

# **Molekulargenetische Aufklärung der neuronalen Ceroid-Lipofuszinose (NCL) beim Tibet Terrier**

Anne Wöhlke<sup>1</sup>, Ute Philipp<sup>1</sup>, Rolf Brahm<sup>2</sup>, Ottmar Distl<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut für Tierzucht und Vererbungsforschung, Stiftung Tierärztlichen Hochschule Hannover, Bünteweg 17p, 30559 Hannover

<sup>2</sup>Dortmunder Kreis (DOK), Gesellschaft für Diagnostik genetisch bedingter Augenerkrankungen bei Tieren e.V., 44137 Dortmund

Die gkf förderte ein Projekt des Instituts für Tierzucht und Vererbungsforschung der Stiftung Tierärztlichen Hochschule Hannover unter Beteiligung des DOK, des Internationalen Klubs für Tibetische Hunderassen e.V. (KTR), sowie dem Internationalen Klub für Lhasa Apso und Tibet Terrier e.V. (ILT) und dem Deutschen Klub für Tibet Terrier und Lhasa Apso (CTA) mit dem Ziel, die ursächliche Mutation der erblich bedingten Caninen Ceroid-Lipofuszinose (NCL) beim Tibet Terrier aufzuklären. Für die sehr gute Unterstützung bedanken wir uns recht herzlich. Die Untersuchungen konnten so zu einem erfolgreichen Abschluss geführt werden. Die kausale Mutation konnte aufgeklärt werden und die Züchter des Tibet Terriers können damit unterstützt werden, das Auftreten der NCL zu verhindern.

## **Einleitung**

Die neuronalen Ceroid-Lipofuscinosen („neuronal ceroid lipofuscinosis“, NCL, canine ceroid lipofuscinosis, CCL) gehören zu der genetisch heterogenen Gruppe der progressiv und meist tödlich verlaufenden neurodegenerativen Speicherkrankheiten. Bei diesen monogen autosomal rezessiv vererbten Krankheiten lagert sich Ceroid-Lipofuszin ein Abbauprodukt des Zellstoffwechsels in Konjunktiva, Retina und Nervenzellen des Gehirns ab, wodurch diese zu Grunde gehen (Katz et al., 2005).

Die neuronale Ceroid-Lipofuszinose ist sowohl beim Menschen als auch bei verschiedenen Tierarten bekannt (z.B. Hund, Rind, Schaf, Pferd, Maus, Katze).

Die neuronale Ceroid-Lipofuszinose beim Tibet Terrier wurde erstmalig 1992 (Riis et al., 1992) beschrieben. Der Erkrankung liegt, wie auch beim Menschen und anderen Tierarten, ein monogen autosomal rezessiver Erbgang zugrunde (Riis et al., 1992). Bei den Tibet Terriern tritt eine späte Form der NCL (late-onset disease) auf, erste Symptome dieser Erkrankung werden durchschnittlich erst in einem Alter von 6-7

Jahren beobachtet. Das Fortschreiten der Krankheit führt in der Regel zur Euthanasie der Hunde im Alter von 8-10 Jahren. Bisher gibt es keine Möglichkeit vor Beginn der Erkrankung betroffene Hunde zu identifizieren. Die in den letzten Jahren von Prof. Matiasek (Allgemeine Pathologie und Neuropathologie, Ludwig-Maximilians-Universität, München) etablierte Methode der Konjunktiva-Biopsie dient nur zur Absicherung der klinischen Diagnose.

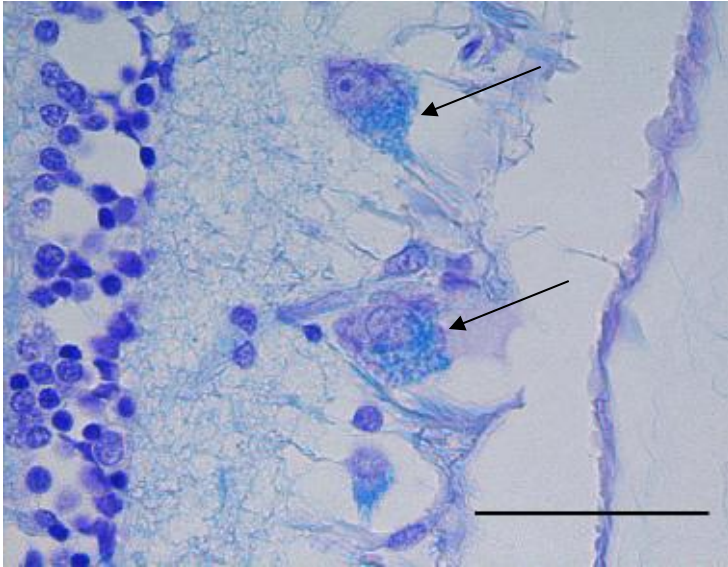
## **Krankheitsbild der NCL beim Tibet Terrier**

### *Klinische Symptome*

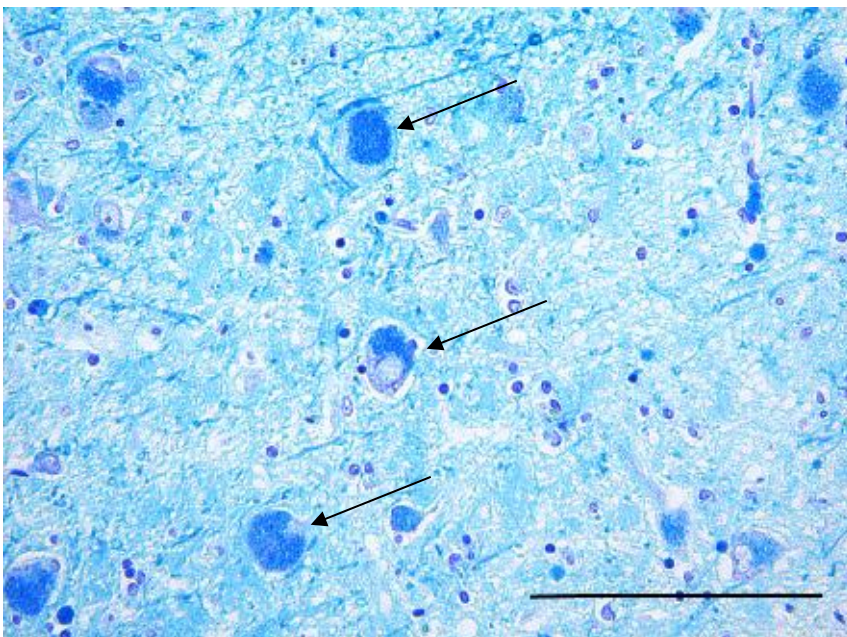
Die am häufigsten beschriebenen Symptome beim Tibet Terrier sind Wesensveränderungen. Die von NCL betroffenen Hunde reagieren auf Umweltgeräusche, Menschen und Tiere mit großer Angst und/oder plötzlicher Aggressivität. Ständige Unruhe, Unsauberkeit, Koordinationsschwierigkeiten sind auffällig. Die Hunde können z.B. nicht mehr auf den Sessel oder ins Auto springen. Mit dem Fortschreiten der Erkrankung verstärken sich diese Symptome. Ein weiteres Symptom ist eine Einschränkung der Sehfähigkeit, die sich in Form einer „Nachtblindheit“ äußert. Dies kann mit einem Elektretinogramm (ERG) nachgewiesen werden. Charakteristisch im ERG ist die negative b-Welle. Bei der klinischen Augenuntersuchung kann eine langsam fortschreitende Retinadegeneration beobachtet werden. Deshalb wurde die NCL beim Tibet Terrier zuerst fast nur von DOK-Tierärzten diagnostiziert. Das eingeschränkte Sehvermögen schreitet bei der NCL jedoch nicht zur vollkommenen Erblindung fort wie bei der PRA. Die in den letzten Jahren etablierte Methode der Konjunktiva-Biopsie dient zur Absicherung der klinischen Diagnose und der Nachweis von Ceroid-Lipofuszin in der Bindehaut ist ein weiteres Unterscheidungskriterium zur PRA.

### *Histologie*

Bei von NCL betroffenen Tibet Terriern lässt sich mittels histologischer Schnitte von Gehirn und Retina das abgelagerte Ceroid-Lipofuszin durch Anfärbung der Präparate nachweisen. In Abbildung 1 ist ein mit Luxol Fast Blue angefarbter Schnitt der Retina zu sehen, in Abbildung 2 ein mit der gleichen Methode gefärbter Schnitt des Großhirns. In beiden Präparaten sind deutlich die blau gefärbten Ablagerungen in den Nervenzellen erkennbar.



**Abbildung 1** Darstellung des Ceroid-Lipofuszin in der Retina (Netzhaut) bei einem an NCL erkrankten Tibet Terrier. Der dargestellte Balken entspricht 50  $\mu\text{m}$ . Die Pfeile zeigen auf Nervenzellen mit dem abgelagerten Ceroid-Lipofuszin, das blau angefärbt wurde.



**Abbildung 2** Darstellung des Ceroid-Lipofuszin im Großhirn eines an NCL erkrankten Tibet Terriers. Der dargestellte Balken entspricht 100  $\mu\text{m}$ . Die Pfeile zeigen auf Nervenzellen mit dem abgelagerten Ceroid-Lipofuszin, das blau angefärbt wurde.

## **Aufklärung der kausalen Mutation**

Unter Verwendung des 127K Canine Arrays von Affymetrix und Typisierung von 24 Tibet Terriern (12 von NCL betroffen und 12 nicht betroffen) konnten sechs Regionen auf jeweils verschiedenen Chromosomen lokalisiert werden, die eine Beziehung zum Auftreten der NCL beim Tibet Terrier zeigten. Durch eine Feinkartierung mittels zusätzlicher Marker (Mikrosatelliten und Einzelbasenaustausche (SNPs)) in diesen Regionen und eine verbesserte Auswertungsmethodik konnte die für NCL verantwortliche Genomregion mit sehr hoher Sicherheit identifiziert werden. Dafür wurden insgesamt 62 weitere Marker für diese Genomregionen an 384 Tibet Terriern genotypisiert. Mit Hilfe dieser zusätzlichen Marker konnte eine Region auf Chromosom 2 als die alleinige für NCL verantwortliche Region über Kopplungs- und Assoziationsanalysen identifiziert und alle übrigen Genomregionen sicher ausgeschlossen werden. Diese für NCL verantwortliche Genomregion umfasste einen Bereich von ca. 1 Mb (1 Mio. Basenpaare). In dieser Region und in deren näherer Nachbarschaft wurden 14 Gene zur Sequenzierung und Suche nach Markern ausgewählt. Als Ergebnis dieser Sequenzierungsarbeiten wurde eine Mutation gefunden, die das Auftreten von NCL erklärt und perfekt mit dem Auftreten von NCL einhergeht.

An einer weitgestreuten Stichprobe von 1.371 Tibet Terriern konnte bei allen 24 von NCL betroffenen Tibet Terriern der für NCL empfängliche Genotyp aufgrund dieser Mutation nachgewiesen werden. Die dazugehörigen Eltern und nahen Verwandten, soweit hier Proben vorlagen, wiesen die erwarteten Genotypen auf. Das Defektallel konnte zudem in einer Stichprobe von 144 Hunden neun verschiedener anderer Rassen nicht nachgewiesen werden. Das Tibet Terrier NCL-Gen ist bisher weder beim Mensch noch bei der Maus bekannt und ist zugleich das erste nachgewiesene Gen für eine adulte Form der NCL. Beim Menschen wurde bisher noch keine adulte Form der NCL molekulargenetisch aufgeklärt.

Der NCL-Mutationstest wird beim Tibet Terrier bereits eingesetzt und wird dazu beitragen, diese klinisch nicht sicher zu diagnostizierende Erkrankung zu eliminieren. Bei weiteren Rassen mit bekannten Fällen von NCL soll nun auch nach der jeweiligen kausalen Mutation gesucht werden. Der erfolgreiche Abschluss der Arbeit war nur durch den engagierten Einsatz der im VDH organisierten Tibet Terrier Zuchtvereine und die Unterstützung vieler Züchter, Tierärzte und der gkf möglich.

## **Literatur**

- Katz ML, Khan S, Awano T, Shahid SA, Siakotos AN, and Johnson GS. 2005: A mutation in the CLN8 gene in English Setter dogs with neuronal ceroid-lipofuscinosis. *Biochem Biophys Res Commun* 327: 541-547.
- Riis RC, Cummings JF, Loew ER, de Lahunta A. 1992: Tibetan terrier model of canine ceroid lipofuscinosis. *Am J Med Genet* 42: 615-621.