deletion of the nucleotide. Bold letters represent variable sites only detected in our study.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

Darstellung des Eigenanteils an den Publikationen**Generalized progressive retinal atrophy in the Irish Glen of Imaal Terrier is associated with a deletion in the ADAM9 gene**

Mol Cell Probes. 2010 Dec;24(6):357-63. Epub 2010 Aug 4.

doi:10.1016/j.mcp.2010.07.007

Planung: 80 %

Experimentelle Durchführung: 100 %

Verfassen des Manuskripts: 80 %

On ancestors of dog breeds with focus on Weimaraner hunting dogs

J Anim Breed Genet. 2011 Feb;128(1):64-72. Epub 2010 Oct 28.

doi:10.1111/j.1439-0388.2010.00874.x

Planung: 30 %

Experimentelle Durchführung: 50 %

Verfassen des Manuskripts: 80 %

'Omnia tempus habent.'
so auch meine Promotionsphase in der MHG,
für die es gilt DANKE zu sagen!

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Jörg T. Epplen für die Bereitstellung des interessanten Promotionsthemas, sein Interesse am Fortgang meiner Arbeit und seine fortwährende Diskussionsbereitschaft sowie Unterstützung beim Verfassen der Publikationen und dieser Arbeit.

Prof. Dr. Dr. Dr. med. habil. Hanns Hatt danke ich vielfach für die freundliche Bereitschaft, das Zweitgutachten meiner Promotionsarbeit zu übernehmen.

Besonders herzlich danke ich auch Frau Dr. Gabriele Dekomien für ihre ausnahmslose Hilfsbereitschaft, die zahlreichen Diskussionen und Anregungen sowie die kritische Durchsicht dieser Arbeit. Vielen Dank auch für die täglichen Trainingseinheiten der Lachmuskeln. Frau Dr. Micaela Schlinghoff danke ich für die angenehme und kollegiale Atmosphäre in unserem ‚Drei-Frauen-Büro‘ sowie für ihre Hilfe bei MS-Office-Eigenheiten so manchen ‚Fehler im Kern zu lösen‘.

Allen weiteren MitarbeiterInnen der Abteilung Humangenetik RUB danke ich für die besonders angenehme Arbeitsatmosphäre und die Unterstützung mit Rat und Tat, ob bei der Bearbeitung hunderter Hunde-Blutproben, diverse Mitfahrgelegenheiten in Bogestra-Streikzeiten und bei Betriebsausflügen oder einem spontanen Übernachtungsquartier in der (Haustürschlüssel) Not. Insbesondere danke ich natürlich ‚meinem‘ Labor 1 mit Frau Natascha Wirkus, Frau Michaela Hagedorn und Neuzugang Frau Maike Kallenbach sowie allen LaborkollegInnen auf Zeit, insbesondere Frau Sonja Vosbeck und Frau Conni Hanke – Vielen Dank für diese schöne Zeit. Mit euch ließen sich auch ‚Dürrezeiten‘ überstehen!

Ein sehr großes Dankeschön gebührt Frau Dr. Elisabeth Petrasch-Parwez für die Organisation der immunhistochemischen Analysen sowie Frau Annegrit Schlichting, Herrn Hans-Werner-Habbes, Frau Marlen Löbbecke-Schumacher und Frau Katja Rumbach für deren Durchführung.

Ganz besonders danke ich auch Herrn Dominik Seelow für seine Kooperationsbereitschaft, das von ihm entwickelte Analyse-Programm HomozygotyMapper auch für die Auswertung caniner SNP-*microarrays* anzupassen, wodurch Homozygotie-Kartierungen beim Hund erst möglich wurden.

Der Gesellschaft zur Förderung Kynologischer Hundeforschung e.V., Bonn und dort besonders Frau Dr. Helga Eichelberg gilt mein ausdrücklicher Dank für die langjährige finanzielle Förderung meiner Promotionsarbeit. Des Weiteren danke ich dem DOK Dortmunder Kreis e.V. (insbesondere Herrn Dr. Brahm) und Herrn Dr. Bedford aus England für die klinischen gPRA-Beurteilungen und außerdem allen beteiligten Zuchtvereinen, Züchtern, Hundehaltern und Veterinärmedizinerinnen für ihre Kooperationsbereitschaft. In diesem Zusammenhang ein besonderes Dankeschön an Herrn Huub van Benthum, Herrn Theo Peters, Frau Jean Rogers, Frau Stefanie Blänkner, Frau Dr. Elke Uhlemann, Frau Katharina Bottenberg, Frau Petra Friedl, Frau Annette Glöser, Frau Bianka Schneider und Herrn Gosling Mast für ihr fortwährendes Engagement, u.a. bei der Organisation von Blutproben, ohne die diese Studien unmöglich gewesen wären.

Ich danke auch der Deutschen Bahn AG, der Abellio Rail NRW sowie der Hessischen Landesbahn GmbH, dass außer Gleisunterspülung, Tunnelbrand, Suizidgefährdeten und freilaufenden Häftlingen auf den Gleisen, Schienenersatzverkehr sowie Einstellung des Betriebsverkehrs im gesamten Bundesgebiet keine schlimmeren Katastrophen passiert sind und sie mich gemäß dem Motto ‚Pünktlichkeit im Rahmen der akademischen Viertelstunde‘ immer sicher von und nach Bochum befördert haben.

Nicht zuletzt gilt mein ganz besonders herzlicher Dank meinen Eltern!

Für eure moralische Unterstützung in allen Belangen und Entscheidungen, für eure Motivation und ausdauernde Geduld sowie dafür, dass ihr mir den Rücken von allem Unwichtigen freigehalten habt. Vielen herzlichen Dank!

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Arbeit selbständig verfasst und bei keiner anderen Fakultät eingereicht und dass ich keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Es handelt sich bei der heute von mir eingereichten Dissertation um sechs in Wort und Bild völlig übereinstimmende Exemplare.

Weiterhin erkläre ich, dass digitale Abbildungen nur die originalen Daten enthalten und in keinem Fall inhaltsverändernde Bildbearbeitung vorgenommen wurde.

Bochum, den 22.01.2011

(Regina Kropatsch)

Curriculum vitae

PERSÖNLICHE ANGABEN

Name: Regina Kropatsch
Geburtsdatum: 27. April 1982
Geburtsort: Herborn, Hessen
Staatsangehörigkeit: deutsch

SCHUL- UND HOCHSCHULAUSBILDUNG

seit 05/2007 Promotionsstudiengang der Biologie und Biotechnologie an der Internationalen Graduiertenschule Biowissenschaften der Ruhr-Universität Bochum
Beginn der Promotion in der Humangenetik RUB,
Medizinische Fakultät
Betreuung: Prof. Dr. med. Jörg T. Epplen
10/2001 – 01/2007 Studium der Biologie an der Philipps-Universität Marburg
17.01.2007 Diplom im Fach Biologie
09/1992 – 06/2001 Gymnasium Philippinum Weilburg
08.06.2001 Erlangung der allgemeinen Hochschulreife
09/1988 – 06/1992 Grundschule, Braunfels

SONSTIGE TÄTIGKEITEN

seit 05/2007 Wissenschaftliche Mitarbeiterin der Humangenetik RUB,
Medizinische Fakultät der Ruhr-Universität Bochum
11/2006 – 12/2006 Praktikum im Centrum für Humangenetik in Linden
04/2005 – 07/2006 Studentische Hilfskraft der Philipps-Universität Marburg