

Aus der
Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Primäre immunhämolytische Anämie
und primäre immunbedingte Thrombozytopenie
beim Hund:**

**Studien zur genetischen Assoziation mit dem Haupthistokompatibilitätskomplex
und zum Vererbungsmodus**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Meng Meng Liang
Tierärztin aus Shanghai

Berlin 2009

Journal-Nr.: 3369

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. L. Brunnberg
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. B. Kohn
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. F. G. Schmidt
Dritter Gutachter: PD Dr. I. Pfeiffer

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

Dogs, major histocompatibility complex, haemolytic anaemia,
thrombocytopenia, autoimmune diseases, inheritance, genetic
polymorphism, dna sequencing, pedigree, segregation

Tag der Promotion: 04.05.2010

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86664-800-5

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2009

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© mensch und buch verlag 2010

choriner str. 85 - 10119 berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Inhalt	Seite
Inhaltsverzeichnis	1
Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	5
I. <u>Einleitung</u>	7
II. <u>Literaturübersicht</u>	
1. Autoimmunität	8
1.1. Wodurch entsteht Autoimmunität	8
1.2. Genetische Grundlage von Autoimmunerkrankungen	9
1.3. Beteiligte Zellen bei Autoimmunerkrankungen	9
1.3.1. T-Zellen	9
1.3.2. B-Zellen	10
1.4. Major Histocompatibility Complex (MHC)	10
1.4.1. MHC und Autoimmunerkrankungen	11
1.4.2. Canine MHC	11
1.4.2.1. MHC-I	12
1.4.2.2. MHC-II	12
1.4.2.3. Dog Leukocyte Antigen (DLA) und Autoimmunerkrankungen	13
2. Vererbung	13
2.1. Autosomal dominanter Erbgang	13
2.2. Autosomal rezessiver Erbgang	14
2.3. Imprinting	14
2.4. Multifaktorielle Vererbung	14
2.5. Homozygotie/Heterozygotie	15
2.6. Die Mendel'sche Vererbung und Autoimmunität	15
3. Genetik des Hundes	15
3.1. Rassenprädisposition für Krankheiten beim Hund	16
4. Immnhämolytische Anämie	16
4.1. Definition	16
4.2. Primäre immnhämolytische Anämie (pIHA)	16
4.3. Ätiologie und Pathogenese	17
4.3.1. Beteiligte Antikörper	17
4.3.2. Die Rolle des MHC	18
4.3.3. Familiäres Vorkommen	19
4.3.4. Prädispositionen	20
4.4. Anamnese und Klinik	21
4.5. Diagnose	21
4.5.1. Erythrozyten und Hämatokrit	21
4.5.2. Sphärozyten	22
4.5.3. Erythrozytenagglutination	22
4.5.4. Direkter Coombs-Test (Direkter Antiglobulin-Test, DAT)	22

5.	Immunbedingte Thrombozytopenie	22
5.1.	Definition	22
5.2.	Primäre immunbedingte Thrombozytopenie (pITP)	23
5.3.	Ätiologie und Pathogenese	23
5.3.1.	Beteiligte Antikörper und Zielantigene	23
5.3.2.	Beteiligte Zellen	24
5.3.3.	MHC und ITP	24
5.3.4.	Familiäres Vorkommen	25
5.3.5.	Prädispositionen	26
5.4.	Anamnese und Klinik	26
5.5.	Diagnose	27
5.5.1.	Thrombozyten	27
5.5.2.	Nachweismöglichkeiten zur Bestimmung von Thrombozyten-gebundenen-Antikörpern	27

III. Material und Methoden

1.	Klinische Untersuchung	29
1.1.	Patienten	29
1.2.	Anamnese, Signalement und Einschlußkriterien	29
1.3.	Diagnose IHA	30
1.3.1.	Agglutinationstest	30
1.3.2.	Direkter Coombs-Test (Direkter Antiglobulin-Test, DAT)	30
1.4.	Untersuchung auf Thrombozyten-gebundene Antikörper	31
1.5.	Weitere Untersuchungen	31
2.	Molekularbiologische Untersuchungen	31
2.1.	Probenentnahme	31
2.2.	Probanden	31
2.3.	DNA-Isolierung	32
2.4.	Genloci	33
2.5.	Primerdesign	33
2.5.1.	Primeretablierung	34
2.5.2.	Primerübersicht	35
2.5.2.1.	DLA-12	35
2.5.2.2.	DLA-79	37
2.5.2.3.	DLA-64	39
2.5.2.4.	DLA-88	40
2.5.2.5.	DLA-DRA	41
2.5.2.6.	DLA-DRB	42
2.5.2.7.	DLA-DQA	43
2.5.2.8.	DLA-DQB	44
2.6.	Polymerasekettenreaktion	47
2.7.	Aufreinigung der PCR-Produkte	47
2.8.	Sequenzierreaktion	48
2.9.	Verwendete Datenbanken und Software	48
2.9.1.	Alignment und Auswertung der Sequenzen	48
2.9.2.	Klassifizierung der Allele	48
2.9.3.	Nomenklatur der Haplotypen	49
2.9.4.	Statistische Auswertung	49

3.	Segregationsanalyse	49
3.1.	Probanden	49
3.2.	Segregationsanalyse	50
<u>IV.</u>	<u>Ergebnisse</u>	
1.	Pedigrees	52
1.1.	Cocker Spaniel	52
1.2.	Irish Red Setter	52
2.	MHC-I-Untersuchung	57
2.1.	Probanden	57
2.2.	MHC-I-Kandidatenscreen	59
2.2.1.	MHC-I: DLA-12	60
2.2.2.	MHC-I: DLA-64	69
2.2.3.	MHC-I: DLA-79	73
2.2.4.	MHC-I: DLA-88	78
3.	MHC-II-Untersuchung	78
3.1.	Probanden	78
3.2.	MHC-II-Kandidatenscreen	79
3.2.1.	MHC-II: DLA-DRA	80
3.2.2.	MHC-II: DLA-DRB	83
3.2.3.	MHC-II: DLA-DQA	86
3.2.4.	MHC-II: DLA-DQB	88
4.	Segregationsanalyse	92
4.1.	Pedigrees	92
4.2.	Analyse Irish Setter (jPAP)	93
4.2.1.	Gruppe 1: an IHA erkrankte Hunde	93
4.2.2.	Gruppe 2: an IHA, ITP und Evans' Syndrom erkrankte Hunde	94
4.3.	Analyse Cocker Spaniel (jPAP)	95
4.3.1.	Gruppe 1: an IHA erkrankte Hunde	95
4.3.2.	Gruppe 2: an IHA, ITP und Evans' Syndrom erkrankte Hunde	96
<u>V.</u>	<u>Diskussion</u>	
1.	Klinische Untersuchung	98
1.1.	Signalement	98
1.1.1.	Rassenprädispositionen	98
1.1.2.	Alter	98
1.1.3.	Geschlechtsprädisposition	99

2.	Molekularbiologische Untersuchungen	99
2.1.	MHC-I-Kandidatengenscreen	99
2.1.1.	DLA-12	100
2.1.2.	DLA-79	100
2.1.3.	Andere untersuchte Loci	101
2.2.	MHC-II-Kandidatengenscreen	101
2.2.1.	DLA-DRB	102
2.2.2.	DLA-DQA	102
2.2.3.	DLA-DQB	103
2.3.	MHC-II und ITP	104
3.	Fazit	104
3.	Segregationsanalyse	105
3.1.	Cocker Spaniel-Pedigree	106
3.2.	Irish Red Setter-Pedigree	107
4.	Fazit	107
<u>VI.</u>	<u>Zusammenfassung</u>	109
<u>VII.</u>	<u>Summary</u>	111
<u>VIII.</u>	<u>Literaturverzeichnis</u>	113
<u>IX.</u>	<u>Anhang</u>	131
	Danksagung	133
	Selbständigkeitserklärung	134

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abb.	=	Abbildung
Acc.-No.	=	accession number
AIC	=	Informationskriterium nach Akaike
Ak	=	Antikörper
Ag	=	Antigen
BLAST®	=	Basic Local Alignment Search Tool
bp	=	Basenpaare
°C	=	Grad Celsius
C	=	Complement
DLA	=	Dog Leukocyte Antigen
DNA	=	Desoxysribonucleinsäure
DM	=	Diabetes mellitus
dNTP	=	Desoxy-Nukleosidtriphosphat
E	=	Erythrozyt
EDTA	=	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	=	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
fwd	=	forward
HLA	=	Human Leukocyte Antigen
HPLC	=	Hochgereinigtes Wasser
IBD	=	Inflammatory Bowel Disease
Ig	=	Immunglobulin
IHA	=	Immunhämolytische Anämie
ITP	=	Immuninduzierte Thrombozytopenie
ISAG	=	International Society for Animal Genetics
J	=	Jahre
kb	=	Kilobasen
l	=	Liter
M	=	Mol
m	=	männlich
Mbp	=	Mega base pairs
mk	=	männlich kastriert
min	=	Minuten
m	=	Mili (10^{-3})
μ	=	Mikro (10^{-6})
max.	=	maximal
MgCl ₂	=	Magnesiumchlorid
MHC	=	Major Histocompatibility Complex
NaCl	=	Natriumchloridlösung
NCBI	=	National Center for Biotechnology Information
OR	=	Odds ratio
p	=	pico
PCR	=	Polymerasekettenreaktion
piHA	=	primäre immunhämolytische Anämie
pITP	=	primäre immuninduzierte Thrombozytopenie
rev.	=	reverse
RFLP	=	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus

rpm	=	Rotation per minute / Umdrehungen pro Minute
s.	=	siehe
sec	=	Sekunden
SLE	=	Systemischer Lupus Erythematoses
SNP	=	Single Nucleotid Polymorphismus
Tab.	=	Tabelle
TBE	=	TRIS-Borat-EDTA
Tc	=	Thrombozyt
U	=	Enzymeinheit (Unit)
u. a.	=	unter anderem
UV	=	Ultraviolett
vs.	=	versus
w	=	weiblich
wk	=	weiblich kastriert
z. B.	=	zum Beispiel

Nucleotide und heterozygote Positionen

A	=	Adenin
C	=	Cytosin
G	=	Guanin
T	=	Thymin
R	=	G + A
Y	=	T + C
M	=	A + C
K	=	G + T
S	=	G + C
W	=	A + T

Datenbanken

Genetische Erkrankungen beim Mensch (Abfragedatum: 1.3.2009)

<http://geneticassociationdb.nih.gov/cgi-bin/tableview.cgi?table=diseaseview>

NCBI home (Abfragedatum: 1.3.2009)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Berechnung der Odds Ratio (Abfragedatum: März 08)

<http://home.clara.net/sisa/two2hlp.htm>

Programm jPAP zur Berechnung der Segregationsanalyse (Abfragedatum: Februar 08)

<http://hasstedt.genetics.utah.edu>

I. Einleitung

Seit annähernd 20 Jahren wird sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin ein stetiger Anstieg von Autoimmunerkrankungen beobachtet. Autoimmunerkrankungen werden dadurch definiert, dass der Organismus Antikörper produziert, die gegen körpereigene Moleküle gerichtet sind. Der Abbau dieser Antikörper-Antigen-Komplexe findet im Retikuloendothelialen System (RES) statt. Bei der primären immunhämolytischen Anämie (IHA) werden die Erythrozyten von autoimmunen Antikörpern angegriffen, während bei der autoimmunbedingten Thrombozytopenie (ITP) die Thrombozyten die Zielzellen einer immunologischen Attacke darstellen. Diese Vorgänge können zu starken Anämien bzw. Thrombozytopenien und damit einhergehenden klinischen Symptomen führen. Lässt sich keine Ursache für die Bildung der Antikörper finden, spricht man von einer *autoimmunbedingten oder primären immunbedingten hämolytischen Anämie (pIHA) bzw. Thrombozytopenie (pITP)*. Bei Vorliegen einer möglichen auslösenden Grunderkrankung bzw. beim Auftreten nach Medikamentengabe spricht man von sekundärer IHA bzw. ITP. IHA und ITP können auch parallel beim selben Hund vorkommen (Evans' Syndrom).

Für die IHA und ITP wurden bereits seit Jahren Rasseprädispositionen für bestimmte Hunderassen wie Cocker Spaniel, Deutscher Schäferhund, Irish Setter, Pudel, Bobtail und andere beobachtet. Zudem wurde ein vermehrtes Auftreten der pIHA in einzelnen Zuchtlinien (Pedigrees) beschrieben. Es stellt sich somit die Frage nach einem erblichen Hintergrund dieser Autoimmunerkrankungen.

Es ist bekannt, dass autoimmune Vorgänge durch verschiedene Faktoren des Immunsystems wie Lymphozyten, dendritische Zellen und Interleukine beeinflusst werden. Aktuelle Studien weisen insbesondere dem Haupthistokompatibilitätskomplex (Major histocompatibility complex, MHC) eine Schlüsselrolle im autoimmunem Geschehen, wie bei der IHA und ITP, zu. Der MHC ist verantwortlich für das Markieren von Zielzellen, deren Erkennung durch T-Zellen im Organismus sowie den Abbau der gebundenen Komplexe durch das RES. Inwieweit eine Strukturveränderung des MHC, beruhend auf einer genetischen Fehlcodierung (Mutation), zu Erkennungsfehlern führen kann, ist ungeklärt, ebenso ob mögliche Mutationen zu einem Ausbruch der pIHA bzw pITP führen können.

In der Humanmedizin wurde bereits in verschiedenen Studien ein Zusammenhang zwischen dem MHC und dem Auftreten der IHA/ITP untersucht. Zusätzlich besteht der Verdacht einer autosomal-dominanten Vererbung der humanen ITP innerhalb bestimmter Familien. Da sich viele humanmedizinische Erkenntnisse auf den Hund übertragen lassen, war das Ziel der vorliegenden Studie die Untersuchung folgender Fragen:

1. Liegt der caninen pIHA und/oder pITP ein Mendelscher Vererbungsmodus zugrunde?
2. Inwieweit spielen Genmutationen im caninen MHC eine ursächliche Rolle bei der Entstehung der caninen pIHA und/oder pITP?
3. Können bestimmte Allele oder Polymorphismen innerhalb relevanter MHC-Gene in Einklang mit betroffenen Zuchtlinien gebracht werden und kann eine Vererbung dieser relevanten Mutationen beobachtet werden?
4. Kann anhand der gewonnenen Daten eine Risikobewertung für betroffene Rassen/Zuchtlinien vorgenommen werden?

II. Literaturübersicht

1. Autoimmunität

Das intakte Immunsystem der Vertebraten ist in der Regel fähig, das Eindringen und Ausbreiten von Krankheitserregern effektiv zu unterbinden. Eine wirksame Bekämpfung von unerwünschten und gefährlichen Stoffen resultiert aus einem geregelten Zusammenspiel von zellulären und humoralen Komponenten des Immunsystems. Zum Schutz vor einem Angriff des Immunsystems auf körpereigene Zellen besteht grundsätzlich bei jedem Individuum eine Selbsttoleranz. Ist diese Toleranz aus bestimmten Gründen aber herabgesetzt, führt dies zu einer autoimmunen Reaktion des Immunsystems gegen organismuseigene Strukturen. Autoreaktive Immunzellen finden sich zwar auch bei gesunden Individuen (Naquet et al. 1988), bedingen allerdings nicht den Ausbruch einer Krankheit. Wie es zur Zerstörung der Selbsttoleranz kommt ist noch ungeklärt. Eine Autoimmunerkrankung als Zusammenspiel einer Vielzahl genetischer Prädispositionen und möglicher Umweltfaktoren wird seit langem diskutiert (Shepshelovich und Shoenfeld 2006; Day und Mackin 2008a). Klinisch kann sich eine Autoimmunerkrankung systemisch in Form von Systemischem Lupus erythematoses (SLE) oder organspezifisch wie z.B. Diabetes mellitus (DM) Typ I, Graves's disease, Pemphigus u.a. manifestieren. Eine große Rolle bei der Erkennung von Antigenen spielen die T-Zellen. Nach einer Unterscheidung von körpereigenen oder fremden Antigenen leiten die T-Zellen die B-Zellen dazu an, spezifische Antikörper (Immunglobuline) als Bestandteil der humoralen Abwehr zu bilden, die die Antigene binden und eine Beseitigung dieser herbeiführen. Forschungsarbeiten haben in letzter Zeit gezeigt, dass durch Störungen beteiligter Rezeptoren veränderte Signale induziert und eine Malfunktion der immunologischen Zellen bewirkt werden (Anolik und Sanz 2004; Firestein 2004).

1.1. Wodurch entsteht Autoimmunität

Autoimmunität entsteht aus einer komplexen Interaktion von Genprodukten und Umweltfaktoren (Day und Mackin 2008b). Dabei wird die genetische Komponente auf 20-40% des Risikos geschätzt (Cambon-Thomsen und Roth 1994). Die Umweltfaktoren nehmen entsprechend einen hohen Anteil ein, während die meisten Mutationen in Genen, die Komponenten des Immunsystems codieren, oft nur geringe Effekte erzeugen. In ungünstigen Fällen können in Kombination mit gesunden Allelen anderer Loci allerdings daraus letale Phänotypen entstehen. Hierbei spricht man von „Linkage Disequilibrium“. Die meisten autoimmunen Erkrankungen werden also zumeist nicht nach einfachem Mendel'schem Schema weitervererbt (Vyse und Todd 1996).

Die humorale Immunantwort auf ein Antigen ist ein komplizierter biologischer Vorgang unter Beteiligung verschiedener Zellen. Hauptfaktor ist das Antigen, welches mit Antigen-präsentierenden Zellen (APC) interagiert (Watts 1997). Grundsätzlich handelt es sich bei APC's um Makrophagen oder dendritische Zellen, die mit dem Major Histocompatibility Complex (MHC) Klasse-II-Moleküle besetzt sind (Watts 1997). Das Antigen wird von APC phagozytiert, um dann durch proteolytische Prozesse in kleinere Fragmente geteilt zu werden (Watts 1997). Diese Fragmente werden dann an die Zellmembran der APC transportiert, wo sie von den MHC-II-Molekülen präsentiert und von Antigen-spezifischen T-Helferzellen erkannt werden (Watts 1997). Nach Identifizierung dieser Komplexe wird eine T-Zell-Aktivierung und eine weitere Aktivierung der APCs ausgelöst. Gemeinsam bewirken sie eine Stimulation der B-Lymphozyten, die sich zu Plasmazellen differenzieren und Antigen-spezifische Antikörper in Form von Immunglobulinen (Ig) sezernieren (Elson und Barker 2000). Jeder Defekt bzw. jede abnorme Stimulation der T-Helferzellen kann daher zu einer pathologischen Veränderung der Immunantwort führen. Bei Autoimmunerkrankungen verläuft dieser Pathomechanismus nach gleichem Schema, es handelt sich bei den beteiligten

Antigenen allerdings um körpereigene Strukturen. Autoimmunreaktionen resultieren daher unter anderem aus einem Verlust der normalen Selbsttoleranz und betreffen in der Humanmedizin etwa 5-7% der Population (Sinha et al. 1990).

1.2. Genetische Grundlage von Autoimmunerkrankungen

Manche der Genprodukte, die an der Entwicklung einer Autoimmunerkrankung beteiligt sind, interagieren direkt mit den Zellen des Immunsystems und verändern die Immunreaktion des Wirtes. Diese Genprodukte sind meist nicht krankheitsspezifisch und stellen oft nicht nur für eine einzelne Erkrankung eine Prädisposition dar. Dass ein an SLE erkrankter Patient Familienmitglieder aufweist, die an einer anderen immunbedingten systemischen oder organspezifischen Erkrankung leiden, ist häufiger als die Prävalenz jeder einzelnen Erkrankung in der Population (Shamim und Miller 2000). Ein anderes Zusammenspiel von Autoimmunerkrankungen umfaßt die Krankheiten DM Typ I, autoimmune Thyroiditis, Morbus Addison, autoimmunes polyendokrines Syndrom, Vitiligo und Zöliakie in verschiedensten Kombinationen (Verge und Eisenbarth 1992). Auch im Tierversuch wurde diese Beobachtung bestätigt: speziell für Diabetes-Versuche gezüchtete NOD-Mäuse (Non-Obese Diabetic Mouse), die an einem autoimmun bedingten DM litten, waren auch prädisponiert für eine andere organspezifische Autoimmunerkrankung (Bernard et al. 1992). Linkageanalysen unterstützen die Theorie, dass individuelle Genmutationen die Grundlage für eine Prädisposition für verschiedene Autoimmunerkrankungen darstellen können. Ein Beispiel dafür ist ein Polymorphismus im Gen, welches für das Interleukin-2 (IL-2) codiert. Diese Sequenzänderung ist sowohl mit dem Entstehen eines DM Typ I als auch einer Enzephalomyelitis assoziiert (Encinas 1999). Auch Mutationen innerhalb des CTLA-4-Gens sind wahrscheinlich sowohl an einer Prädisposition für DM Typ I, Zöliakie als auch autoimmuner Thyroiditis beteiligt (Donner et al. 1997).

Sequenzveränderungen innerhalb von Genen, deren Genprodukte eine Veranlagung für eine Autoimmunerkrankung darstellen, führen die Immunreaktionen nicht unbedingt durch eine Erhöhung der Aktivität des Immunsystems herbei. So weisen Tiere mit einer Prädisposition für eine Autoimmunität oft niedrigere Lymphozytenzahlen auf (Boillot et al. 1986). Daher bleibt nach wie vor offen, mit welchen Mechanismen Genveränderungen zu einer Autoimmunität führen.

1.3. Beteiligte Zellen bei Autoimmunerkrankungen

1.3.1. T-Zellen

T-Zellen sind maßgeblich an einer immunbedingten Reaktion beteiligt: Sie sind für die Aktivierung der B-Zellen und somit auch indirekt für die Bildung von Immunglobulinen verantwortlich. Die Selektion und Zerstörung unerwünschter autoreaktiver T-Zellen erfolgt bereits im fetalen Alter im Thymus (Gruel et al. 1986). Eine periphere Toleranz wird gebildet, wenn ausgereifte Lymphozyten, die der Selektion während der Ontogenese entkommen sind, Selbst-Antigenen in sekundären lymphoiden Organen begegnen und dort deletiert oder supprimiert werden (Romagnani 2006). Doch auch hierbei kann es zu Fehlregulationen kommen und autoreaktive T-Zellen entstehen, die speziell gegen bestimmte Antigene (z.B. Membranantigene von Blutzellen) gerichtet sind. Sie werden nicht im Thymus beseitigt und sind so auch im Alter im Blutkreislauf vorhanden (Filion et al. 1996). Die meisten sind inaktiv und lösen keine Autoimmunreaktion aus; für die anderen bestehen peripher verschiedene Mechanismen, die eine Aktivierung von fälschlich autoreaktiven T-Zellen unterbinden (Nossal 1983; Ramsdell und Fowlkes 1990). Dazu gehört u.a. eine Herabregulation durch kostimulierende Membranmoleküle wie dem CTLA-4 (Karandikar et al. 1996). Zusätzlich bewirken bestimmte Zytokine (CD4+, CD25+) eine Inhibition der Aktivierung und Proliferation von autoreaktiven T-Zellen. Durch eine Malfunktion dieser

regulierenden Faktoren kann sich eine Autoreaktion von T-Zellen im Organismus durchsetzen und so körpereigene Antigene angreifen (Kristiansen et al. 2000).

1.3.2. B-Zellen

Da Autoantikörper nur durch B-Zellen produziert werden, spielen die B-Zellen eine wichtige Rolle bei der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen. Genetische Analysen von Autoantikörpern bei ITP-Patienten haben ergeben, dass die B-Zellen eine klonale Expansion der T-Zellen bewirken und somatische Mutationen aufweisen (Roark et al. 2002). Die zentrale Selbsttoleranz supprimiert eine unerwünschte autoreaktive B-Zell-Populationsvermehrung. Entkommen manche B-Zellen diesem Kreislauf, bestehen nachfolgend periphere Mechanismen zur Aufrechterhaltung einer Selbsttoleranz. Zu diesen gehört ein Mitglied der Fc-Rezeptor-Familie, der Fc γ R2b, der an Zellen wie Neutrophile und Makrophagen gebunden- eine direkte Herabregulation der B-Zellaktivität bewirkt. Andererseits kann in diesem Szenario ein Ungleichgewicht zwischen aktivierenden und inhibierenden Fc-Rezeptoren auch zum direkten Entstehen einer Autoimmunreaktion führen (Takai 2002).

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Autoimmunität auf Zellebene unter anderem aus einer Dysfunktion der Eliminierung von selbst-reaktiven Lymphozyten entsteht, die in einer Störung des zentralen und/oder peripheren Selbsttoleranzmechanismus resultiert (Zhou et al. 2005).

1.4. Major Histocompatibility Complex (MHC)

Der Major Histocompatibility Complex (MHC) ist ein zusammenhängendes Cluster aus Genen, die für die Immunantwort wichtige Proteine codieren. Es handelt sich um die am meisten untersuchten Regionen des Genoms, nicht nur beim Menschen, sondern auch bei vielen anderen Spezies wie Mäusen und zahlreichen Primaten (Heise et al. 1987). Die Genprodukte des MHC interagieren in erster Linie mit T-Zell-Rezeptoren des Thymus und sind verantwortlich für die Präsentation von Fremd- und Autoantigenen für das Immunsystem. Diese Aufgabe ist unerlässlich bezüglich der Erkennung und Regulation der Immunantwort. Eine weitere wichtige Funktion des MHC liegt außerdem in der Erkennung und Eliminierung von infizierten oder veränderten Zellen sowie der Zellabstoßung in der Transplantationsmedizin (Meyer und Thomson 2001).

Der MHC besteht sowohl beim Menschen (Human Leukocyte Antigen, HLA), als auch beim Hund (Dog Leukocyte Antigen, DLA) aus drei zusammenhängenden Genclustern: Klasse-I, Klasse-II und Klasse-III. Schon seit längerem liegt die Aufmerksamkeit auf den Klassen I und II, die eine große Rolle bei der Immunantwort spielen (Guillet et al. 1987). Als Glykoproteine der Zelloberfläche sind sie verantwortlich für die Erkennung und Präsentation der Antigene. Der MHC-III dagegen ist unabhängig und versteht sich als ein Teil des Komplementsystems. Hierzu gehören die Komplementfaktoren C2, C4 und Bf (Heise et al. 1987). Im Gegensatz zum MHC-I und -II handelt es sich hierbei um eine Gruppe von Plasmaproteinen, die bei der unspezifischen Abwehr eine Rolle spielen.

Während der MHC-II unter den verschiedenen Spezies hoch konserviert ist und Analogien zwischen Hund und Mensch bestehen, ist der MHC-I sehr variabel und hat sich beim Hund sehr unabhängig von anderen Spezies entwickelt (Wagner et al. 1999).

In der Humanmedizin wurde 1999 erstmalig die Sequenz der gesamten MHC-Region, bestehend aus 3,6 Mbp, entschlüsselt und genkartiert (The MHC sequencing Consortium 1999). Es handelt sich beim HLA um 224 bekannte Loci, teilweise mit noch unbekannter Funktion. Nichtsdestotrotz haben Schätzungen zufolge 40% der exprimierten MHC-Gene eine immunologische Funktion (The MHC sequencing Consortium 1999). Seitdem wurde die Nomenklatur vielfach geändert, Sequenzdaten überarbeitet und verschiedene Variationen sowie Assoziationen mit diversen Krankheiten gefunden (Becker et al. 2004).

Die klassischen HLA-Gene werden beim Mensch mit dem Auftreten von über 100 Krankheiten in Verbindung gebracht, wie z.B. Atopie, autoimmune Pankreatitis, Hashimoto's Thyreoiditis, Inflammatory bowel disease (IBD), Myasthenia gravis oder SLE (Hall und Bowness 1996; Thorsby 1997; Lechler und Warrens 2000). Analog zum Menschen werden beim Hund Zusammenhänge des caninen MHC mit verschiedenen Krankheiten wie Leishmaniose (Quinnell et al. 2003), rheumatoide Arthritis (Ollier et al. 2001) und DM (Catchpole et al. 2005; Kennedy et al. 2006a) vermutet. Einerseits resultieren Erkrankungen aus der Kombinationen von verschiedenen MHC-Molekülen, die an verschiedenen Loci exprimiert werden. Andererseits können MHC-Loci im Zusammenhang mit viralen Infektionen, somatischen Mutationen oder molekularer Mimikry eine Reaktivierung von „stillgelegten“ autoreaktiven T-Zellen bewirken und einen Effekt auf eine Immunsuppression oder überschießende Immunreaktion haben (Christen und von Herrath 2004; Fournneau et al. 2004).

1.4.1. MHC und Autoimmunerkrankungen

Eine Assoziation des MHC mit einer Erkrankung ist definiert als ein vermehrtes oder vermindertes Vorkommen von einer oder mehreren Allelen bei einem Patienten verglichen zur Kontrollgruppe (Shiina et al. 2004). Daraus lässt sich ableiten, dass ein immunologischer Stimulus, der zum Ausbruch einer autoimmunen Erkrankung führt, von einem MHC-gebundenen Peptid und somit auch von einer limitierten Anzahl von potentiell autoaggressiven T-Zellen abhängt (Moller 1998).

Für die meisten Erkrankungen finden sich nicht ein oder zwei bestimmte Gene, die den Ausbruch der Krankheit verursachen, sondern eher eine genetische Kopplung (Linkage Disequilibrium), die für die Entstehung einer Krankheit komplett vererbt werden muss. Ein Beispiel dafür ist der DM Typ 1. Die positive Korrelation der HLA-DR3 und –DR4 und die negative Korrelation der HLA-DR2 Gene mit dem DM Typ 1 werden nur wirksam, wenn sie zusammen mit bestimmten HLA-DQ-Allelen als Haplotyp vererbt werden (Nepom und Kwok 1998b).

Derzeit bekannte Erkrankungen beim Menschen, die eine mögliche Assoziation mit dem MHC aufweisen, sind auf der Website der Genetic Association Database unter <http://geneticassociationdb.nih.gov/cgi-bin/tableview.cgi?table=diseaseview> aufgeführt. Auch wenn es sich dabei nicht nur um Autoimmunerkrankungen handelt, wird deutlich, dass sie eine große Zahl ausmachen. Die hohe Anzahl der Erkrankungen insgesamt zeigt, wie aktuell sich das Thema MHC und Krankheitsprädisposition darstellt und dass entsprechender Forschungsbedarf besteht.

1.4.2. Canine MHC

Die Erforschung des caninen MHC (Dog Leukocyte Antigen, DLA) begann Ende 1980. Die ersten DLA-Untersuchungen erfolgten mit Hilfe von serologischen und biochemischen Methoden (Doxiadis et al. 1989). Molekulare Bestimmungen des caninen MHC wurden in den 90er Jahren durchgeführt: Dabei wurden zuerst Gene des MHC-II untersucht, die eine Ähnlichkeit der DNA-Sequenz zum humanen MHC aufwiesen. Für alle Gene sind neben der ursprünglichen Sequenz auch viele Polymorphismen bekannt (Wagner et al. 1995; Wagner et al. 1996a; Wagner et al. 1998). Erstmals wurde auch versucht, eine Genkartierung für den DLA-Bereich zu erstellen. Für die anfängliche Sequenzierung unbekannter DLA-Daten wurden BAC-Klone (bacterial artificial chromosome) verwendet. Viele überlappende BAC-Klone sollten dann zusammen eine Genkarte des DLA ergeben (Wagner 2003).

1.4.2.1. MHC-I

Der canine MHC-I wurde erstmals 1998 sequenziert und auf Mutationen untersucht (Graumann et al. 1998). Er besteht aus den vier Genen DLA-12, DLA-64, DLA-79 und DLA-88. Zwei weitere Gene, DLA-53 und DLA-12a, sind bekannt als Pseudogene. Ein drittes Pseudogen wurde 2005 in einer Studie von Wagner entdeckt: das stress-induced Phosphorprotein 1 (STIP-1), welches höchstwahrscheinlich keine funktionelle Bedeutung hat und kein Startkodon besitzt (Wagner et al. 2005). Analog zu den Klasse-Ib-Genen der Humanmedizin HLA-E, -F und -G (Geraghty et al. 1990; Burnett und Geraghty 1995a) wurde auch im caninen MHC nach divergenten Klasse-I-Genen gesucht und dabei DLA-79 näher betrachtet (Burnett und Geraghty 1995a). Die MHC-I-Gene DLA-12, -64 und -88 befinden sich auf dem Chromosom 12 (Mellersh et al. 2000), DLA-79 hingegen ist auf dem Chromosom 18 lokalisiert (Burnett und Geraghty 1995a). Obwohl es sich beim DLA-79 definitiv um ein Klasse-I-Molekül handelt, weist es sowohl strukturell als auch in der Proteinkonstruktion Unterschiede zu den anderen Klasse-I-Molekülen auf. Eingehende Untersuchungen von DLA-79 haben ergeben, dass das DLA-79 eine veränderte Bindung von Antigenen zeigt, da DLA-79 im Gegensatz zu den anderen Klasse-I-Molekülen eine zusätzliche Aminosäure in der $\alpha 1$ -Domäne besitzt (Burnett und Geraghty 1995a). Die Exone 2 bis 4 codieren die drei extrazellulären Domänen ($\alpha 1-3$) der schweren Ketten der Klasse-I-Moleküle. Exon 7 codiert ein Phosphorylierungsmotiv, welches sowohl im humanen als auch im murinen Genom vorliegt. Die größten Unterschiede von DLA-79 zu den anderen Klasse-I-Genen liegt in der Exon 2/ $\alpha 1$ -Domain.

Polymorphe Stellen des Exon 2 des DLA-79 wurden in dieser Studie ebenfalls beschrieben und beinhalteten zwei Genvariationen, welche bei einem Portugiesischen Wasserspaniel an den Positionen 164, 185 und 194 (Asp-Asn, Phe-Val und Gly-Arg) sowie bei einem Koyoten an der Position 165 (Ala-Asn) auftraten (Burnett und Geraghty 1995a). DLA-79 wird am meisten in der Skelettmuskulatur, Milz und Thymus exprimiert (Burnett und Geraghty 1995a). Insgesamt wurden beim DLA-79 bisher vier Allele beschrieben (Graumann et al. 1998).

Die Gewebeexpression und die Funktion der anderen caninen Klasse-I-Gene sind im Gegensatz zu DLA-79 noch nicht näher untersucht worden, obwohl vermutet wird, dass sie wie bei anderen Spezies auch mit den zytotoxischen T-Lymphozyten interagieren (Wagner et al. 1999).

Allelvariationen im MHC-I wurden bisher für den DLA-88 beschrieben, dabei sind 48 Allele benannt worden (Kennedy et al. 2001). Möglicherweise bestehen für die Gene DLA-12 und DLA-64 auch jeweils zwei Allele (Graumann et al. 1998), allerdings wurden bisher noch keine veröffentlicht.

Die Vererbung von DLA-Haplotypen wurde in einer Mikrosatellitenstudie verfolgt. Dabei wurden zwei polymorphe Marker, einer für den MHC-I in der Nähe des DLA-53 (Burnett et al. 1995b) und der andere für den MHC-II in der Nähe des DLA-DRBB2 (Wagner et al. 1996b) lokalisiert. Die Untersuchung ergab, dass beide Marker über mehrere Generationen hinweg in 30 verschiedenen Pedigrees erhalten geblieben sind (Wagner et al. 1999).

1.4.2.2. MHC-II

Das erste Gen, das entdeckt wurde, welches die genetische Grundlage für eine Immunantwort auf bestimmte Antigene darstellte, war der MHC-II (Benacerraf 1981). Im Gegensatz zu MHC-I-Molekülen befinden sich MHC-II-Moleküle nur auf Antigen-präsentierenden Zellen wie Makrophagen, Monozyten und dendritischen Zellen. Interessanterweise sind MHC-II-Moleküle beim Hund im Gegensatz zu Mensch oder Maus auf fast allen Lymphozyten zu finden (Doxiadis et al. 1989). MHC-II-Moleküle sind für die antigen-spezifische Aktivierung von CD4⁺ T-Helfer-Lymphozyten verantwortlich.

Vom Aufbau her bestehen kaum Unterschiede zwischen dem MHC-II beim Menschen und beim Tier, z.B. dem Hund. Der MHC-II ist aus heterodimeren transmembranen Glykoproteinen, die in α - und β -Ketten unterteilt werden, zusammengesetzt. Verschiedene MHC-II Isotypen werden durch genetische Unterschiede im Bereich der α - und β -Ketten definiert (Tizard 2004b). Beim Menschen sind die Loci HLA-DR, -DQ und -DP bekannt. Der canine MHC-II umfasst die Isotypen DLA-DRA und -DRB mit dem Pseudogen DRB2 (Wagner et al. 1996a) Die Isotypen DLA-DQA und -DQB besitzen ebenfalls ein dazugehöriges Pseudogen (Wagner et al. 1998). Genloci, die den caninen MHC-II codieren, sind alle auf Chromosom 12 lokalisiert. Die Nomenklatur für den caninen MHC-II wurde erstmals im Jahr 1998 veröffentlicht (Kennedy et al. 1999) und 2001 aktualisiert (Kennedy et al. 2001).

Die Gene, die den caninen MHC codieren, sind extrem polymorph. Der letzte Report berichtet im MHC-II Bereich von 52 DLA-DRB Allelen, 16 DLA-DQA1 Allelen und 41 DLA-DQB Allelen (Kennedy et al. 2001). Diese Änderungen sind hauptsächlich in der putativen Peptid-Bindungsregion verankert (Wagner et al. 1995; Burnett und Geraghty 1995a; Graumann et al. 1998; Wagner et al. 1999) und bewirken fast immer eine Aminosäurenderung.

1.4.2.3. Dog Leukocyte Antigen (DLA) und Autoimmunerkrankungen

Seit der Verwendung von molekularbiologischen Methoden bei der Untersuchung von Assoziationen des caninen MHC mit Autoimmunerkrankungen wurden einige Krankheiten gescreent und die meisten signifikanten Zusammenhänge mit dem caninen MHC-II gefunden. Eine Zusammenfassung von relevanten Assoziationen des DLA mit Autoimmunerkrankungen wird in Tab. 1 wiedergegeben:

<i>Erkrankung</i>	<i>Anzahl Probanden</i>	<i>DLA-Assoziation</i>
Primäre Immunhämolytische Anämie	108	Risiko-Haplotypen: DRB1*00601, DQA1*005011, DQB1*00701; DRB1*015, DQA1*00601, DQB1*00301
Immunbedingte Polyarthrit	61	DRB1*002, DRB1*009, DRB1*018
Hypothyreose	173	DQA1*00101
Diabetes mellitus	460	Risiko-Haplotypen: DRB1*009, DQA1*001, DQB1*008; DRB1*015, DQA1*0061, DQB1*023; DRB1*002, DQA1*009, DQB1*001 Protektiver Haplotyp: DQA1*004, DQB1*013
Anfälligkeit für Leishmaniose	109	DRB1*01502 ist assoziiert mit einem hohen IgG-Serum-Titer und einem positivem PCR-Nachweis von Leishmanien
Dermatouveitis beim Akita	26	DQA1*00201 ist mit dem Fortschreiten der Erkrankung assoziiert
Analfurunkulose	107	DRB1*00101

Tab. 1: MHC-Studien in Zusammenhang mit immunbedingten Erkrankungen beim Hund (Day und Mackin, 2008b)

2. Vererbung

2.1. Autosomal dominanter Erbgang

Beim autosomal dominanten Erbgang überwiegt die Ausprägung eines Allels an einem heterozygoten Genort. Die Wirkung des rezessiven Allels ist nicht erkennbar, d.h. es kommt bereits im heterozygoten Zustand zur phänotypischen Ausprägung. Ist das Merkmal bei einem

Elternteil vorhanden, so treten im regulären Fall unter den Nachkommen 50% Merkmalsträger auf, bei Heterozygotenverpaarungen 75%. Bei autosomal dominanter Vererbung besteht das Merkmal in allen Generationen. Voraussetzung hierfür ist allerdings eine vollständige Penetranz und Expression des Gens. Liegen diese nicht zu 100% vor, kann sich das Verhältnis verschieben, bzw. Generationen können übersprungen werden. Man spricht hier auch von unregelmäßiger Dominanz (Wiesner und Willer 1993).

2.2. Autosomal rezessiver Erbgang

Beim autosomal rezessiven Erbgang tritt das Gen nicht im heterozygoten, sondern erst im homozygot rezessiven Zustand phänotypisch in Erscheinung. Heterozygote Tiere sind dann zwar Anlageträger und können das zur Merkmalsausprägung führende Allel auch zu 50% an ihre Nachkommen weitergeben, zeigen aber selbst keine Veränderung im Phänotyp. Das Merkmal wird jedoch dann sichtbar, wenn ein Nachkomme von beiden heterozygoten Elterntieren das rezessive Allel erhalten hat. Bei der Anpaarung heterozygoter Eltern ($Aa \times Aa$) treten nach den Mendel'schen Regeln 25% homozygote Merkmalsträger (aa) auf und weitere 50% der Nachkommen sind heterozygote Anlagenträger, die jedoch phänotypisch frei von dem Merkmal sind (Aa). Weitere 25% der Nachkommen sind sowohl phänotypisch als auch genotypisch merkmalsfrei (AA). Bei der Merkmalsausprägung können so Generationen übersprungen werden (Wiesner und Willer 1993; Murken et al. 1996).

2.3. Imprinting

Unter Imprinting versteht man die unterschiedliche Ausprägung eines Merkmals, in Abhängigkeit davon, ob das merkmalsprägende Allel vom Vater oder der Mutter übertragen wurde. Ein Phänotyp kann z. B. bei einem autosomal dominanten Erbgang somit nicht zur Ausprägung kommen, wenn paternales Imprinting vorliegt und das merkmalsprägende Allel vom Vater übertragen wurde. Wurde das merkmalsprägende Allel dagegen von der Mutter übertragen, wird die Wirkung des Allels nicht inaktiviert und das Merkmal phänotypisch ausgeprägt. Es kommt somit zu einer elternabhängigen Inaktivierung des jeweiligen Gens. Als Folge der Geninaktivierung können Gene betroffen sein, die ein Merkmal prägen oder Gene, die als Repressoren wirken und somit die Ausprägung eines Merkmals unterdrücken. Imprinting ist somit nicht generell mit der fehlenden Ausprägung eines Merkmals gleichzusetzen (Murken et al. 1996). Imprinting ist damit vielmehr ein Beispiel für die epigenetische Vererbung: die Weitergabe bestimmter Eigenschaften, die unterschiedliche phänotypische Auswirkungen haben können, ohne die Veränderung der DNA-Sequenz, sondern nur die der Genregulation und Genexpression (Janning und Knust 2004a). Zwei wichtige Mechanismen, die einen Einfluss auf die Genregulation und die Genexpression eines Organismus besitzen, sind die DNA-Methylierung und die Modifikation durch Histone. Dadurch wird die Transkription reguliert und unterschiedliche Genexpressionen bewirkt (Jaenisch und Bird 2003).

2.4. Multifaktorielle Vererbung

Viele Merkmale werden nicht nur von einem Gen beeinflusst, sondern von vielen Genorten mit ihren unterschiedlichen Allelen. Sind viele verschiedene Genorte an der Ausprägung eines Merkmals beteiligt, hat das einzelne Gen selbst nur eine sehr geringe Wirkung, während alle Gene zusammen das Merkmal bestimmen. Die Genwirkungen können additiv, dominant oder epistatisch sein. Je mehr Gene und verschiedene Allele pro Genort an der Merkmalsausprägung beteiligt sind, desto größer wird die Anzahl der möglichen Merkmalsausprägungen (Murken et al. 1996).

Meist sind auch Umweltfaktoren an der phänotypischen Ausprägung dieses Merkmals beteiligt. Man spricht daher von multifaktorieller Vererbung. Um das Auftreten von Krankheiten durch umweltfaktorielle Modelle zu erklären, wurde von Falconer das

Schwellenwertmodell eingeführt. Erst wenn eine bestimmte Anzahl von Genwirkungen vorliegt, kommt es zur Ausprägung der Krankheit. Reicht die Zahl der Gene und ihrer Wirkungen nicht aus, tritt die Krankheit nicht auf (Falconer und Mackay 1996).

2.5. Heterozygotie/ Homozygotie

Im Rahmen der genetischen Vielfalt und Individualität spielen auch die Homo- und Heterozygotie wichtige Rollen. Ein Individuum ist heterozygot für ein bestimmtes Merkmal, wenn ein Gen in einem diploiden Chromosomensatz in zwei verschiedenen Allelen vorliegt. Die phänotypische Ausprägung hängt davon ab, welches Allel dominant ist. Eine Homozygotie dagegen liegt vor, wenn für ein Merkmal in dem diploiden Chromosomensatz zweimal das gleiche, identische Allel zu finden ist (Wiesner und Willer 1993). Studien haben gezeigt, dass eine Population mit einer kleinen Anzahl von Allelen eine relativ hohe Frequenz von Homozygoten aufweist. Allerdings ist nachgewiesen, dass heterozygote Tiere einen Vorteil haben gegenüber den Homozygoten, da sie eine hohe Anzahl von Polymorphismen aufrecht erhalten können. So sind z.B. heterozygote Schafe mit bestimmten MHC-Allelen wesentlich resistenter gegen eine Nematoden-Infektion (Stear et al. 2005).

2.6. Die Mendel'sche Vererbung und Autoimmunität

Die meisten monogenetischen Erkrankungen weisen das Schema der Mendel'schen Vererbung auf (Nussbaum et al. 2001). Doch in einigen Fällen sieht man Erkrankungen mit einer deutlichen genetischen Komponente und gehäuften familiärem Auftreten, jedoch keine deutliche Vererbung nach Mendel'scher Vererbungstheorie. Nicht alle Mutationsträger entwickeln den erwarteten Phänotyp (Nussbaum et al. 2001). Dies wurde in einigen systematischen Familienstudien mit Erbkrankheiten beobachtet. Einflussfaktoren auf die Entstehung des erwarteten Phänotyps bestehen sowohl aus Umweltfaktoren, sowie einer Vielzahl genetischer und epigenetischer Komponenten. Variationen im normalen Zellregulationsprozess wie Transkription, Splicing, Translation (Dipple und McCabe 2000), Protein Folding, Oligomerisation und Translokation innerhalb einer Zelle (Proudfoot et al. 2002) sowie im Kontrollsystem (Proteasome, Chaperone, RNA-Regulation, oxidativer Stress) können Auswirkungen auf den entstehenden Phänotyp haben. Alle Stationen auf dem Weg zur Bildung eines Proteins können einen Einfluß darauf haben, dass Mutationsträger nicht den erwarteten Phänotyp präsentieren (Van Heyningen und Yeyati 2004). Bei manchen Krankheiten des Menschen, z.B. DM Typ 1 (Walter et al. 2003) oder Inflammatory Bowel Disease (IBD) (Girardin et al. 2003; Walter et al. 2003) werden erwiesenermaßen Umweltfaktoren wie Infektionen, chemische, medikamentöse oder auch Stressfaktoren als Trigger benötigt, obwohl es sich um autoimmune Erkrankungen handelt, deren Vererbbarkeit als gesichert gilt.

Van Heyningen berichtete 2004, dass in jedem Fall komplexe epigenetische Eigenschaften und Umweltfaktoren die Genexpression maßgeblich beeinflussen (Wolffe und Matzke 1999; Van Heyningen und Yeyati 2004). Jede genetische Mutation in einem Individuum ist einzigartig bezogen auf den jeweiligen physiologischen, genomischen und Umwelt-Kontext, so dass die Theorie einer ausschließlichen Mendel'schen Vererbung bereits überholt ist (Van Heyningen und Yeyati 2004).

3. Genetik des Hundes

Der Hund (*Canis lupus familiaris*) besitzt 39 Chromosomenpaare, wovon 38 Paare homolog sind. Sie werden auch als Autosomen bezeichnet. In ihnen ist die Zahl und Anordnung der Gene identisch. Das 39. Chromosomenpaar bilden die Gonosomen (Geschlechtschromosomen). Bei der Hündin ist auch dieses Chromosomenpaar homolog (XX), beim Rüden dagegen heterolog (XY).

Nach der Anordnung der merkmalsprägenden Gene auf den Autosomen und Gonosomen

lassen sich autosomale und geschlechtschromosomale Erbgänge unterscheiden. Der Ort, an dem sich ein Gen auf einem Chromosom befindet, wird als Genort oder Genlocus bezeichnet, die Ausprägung eines einzelnen Genes als Allel (Wiesner und Willer 1993).

3.1 Rassenprädisposition für Krankheiten beim Hund

Es sind über 800 Hunderassen bekannt, von welchen derzeit 340 beim FCI anerkannt sind (Stand 11/2008, [FCI-Allgemeine Informationen](#)). Für über 350 Erkrankungen ist bekannt, dass ein erblicher Hintergrund vorhanden ist. Dazu zählen u.a. die progressive Retinaatrophie beim Irish Red Setter (Petersen-Jones 1998), der Pyruvat-Kinase-Mangel beim Basenji (Whitney et al. 1994), die Von-Willebrand-Krankheit beim Dobermann (Riehl et al. 2000) sowie viele andere.

4. Immnhämolytische Anämie

4.1. Definition

Immnhämolytische Anämie (IHA) ist eine sehr häufig diagnostizierte Form der Anämie beim Hund (Day und Mackin, 2008a). Sie ist gekennzeichnet durch eine verkürzte Lebensdauer der Erythrozyten aufgrund von Antikörperbildung gegen körpereigene Erythrozyten. Die Antikörper entstehen infolge einer Immundysregulation oder Kreuzreaktivität und können sich gegen unveränderte oder veränderte Erythrozytenmembranen richten (Kohn und Giger, 2006a).

Man unterteilt die IHA in eine autoimmune primäre Form und eine immunbedingte sekundäre Form. Bei der primären IHA (pIHA) findet eine Immunreaktion gegen körpereigene, unveränderte Erythrozyten statt, die ohne bestimmte Stimuli auftritt. Bis zu 70% der diagnostizierten immnhämolytischen Anämien werden als primär klassifiziert (Reimer et al. 1999; Engelbrecht et al. 2002). Andere Studien berichten von einem geringeren Anteil der pIHA von 42,9% (Jones et al. 1992). Die pIHA kann sowohl allein oder auch zusammen mit einer immuninduzierten Thrombozytopenie gleichzeitig bei einem Hund vorkommen. Man spricht dann – analog zu der Bezeichnung in der Humanmedizin – vom Evans' Syndrom (Evans et al. 1951). Ungefähr 12% (Klag et al. 1993) bis 70% (Carr et al. 2002; Weiss und Brazzell 2006) aller an pIHA erkrankten Hunde zeigen dieses Syndrom. Bei der sekundären IHA (sIHA) liegen im Gegensatz zur pIHA Stimuli für eine Antikörperproduktion und veränderte Erythrozytenantigene vor. Gründe für eine sekundäre IHA sind akute oder chronische Infektionen durch Parasiten wie Ehrlichiose (Bexfield et al. 2005; Manzillo et al. 2006), Babesiose (Manzillo et al. 2006), Leishmaniose (Engelbrecht et al. 2002), *Ancylostoma caninum* (Lobetti und Schoeman 2001) oder durch Bakterien wie *Mycoplasma haemocanis* (Day und Mackin 2008a) oder *Anaplasma phagocytophilum* (Kohn et al. 2008). Aber auch lympho- und myeloproliferative Neoplasien (Weiss und Smith 2002; Mellanby et al. 2004), Medikamente (Schwartz et al. 2000; Mellor et al. 2005) oder Impfungen (Duval und Giger 1996; Weinkle et al. 2005) werden als Auslöser einer sIHA diskutiert. Desweiteren kann eine immnhämolytische Anämie im Rahmen einer multisystemischen Autoimmunerkrankung, dem systemischen Lupus erythematodes (SLE) (Fournel et al. 1992) oder nach inkompatiblen Bluttransfusionen (Cotter 1992) auftreten.

4.2. Primäre immnhämolytische Anämie (pIHA)

Bei der pIHA handelt sich um eine Immunreaktion, die ohne auslösende Stimuli eine antikörper- oder komplementvermittelte Zerstörung der Erythrozyten bewirkt. Die Diagnose wird anhand des Ausschlusses möglicher zugrundeliegender Ursachen gestellt. Bei der IHA handelt es sich um eine Typ-II-Immunantwort. Diese wird in fünf Subtypen eingeteilt (Tizard 2004a):

Subtyp I: Es handelt sich um eine Warmagglutination mit Agglutination in isotoner Kochsalzlösung mit Beteiligung von IgG und IgM. Klinisch zeigt sich eine intravasale Hämagglutination mit peraktem Verlauf und persistierender Erythrozytenagglutination.

Subtyp II: Hierbei handelt es sich um eine intravasale Hämolyse durch eine IgM-gesteuerte Komplementaktivierung. Sie zeichnet sich durch eine persistierende Erythrozytenagglutination aus und wird durch Warmagglutinine hervorgerufen.

Subtyp III: Bei dieser Form der IHA sind die Antikörper (meist IgG) nicht fähig, eine direkte Hämagglutination oder Lyse zu verursachen, führen aber trotzdem zu einer Zerstörung der Erythrozyten durch das mononukleäre Phagozytosesystem und somit zu einem akuten oder chronischen klinischen Verlauf. Wie beim Subtyp I und II handelt es sich beim Subtyp III auch um Warmagglutinine.

Subtyp IV: Dieser Subtyp wird durch Kälteagglutinine verursacht, die bei Temperaturen unter 37°C zu einer Agglutination führen. Hier sind häufig Antikörper vom Typ IgM, sehr selten IgG beteiligt.

Subtyp V: Das Immunglobulin, welches hier eine Rolle spielt, ist ebenfalls kältereagierend, aber nicht agglutinierend (IgM). Erythrozyten werden bei niedrigen Temperaturen zwar zerstört, eine Agglutination tritt aber nicht auf.

4.3. Ätiologie und Pathogenese

Bei der pIHA werden Autoantikörper gegen körpereigene Erythrozyten gebildet. Im Speziellen sind diese Autoantikörper gegen Membranproteine (anion-exchange-channel, CD233 oder Band-3) oder Glykophorinpeptide der Erythrozyten gerichtet (Tizard 2004a). Normalerweise werden die Autoantikörper von Suppressor-T-Zellen gehemmt. Bei Hunden mit pIHA wird vermutet, dass diese Tiere entweder ein schlecht reguliertes Suppressor-T-Zellsystem besitzen oder das normale Suppressor-T-Zellsystem mit einer Überstimulation des Immunsystems überfordert ist und daher autoimmune Reaktionen gegen normale Zellen zulässt (Tizard 2004a). Es wird zudem angenommen, dass auch gesunde Hunde Lymphozyten, die gegen Erythrozyten gerichtet sind, aufweisen, diese aber nur bei Hunden mit einer genetischen Prädisposition für die pIHA auch aktiviert werden können (Corato et al. 1997).

Für die Ätiologie der pIHA wurden verschiedene Möglichkeiten vermutet. Der Verlust der immunologischen Toleranz ist möglicherweise auf viele verschiedene Ursachen zurückzuführen wie molekulare Mimikry, polyklonale T- und/oder B-Zell-Aktivierung, Fehler in der zentralen sowie peripheren Toleranz, immunregulatorische Fehlsteuerungen oder auch Ignoranz der Erythrozyten-Eigenantigene (Day und Mackin 2008a). Ein Teil der möglichen Ätiologien wird im Folgenden erörtert.

4.3.1. Beteiligte Antikörper

Die Pathophysiologie der pIHA lässt sich – wie bereits beschrieben – in eine Wärmeagglutination und eine Kälteagglutination einteilen. Bei der Wärmeagglutination findet man beim Hund Autoantikörper vom Typ IgG und/oder Komplementfaktor C, die bei Körpertemperatur idealerweise an Erythrozyten binden (Tizard 2004a). Autoantikörper entstehen erst nach einer Präsentation von körpereigenen Antigenen durch MHC-Moleküle und deren Erkennung durch T-Zellen (s. Kapitel 1.3.1 und 1.3.2). Diese IgG-beladenen Erythrozyten werden mit Hilfe der Fc-Rezeptoren an Makrophagen gebunden und teilphagozytiert, es entstehen Sphärozyten. Diese sind nicht so formflexibel wie die adulten Erythrozyten und werden daher in den Milzsinusoiden gefangen und teilweise aus der Zirkulation entfernt (Day und Mackin 2008a). Als Folge von Speicherung und Abbauvorgängen der Erythrozyten in der Milz kommt es zur Splenomegalie (Warren und Collins 1988). Bei erhöhter Antikörperproduktion kann es auch zu einer Phagozytose der Erythrozyten in der Leber kommen (McCullough 2003). Bindet IgG am Erythrozyten, so

geschieht die Zerstörung meist extravaskulär, ohne den Einsatz von Komplementfaktoren. Besonders Erythrozyten-gebundene IgG1 und IgG3 haben eine starke Affinität zu den Fc-Rezeptoren. Sind die Erythrozyten mit viel IgG beladen, so kann es auch zu einer Komplementreaktion mit den Komponenten C3a und C3b kommen. Beide Faktoren verstärken mit IgG zusammen den Phagozytoseprozess. Die Destruktion der antikörperbeladenen Erythrozyten findet dann entweder verstärkt extravaskulär in den Kupfferzellen der Leber oder in der roten Pulpa der Milz statt oder es kommt zu einer intravasalen Hämolyse (Giger 2005).

IgM kann auch an der Pathogenese der IHA beteiligt sein. Im Gegensatz zu IgG können mit IgM beladene Erythrozyten Gewebemakrophagen nicht direkt aktivieren, da sie keine Fc-Rezeptoren für IgM besitzen. Der Abbau von IgM-beladenen Erythrozyten geschieht immer über das Komplementsystem. Diese führen dann meist zu einer intravaskulären Hämolyse (Giger 2005). Wenn allerdings die IgM-Konzentrationen niedrig sind und eine vollständige Komplementaktivierung von den regulatorischen Proteinen verhindert werden kann, kann auch nur der Komplementfaktor C3b an die Zelloberfläche binden und eine extravaskuläre Hämolyse herbeiführen (Giger 2005). Besonders bei der Kälteagglutination sind Autoantikörper vom Typ IgM und Komplementfaktoren (C3) beteiligt, da diese sich idealerweise bei Temperaturen von 0°C bis 4°C an die Erythrozytenmembran binden. Die C3-Aktivierung kann eine partielle oder komplette Phagozytose der gebundenen Erythrozyten durch Makrophagen nach sich ziehen (Engelfriet et al. 1992), welche sowohl eine extravaskuläre als auch intravaskuläre Hämolyse verursachen kann.

4.3.2. Die Rolle des MHC

Die genaue Ätiologie der pIHA ist nach wie vor unbekannt, man vermutet jedoch eine multifaktorielle Ätiopathogenese (Day und Mackin 2008a). In der Humanmedizin wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen der pIHA und dem humanen MHC eingehend untersucht (Abdel-Khalik et al. 1980; Lortholary et al. 1990; Nomura et al. 1998). Studien führten bisher allerdings zu unterschiedlichen Ergebnissen: Einem Allel des humanen MHC-Komplexes, dem HLA-DQ6, wurde eine negative Korrelation mit dem Auftreten von IHA postuliert. Dieses Allel codiert möglicherweise sogar ein Resistenzantigen für Erythrozyten-Antikörper (Wang-Rodriguez und Rearden 1996; Nomura et al. 1998). Die MHC-I-Allele HLA-B8 (Abdel-Khalik et al. 1980) und HLA-B27 (Lortholary et al. 1990) scheinen hingegen positiv mit dem Vorkommen von pIHA korreliert zu sein. Bei der Studie von Abdel-Khalik et al. (1980) wurden 20 an IHA erkrankte Patienten auf das MHC-I-Allel HLA-B8 untersucht. 40 gesunde Probanden dienten als Kontrollgruppe. HLA-B8 kam signifikant gehäuft bei den an IHA erkrankten Patienten vor wie auch eine deutliche Homozygotie des Allel HLA-Bw6 und eine signifikante Reduktion des Allel HLA-Bw4 bei diesen Patienten zu finden war.

Andere Studien beschäftigten sich mit einem möglichen Zusammenhang von bestimmten MHC-I-Allelen und dem Therapieerfolg. Bei der Behandlung von Humanpatienten mit pIHA stellte sich heraus, dass Patienten mit einer aplastischen Anämie, die das HLA-DR2 Allel besaßen, eher positiv auf immunsuppressive Behandlung reagierten (Rugman et al. 1990; Nakao et al. 1992). Dies sprach dafür, dass es sich bei Patienten mit einer aplastischen Anämie, die das Allel HLA-DR2 Allel besitzen, eher um eine Autoimmunreaktion handelt. In einer weiteren Studie wurde dann untersucht, ob bestimmte HLA-II-Allele mit einer autoimmunen aplastischen Anämie im Zusammenhang stehen könnten (Nakao et al. 1994). Dabei wurde festgestellt, dass Patienten mit einer aplastischen Anämie, die den MHC-Haplotyp DRB1*1501/DQA1*0102/DQB1*0602 besaßen, besser auf eine Cyclosporin-Therapie reagierten als Patienten mit einem anderen Haplotyp.

Beim Hund findet sich bisher eine einzige Studie über den Zusammenhang von pIHA und dem DLA-II (Kennedy et al. 2006b). Dabei wurden 108 an pIHA erkrankte Hunde getestet. Folgende Kriterien mussten erfüllt werden, um als krank eingestuft zu werden:

1. eine Anämie mit einem Hämatokrit unter dem Referenzbereich (37%-55%)
2. ein positiver Coombs-Test
3. keine Primärerkrankung, die zu einer Anämie hätte führen können.

Eine Überrepräsentation von Englischen Cocker Spaniern (16,5%) und Collies (13,8%) war in dieser Studie auffällig. Zusätzlich wurden 178 Kontrollhunde jener Rassen, die denen der an pIHA erkrankten Hunden entsprachen, MHC-typisiert. Dabei wurden die Haplotypen DLA-DRB*00601/DQA*005011/DQB*00701 und DLA-DRB*01501/DQA*00601/DQB*00301 als potentielle Risiko-Haplotypen für eine Erkrankung an pIHA definiert. Dagegen zeigten die Haplotypen DLA-DRB*001/DQA*00101/DQB*00201 und DLA-DRB*015/DQA*00601/DQB*02301 eine negative Korrelation zum Auftreten der IHA und wurden als protektive Haplotypen beschrieben (Kennedy et al. 2006b). Ein zweiter Testdurchlauf wurde mit Unterscheidung von Wärme- und Kälteagglutinationen durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, dass der Haplotyp DRB*00601/DQA*005011/DQB*00701 nur bei den Fällen mit einer Wärmeagglutination überrepräsentiert war, während der Haplotyp DRB*01501/DQA*00601/DQB*00301 sowohl bei den Wärme- als auch Kälteagglutinationen gehäuft vorkam. Der Haplotyp DRB*001/DQA*00101/DQB*00201 wurde in der Gruppe der wärmeagglutinierenden Patienten zwar seltener vorgefunden, war aber in der kälteagglutinierenden Gruppe deutlich erhöht. Der andere im ersten Testdurchlauf als protektiv bezeichnete Haplotyp DLA-DRB*015/DQA*00601/DQB*02301 war sowohl in der wärme- als auch in der kälteagglutinierenden Gruppe signifikant unterrepräsentiert. Ein dritter Testdurchlauf wurde unter Berücksichtigung der betroffenen Rassen durchgeführt und zeigte, dass Dobermänner keine MHC-Unterschiede zwischen kranken und gesunden Hunden aufwiesen. Bei den Collies fand sich eine nicht signifikante Unterrepräsentation von DLA-DRB*002/DQA*00901/DQB*00101, während gesunde Labrador Retriever – im Gegensatz zu den kranken Labrador Retrievern – den Haplotyp DLA-DRB*015/DQA*00601/DQB*02301 besaßen. 16 von 17 kranken Cocker Spaniern hatten den Haplotyp DLA-DRB*00601/DQA*005011/DQB*00701. Parallel dazu trugen aber auch 26 von 28 gesunden Cocker Spaniern den Haplotyp DRB*00601, 20 der gesunden Hunde den Haplotyp mit DQB*00701 und 12 gesunde Hunde einen Haplotyp mit DQB*02001. Bei den Englischen Springer Spaniern war der Haplotyp DLA-DRB*015/DQA*00601/DQB*00301 bei 31,3% der an IHA erkrankten Hunden vorhanden. Derselbe Haplotyp wurde im Vergleich dazu bei 20% der gesunden Hunde gefunden. Ebenfalls zeigten die erkrankten Hunde eine Häufung des Haplotypen DLA-DQB*00101/DQA*00201/DQB*01303 in 37,5% der Fälle, verglichen zu 13,3% in der gesunden Kontrollgruppe (Kennedy et al. 2006b). Die Ergebnisse zeigen, dass bestimmte genetische Prädispositionen für eine pIHA nachweisbar sind, jedoch abhängig von der erkrankten Rasse und der Pathophysiologie betrachtet bzw. bewertet werden müssen.

4.3.3. Familiäres Vorkommen

In der Humanmedizin wurde das vermehrte Vorkommen der IHA in einigen Familien untersucht und auch in Verbindung mit anderen Autoimmunerkrankungen gebracht. Bereits in den 60er Jahren wurde ein familiäres Vorkommen von IHA beschrieben: 20% der Patienten mit IHA hatten Verwandte, die an anderen immunbedingten Erkrankungen litten (Pirofsky 1968; Pirofsky 1969). Eine andere Studie von 1977 berichtete von dem Auftreten von IHA bei zwei Schwestern, die allerdings unterschiedliche Therapieansätze benötigten (Toolis et al. 1977). 1982 untersuchte Lippmann das Vorkommen von Autoimmunerkrankungen (IHA, ITP, Lupus erythematodes, rheumatoide Arthritis) in zehn Familien. Unterschieden wurde zwischen Familienmitgliedern, die eine Autoimmunerkrankung aufwiesen und angeheirateten Probanden. Interessanterweise wiesen die Familienmitglieder zu 21% eine Immunerkrankung auf, im Gegensatz zu 0% bei den Nicht-Blutsverwandten. Ebenfalls zeigten in acht Familien

mit SLE 44% der Blutsverwandten serologische Veränderungen, während angeheiratete Personen nur zu 4% eine serologische Veränderung aufwiesen (Lippman et al. 1982). Es wurde eine Vererbung von IHA, ITP und SLE nach dem autosomal-dominanten Modell vermutet.

Die IHA beim Hund zeigte ein deutliches familiäres Vorkommen in Pedigrees, in denen Autoimmunerkrankungen auftreten (Dodds 1983). Dodds fand je in einem Vizsla-Pedigree und in einer Scottish Terrier-Familie ein gehäuftes Vorkommen von IHA und Coombs-positiven Hunden. Die vier Generationen umspannende Vizsla-Familie zeigte, dass eine Schwester und vier Töchter der Probandin einen positiven Coombs-Test aufwiesen. Der Coombs-Test wurde jedoch jeweils nach einer Ovariohysterektomie negativ. Die Scottish Terrier-Familie umfasste zwei Probanden, die beide an einer hämolytischen Anämie starben. Die Mutter des einen Probanden war gleichzeitig die Großmutter des zweiten verstorbenen Probanden. Zusätzlich wurden im selben Pedigree sechs weitere Hunde gefunden, die Coombs-positiv waren. Alle Hunde waren auf dasselbe Urahnennpaar zurückzuführen.

Eine Segregationsanalyse zur systematischen Klärung der Heritabilitätsrate wurde in beiden Pedigrees nicht durchgeführt. Weiterhin trat die IHA als Begleiterkrankung bei caninem SLE auf, welcher ebenfalls ein familiäres Auftreten zeigen kann (Hubert et al. 1988). Familiärer SLE wurde in einer Schäferhundfamilie gefunden: von 16 Familienmitgliedern wiesen 10 Hunde antinukleäre Antikörper (ANA) auf, davon zeigten 5 Hunde klinische Symptome eines SLE. Betroffen waren Hunde bis in die dritte Generation, in welcher auch noch zwei Hunde schwer klinisch an SLE erkrankten (Monier et al. 1988). Eine weitere Studie berichtete neben einem familiären Auftreten von SLE in einem Schäferhund-Pedigree auch von möglichen prädisponierenden MHC-Allelen (Teichner et al. 1990). Daher kann eine genetische und familiäre Komponente beim caninen SLE nicht mehr ausgeschlossen werden und könnte somit einen Effekt auf die genetischen Ursachen einer IHA haben.

4.3.4. Prädispositionen

In vielen Studien wird bei der pIHA eine Prädisposition bestimmter Rassen beschrieben. Dazu zählen insbesondere der Englische Cocker Spaniel (Dodds 1977; Klag et al. 1993; Kellerman et al. 1995; Day 1996; Reimer et al. 1999; Burgess et al. 2000; Scott-Moncrieff et al. 2001; Carr et al. 2002; Engelbrecht et al. 2002; Miller et al. 2004; Weinkle et al. 2005; Kennedy et al. 2006b) und der Amerikanische Cocker Spaniel (Giger 2005). Daneben wurde über ein gehäuftes Vorkommen von pIHA beim Pudeln (Dodds 1977; Kellerman et al. 1995; Reimer et al. 1999) und Bobtail (Williams und Maggio-Price 1984; Jans et al. 1990; Engelbrecht et al. 2002), Zwergschnauzer (Reimer et al. 1999; Burgess et al. 2000; Scott-Moncrieff et al. 2001; Weinkle et al. 2005), Englischen Springer Spaniel (Reimer et al. 1999), Collie (Klag et al. 1993; Reimer et al. 1999; Burgess et al. 2000; Miller et al. 2004; Kennedy et al. 2006b), Labrador Retriever, Bichon Frise (Miller et al. 2004), Zwergpinscher (Miller et al. 2004), Finnish Spitz (Miller et al. 2004) sowie Irish Red Setter (Dodds 1977) berichtet.

Zudem wurde ein saisonales Auftreten der pIHA in einigen Untersuchungen beobachtet. Diese zeigten ein erhöhtes Vorkommen der pIHA im Frühjahr und Sommer: Es wurde festgestellt, dass 40% der Fälle im Mai und Juni auftraten (Jackson und Kruth 1985; Day 1999). Andere Studien wiederum konnten keinen saisonalen Charakter der pIHA finden (Burgess et al. 2000; Weiss und Brazzell 2006). Für akute klinische Episoden einer pIHA wurden zusätzlich bestimmte Stressfaktoren wie Trächtigkeit und Östrus sowie Geburt und Läufigkeit verantwortlich gemacht (Day und Mackin 2008a). Diese These führte zu einem möglichen Zusammenhang zwischen einem familiären Auftreten von IHA und Erkrankungen des Reproduktionstraktes bei den an IHA erkrankten Hündinnen (Dodds 1983).

Eine Häufung von kranken weiblichen Tieren zeigte sich in sehr vielen Veröffentlichungen (Miller et al. 2004; Weinkle et al. 2005). Besonders weiblich kastrierte Hündinnen waren häufiger betroffen als männliche Hunde (Scott-Moncrieff et al. 2001; Carr et al. 2002). Eine

Studie berichtete sogar von einer Überrepräsentation von sowohl weiblichen Hunden als auch kastrierten Hunden beider Geschlechter (Weinkle et al. 2005). Allerdings war in anderen Studien das Geschlechterverhältnis zugunsten der männlichen Tiere verschoben (Engelbrecht et al. 2002) oder auf die Geschlechter annähernd gleich verteilt (Klag et al. 1993).

4.4. Anamnese und Klinik

Die Anamnese spielt eine wichtige Rolle bei der Diagnosestellung und zur Unterscheidung zwischen primärer und sekundärer IHA. Im Wesentlichen wird Wert auf Auslandsaufenthalte, Art und Zeitpunkt der letzten Impfung und Läufigkeit, vorausgegangenen Medikamentengaben, chronischen Erkrankungen, Zeckenbefall und Aufnahme von möglichen Toxinen oder Zwiebeln gelegt.

Die pIHA kann unterschiedliche klinische Manifestationen aufweisen, die je nach beteiligter Antikörperklasse und Schweregrad der Hämolyse variieren. Zu den Symptomen der Anämie zählen neben blassen Schleimhäuten, Ikterus und Schwäche auch diese, die durch eine Hypoxie in Organsystemen wie Leber, Lunge, Herz, Niere und Darm ausgelöst werden (McCullough 2003). Symptome einer akuten Anämie können Kollaps, Tachypnoe, Tachykardie und Anorexie sein (Day und Mackin 2008a). Eine Dyspnoe kann Zeichen eines pulmonalen Problems, z. B. einer Thromboembolie sein (Giger 2005). Bei Vorliegen der sehr seltenen Kälteantikörper können Zyanose und Nekrose an den Extremitäten ohne Anämie in der kalten Jahreszeit auftreten (Kohn und Giger 2006a).

Typische Laborbefunde, die jedoch nicht alle gleichzeitig und bei allen Fällen vorkommen, sind: 1. Makroskopische oder mikroskopische Erythrozytenagglutination, die in einem Teil der Fälle nach dreimaligem Waschen der Erythrozyten in physiologischer NaCl-Lösung persistiert, und 2. zahlreiche Sphärozyten im Ausstrich (Kohn und Giger 2006a). Häufig findet man eine ausgeprägte Leukozytose mit oder ohne Linksverschiebung, Bilirubinurie, Hyperbilirubinämie sowie Hämoglobinämie und -urie bei der selteneren intravaskulären Hämolyse. Ebenfalls sind oft die Leberenzyme, insbesondere die ALT erhöht. Eine Thrombozytopenie tritt auf, wenn die pIHA durch eine Disseminierte intravasale Gerinnung (DIC) kompliziert wird oder die IHA in Kombination mit einer immunbedingten Thrombozytopenie auftritt (Evans' Syndrom) (Kohn und Giger 2006a).

4.5. Diagnose

Bei einem Hund mit Verdacht auf IHA sollten labordiagnostische Untersuchungen neben der Suche nach auslösenden Faktoren, die eine sIHA bedingen, im Vordergrund stehen. Zu den labordiagnostischen Untersuchungen gehören ein vollständiges Blutbild und die Bestimmung klinisch-chemischer Parameter, ein Blutausstrich zur Beurteilung der Erythrozytenmorphologie, Gerinnungsparameter und Untersuchung auf mögliche zugrunde liegende Infektionserkrankungen. Die Diagnose wird mit Hilfe eines Coombs-Tests bestätigt. Zusätzlich werden mit Hilfe von Röntgen und Sonographie mögliche Primärerkrankungen ausgeschlossen.

4.5.1. Erythrozyten und Hämatokrit

Die mittlere Überlebenszeit von Erythrozyten beim Hund beträgt 100 - 120 Tage (Giger 2005). Bei der IHA ist die Überlebenszeit deutlich verkürzt, was zu erniedrigten Hämatokritwerten (Hkt) führt: Ein Hkt zwischen 9% und 33% (M 17,6) wurde bei an IHA erkrankten Hunden zur Zeit der Diagnose bestimmt (Day 1996a). Andere Studien zeigten einen durchschnittlichen Hkt bei den untersuchten Hunden von 15% (Klag et al. 1993) sowie zwischen 10% und 23% (M 16,6%) (Engelbrecht et al. 2002). Weinkle et al. (2005) fanden bei 151 Patienten bei Erstvorstellung Hkt-Werte zwischen 4% bis 35% (M 15%). Von den untersuchten und an IHA erkrankten Hunden litten 88% an einer schweren Anämie mit einem Hämatokrit von unter 20% (Klein et al. 1989). In einer anderen Studie wiesen bis zu 98%

aller erkrankten Hunde ein Packed Cell Volume (PCV, Mikrohämatokrit) von <25% auf (Burgess et al. 2000).

4.5.2. Sphärozyten

Sphärozyten sind Erythrozyten, die durch Teilphagozytose durch das mononukleäre Phagozytosesystem eine Membranschädigung erlitten haben. Es handelt sich dabei um Kugelzellen ohne zentrale Eindellung (Kohn und Giger 2006a). Eine Sphärozytose ist nahezu pathognomisch für die IHA (Day und Mackin 2008a). 79% bis 95% der an IHA erkrankten Hunden haben eine Spärozytose (Reimer et al. 1999; Carr et al. 2002; Weinkle et al. 2005). Im Gegensatz dazu sind Sphärozyten bei Komplement-vermittelter Hämolyse selten nachzuweisen, da hierbei durch die intravaskuläre Hämolyse eine komplette Zerstörung der Erythrozyten stattfindet.

4.5.3. Erythrozytenagglutination

Eine Agglutination der Erythrozyten wird durch IgM oder IgG bewirkt. Eine Agglutination, die auch nach dreimaligem Waschen mit physiologischer Kochsalzlösung persistiert, kann als nahezu pathognomisch für eine IHA angesehen werden (Autoagglutination) (Klag et al. 1993). Agglutination muss von Rouleaux-Bildung (Geldrollen-Bildung) unterschieden werden. Aus bisher nicht bekannten Gründen haben Erythrozyten die Eigenschaft, in Anwesenheit von Plasma bei kälteren Temperaturen unspezifisch zu agglutinieren. Die Zugabe eines Tropfens physiologischer Kochsalzlösung zu einem Tropfen Blut führt bei gesunden Tieren zum Aufbrechen dieser unspezifischen Agglutination. Bricht die Agglutination nicht auf, so ist es wichtig zu bestimmen, ob die Agglutination nach dreimaligem Waschen mit physiologischer Kochsalzlösung persistiert, was als wahre Autoagglutination bezeichnet wird (Giger 2005).

In einigen Studie wurde eine Agglutination bei 40% (Scott-Moncrieff et al. 2001), 42% (Carr et al. 2002) oder 52% (Duval und Giger 1996) aller an IHA erkrankten Hunde gefunden. In diesen Studien wurde eine Autoagglutination definiert als persistierende Agglutination nach Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung, ein Waschen der Erythrozyten wurde allerdings nicht durchgeführt. Engelbrecht et al. (2002) hingegen fanden bei allen Hunden (n = 23) mit pIHA eine makroskopische Erythrozytenagglutination.

4.5.4. Direkter Coombs-Test (Direkter Antiglobulin-Test, DAT)

Der direkte Coombs-Test dient dem Nachweis von Erythrozyten-gebundenen Antikörpern und Komplementfaktoren. Dieser Test kann sowohl für eine Warmagglutination bei 37°C als auch für eine mögliche Kaltagglutination bei 4°C durchgeführt werden. Ein positiver Coombs-Test ist wichtig zur Diagnosestellung einer IHA (Giger 2005).

5. Immunbedingte Thrombozytopenie

5.1. Definition

Eine immunbedingte Thrombozytopenie ist charakterisiert durch die Bindung von Antikörpern an die Thrombozytenmembran sowie die vorzeitige Zerstörung der Thrombozyten durch das mononukleäre Phagozytosesystem (MPS) (Halliwell 1978). Die normale Überlebenszeit der Blutplättchen (7 Tage) wird dadurch deutlich verkürzt (Kohn und Giger 2006b). Die Entfernung der Plättchen erfolgt schneller aus der Blutzirkulation als die Knochenmarkproduktion sie erfolgreich kompensieren kann. Die Antigene auf den Plättchen werden von Fcγ-Rezeptoren, die auf Makrophagen lokalisiert sind, erkannt und gebunden. Obwohl in den meisten Fällen eine erhöhte Produktion im Knochenmark zu beobachten ist, treten auch Fälle auf, in denen die Megakaryoerytopoiesis von Anti-Tc-Antikörper blockiert

werden (Zhou et al. 2005). Beteiligt sind fast immer plättchenassoziierte Immunglobuline, besonders IgG, und/oder C3 (Karpatkin et al. 1971; Nel et al. 1983).

Wie bei der immunhämolytischen Anämie wird die immuninduzierte Thrombozytopenie in eine primäre und sekundäre Form eingeteilt. Bei der primären ITP (pITP), auch idiopathische ITP genannt, ist der Stimulus für die Antikörperproduktion unbekannt, es handelt sich hierbei immer um eine Ausschlussdiagnose (Lewis und Meyers 1996a).

Die sekundäre immuninduzierte Thrombozytopenie (sITP) hingegen beruht im Gegensatz zur pITP nicht auf autoimmunen Vorgängen: Einerseits wird die Antikörperproduktion durch Primärerkrankungen getriggert, andererseits werden auch Thrombozytenantigene durch äußere Stimuli so verändert, dass eine sITP entstehen kann. Zu den Auslösern einer sITP gehören Infektionserkrankungen wie Ehrlichiose (Lewis et al. 1995b; Grindem et al. 1999), Babesiose (Nagata 1993; Lewis et al. 1995b), bakterielle Infektionen (Wilkins et al. 1973), Anaplasiose (Kohn et al. 2008) sowie virale Infektionen (Breitschwerdt 1988). Immunreaktionen mit den Thrombozyten werden durch eine veränderte Immunregulation, Präsentation der Bakterien- oder Viren-Antigene auf der Thrombozytenoberfläche, Hapten-induzierte oder auch Immunkomplex-vermittelte Zerstörung der Plättchenmembran herbeigeführt (Hoskins et al. 1988). Andere Gründe einer sITP können Medikamente (Moss 1980), Neoplasien (Engelbrecht et al. 2002) oder Impfungen (Dodds 1983a) sein. Wie bei der siHA kann auch die sITP im Rahmen einer anderen Autoimmunerkrankung, dem SLE, vorkommen (Lewis et al. 1995b).

5.2. Primäre immunbedingte Thrombozytopenie (pITP)

Die pITP ist ebenfalls unter den Namen idiopathische thrombozytopenische Purpura (Aster 1989), immune Thrombozytopenie (McMillan 1983) und autoimmune thrombozytopenische Purpura (Karpatkin et al. 1981) bekannt. Bei der pITP handelt es sich um eine Autoimmunerkrankung, die Antigene auf der Thrombozytenmembran sind körpereigene und unveränderte Antigene.

5.3. Ätiologie und Pathogenese

Die Ätiologie der pITP ist sowohl beim Menschen als auch beim Hund bisher ungeklärt, allerdings wurden – anhand der Pathogenese – bereits verschiedene Hypothesen darüber aufgestellt, wie es zu einer plättchendeterminierten T-Helferzell-Aktivierung kommen kann.

5.3.1. Beteiligte Antikörper und Zielantigene

In der Humanmedizin ließ sich bei 90% der Patienten mit ITP eine erhöhte Menge an oberflächengebundenem IgG nachweisen (Court et al. 1987). Allerdings fanden sich bei 95% der Patienten mit chronischer ITP sowohl IgG-Antikörper allein als auch in Kombination mit IgA oder IgM. Nur 5% der Fälle wiesen IgM-Ak allein auf (von dem Borne et al. 1980). Beim Hund geht man derzeit davon aus, dass an der Oberfläche der Plättchen gebundene Antikörper der Klasse IgG angehören, die mit einem direkten ELISA nachgewiesen werden konnten. 19 an ITP erkrankte Hunde wiesen 1000-34000 plättchenassoziierte IgG-Moleküle/Thrombozyt auf, die die Werte von gesunden Hunden mit 1000-5000 IgG-Moleküle/Thrombozyt deutlich überstiegen (Lewis und Meyers 1996b). Sowohl beim Menschen als auch beim Hund werden die antikörpergebundenen Thrombozyten durch Makrophagen des RES zerstört (Jain und Switzer 1981). Dabei werden Plättchen, die nur gering mit Antikörpern beladen sind, primär durch Makrophagen der Milz, Plättchen, die schwer beladen sind, durch Makrophagen der Milz und der Leber phagozytiert. Die Plättchen überleben nur wenige Minuten bei Patienten mit ITP (Shulman und Reid 1994). Beim Hund wurde die Überlebenszeit von antikörperbeladenen Plättchen noch nicht untersucht (Lewis und Meyers 1996b).

Von allen bekannten Plättchenantigenen, die möglicherweise Autoantigene darstellen könnten, ist das Glycoprotein GPIIb/IIIa am besten untersucht. GPIIb/IIIa ist ein Plättchenintegrin, welches aktivierungsabhängig ein Rezeptor für Fibrinogen, Fibronektin und dem von-Willebrand-Faktor darstellt (Brooks und Catalfamo 2005). Beim Hund wurden bisher die Glykoproteine IIb und IIIa bei einem Hund und das GPIIb allein bei drei Hunden identifiziert (Lewis und Meyers 1996b).

5.3.2. Beteiligte Zellen

1991 konnte gezeigt werden, dass die humane chronische ITP auf einem CD4+-T-Zell-Defekt beruht, wodurch periphere T-Zellen nach Stimulation mit autologen Plättchen IL-2 produzierten (Semple und Freedman 1991). IL-2 ist das wichtigste Signal für die T-Helferzelle. Nach Erkennen des Antigens, welches durch den MHC-II-Rezeptor auf Lymphozyten präsentiert wird, schüttet die T-Helferzelle IL-2 aus. Dieses Signal wirkt hauptsächlich autokrin auf die T-Helferzelle. Durch eine intrazelluläre Signalkaskade kommt es zur Aktivierung und klonaler Teilung der T-Zellen. Neben der autokrinen T-Zellaktivierung wirkt IL-2 auch auf B-Lymphozyten und natürliche Killerzellen mit dem gleichen Effekt. Daraus lässt sich ableiten, dass die pITP unter anderem aus einem T-Helferzellen-Defekt resultiert, welcher autoreaktive B-Zellen dazu anregen kann, sich zu differenzieren und IgG zu bilden (Ware und Howard 1993).

5.3.3. MHC und ITP

Karpatkin hat sich in den 80er Jahren intensiv mit einer möglichen genetischen Prädisposition der pITP beschäftigt und in diesem Zusammenhang die Rolle des MHC untersucht (Karpatkin et al. 1981). Bereits 1981 wurde ein gemeinsamer Haplotyp bei vier humanen Familienmitgliedern, die allesamt an ITP litten, erkannt. Es handelte sich dabei um zwei Gene: dem MHC-I-Allel HLA-B8 und dem MHC-II-Allel, HLA-DR3 (Karpatkin et al. 1981). Seitdem wurde in zahlreichen Studien ein möglicher Zusammenhang zwischen MHC-Allelen und der pITP charakterisiert. Allerdings waren die Resultate kontrovers. Eine Studie untersuchte HLA-A, -B und -C und HLA-DR bei an ITP erkrankten Menschen und konnte keine signifikante Assoziation finden, obwohl HLA-Bw38 gehäuft bei ITP-Patienten vorkam (Helmerhorst et al. 1982). Eine weitere Studie über den Zusammenhang zwischen der ITP und HLA-A, -B, und -C und HLA-DR und -DQ mit Hilfe der Untersuchungen von Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLP) führte auch zu dem Ergebnis, dass keine Assoziation zwischen dem Auftreten der ITP und MHC-I bzw. MHC-II-Allelen bestand (Gaiger et al. 1994). Die Problematik in dieser Untersuchung war es, zwischen primärer ITP und sekundärer ITP zu unterscheiden. Daher wurden die Patienten in Untergruppen eingeteilt: eine erste Gruppe mit Probanden, die sich nach einer Steroidtherapie oder Splenektomie gebessert hatten, und eine zweite Gruppe mit Probanden, die nach einer Steroidtherapie und Splenektomie keine Besserung aufwiesen. Hierbei konnte festgestellt werden, dass die Patienten, die sich auf Splenektomie gebessert hatten, dem Genotypen HLA-DPB*0402 angehörten. Aber dies war statistisch nicht signifikant (Gaiger et al. 1994). 2002 fiel in einer Veröffentlichung auf, dass HLA-A2 häufiger bei ITP-Patienten auftrat, besonders bei den weiblichen Patienten. Zudem war HLA-A2 das Allel, welches in erhöhter Frequenz bei den Patienten gefunden wurde, die sich nachweislich nach einer Splenektomie besserten. Allerdings waren diese Ergebnisse ebenfalls nicht signifikant und bedürfen Untersuchungen mit einer höheren Anzahl von Probanden (Stanworth et al. 2002).

Andere Studien wiederum berichteten von statistisch signifikanten Assoziationen zwischen bestimmten MHC-Allelen und ITP-Patienten: In einer Veröffentlichung von 1977 wurden überwiegend HLA-B8 und -B12 bei erwachsenen ITP-Patienten gefunden (Goebel et al. 1977). Zwei Jahre später wurde ein Zusammenhang zwischen juveniler akuter ITP und HLA-Aw32 (Evers 1979) und zehn Jahre später eine Verbindung zwischen HLA-A28 und

chronischen ITP-Patienten bestätigt (el-Khateeb et al. 1986). Auch HLA-DRw2 war im Linkage Disequilibrium mit HLA-A3 und HLA-B7 oder auch mit HLA-A26 und HLA-Bw38 signifikant bei manchen ITP-Patienten erhöht (Karpatkin et al. 1979). Eine weitere Studie fand eine erhöhte Frequenz von HLA-Bw56, einer Abspaltung von HLA-Bw22, sowohl bei an ITP erkrankten Erwachsenen, als auch bei an ITP erkrankten Kindern (Gratama et al. 1984). Zudem konnte in dieser Studie festgestellt werden, dass Patienten mit einer niedrigen HLA-DR4 Frequenz wesentlich besser auf eine Prednisolon-Therapie reagierten. Auch die Reaktion der Patienten auf eine Splenektomie wurde mit dem HLA-Status in Verbindung gesetzt. Dabei wurde festgestellt, dass bei allen 22 Patienten, die sich nach einer Splenektomie nicht erholt hatten, das HLA-LB4, einer Abspaltung von HLA-DR4, fehlte (Gratama et al. 1984).

In einer japanischen Studie wurden 83 japanische, an ITP erkrankte Patienten auf MHC-II Allele im Zusammenhang mit den Ig-Allotypen im Vergleich zu 114 gesunden Kontrollpatienten untersucht. Zusammengefasst konnten folgende Ergebnisse aufgezeigt werden:

1. Ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von ITP und dem DPB1*0201.
2. Eine selteneres Vorkommen des Haplotyps DRB1*0101/DQB1*0501/DPB*0402 bei an ITP erkrankten Patienten.
3. Das Vorliegen des Haplotyps DRB1*0405/DQB1*0401 und anti-GPIIb-IIIa-Antikörpern korrelierte positiv mit einer schlechten Effizienz einer Splenektomie.

Ein möglicher Zusammenhang zwischen MHC-Allelen und den Zielglykoproteinen wurde in einer Studie von Kuwana festgestellt: Deutliche Assoziationen wurden zwischen Antikörper, die gegen GPIIb/IIIa gerichtet sind und dem Haplotyp DRB1*0803/DQB1*0601 und zwischen GPIb/IX-Antikörper und dem Haplotyp DRB1*0405/DQB1*0401 gefunden (Kuwana et al. 2000). Daraus ließ sich schließen, dass die Produktion der bei der ITP beteiligten anti-Glykoproteine von bestimmten HLA-II-Genprodukten beeinflusst wird. Pathogene anti-Glykoprotein-Antikörper banden vermutlich an die Oberfläche von Plättchen, damit reflektierte die Menge der anti-Glykoprotein-Ak die autoimmune Situation im Körper der ITP-Patienten. HLA-II-Genprodukte scheinen dieser Studie nach eine limitierte Rolle bei der Prädisposition für die ITP zu spielen, allerdings sind diese Genprodukte involviert bei der Produktion von anti-Glykoprotein-Antikörpern (Kuwana et al. 2000).

5.3.4. Familiäres Vorkommen

Wie bei der pIHA wurde in den 60er Jahren auch das familiäre Auftreten von ITP beim Menschen eingehend untersucht (Wooley 1956; Wilson et al. 1963). 1978 wurde in einer Studie die Familienhistorie von ITP-Patienten auf immunbedingte Erkrankungen untersucht. Dabei wurde von einem an ITP erkrankten Mädchen berichtet, deren Vater an rheumatoider Arthritis litt und eine Tante mütterlicher Seite nach zwei Episoden einer Hepatitis ebenfalls eine ITP entwickelte. Bei einem zweiten ITP-Patienten wurde festgestellt, dass der Vater eine verkürzte Thrombozytenüberlebenszeit aufwies. Diese Studie zeigte auch, dass die ITP-Patienten gemeinsam mit den Familienmitgliedern mit immunologischen Defekten einen gleichen HLA-Haplotypen aufwiesen. Dies unterstreicht ein mögliches familiäres Auftreten der ITP und eine mögliche genetische Grundlage (Stuart et al. 1978). Eine Studie, die an der Johns Hopkins Universität (Baltimore, Maryland) durchgeführt wurde, zeigte, dass von 21 chronischen ITP Patienten 3 einen Verwandten besaßen, der auch an der ITP gelitten hatte (Conley 1981). Erst kürzlich wurde bei mehreren Patienten eine positive Familienhistorie entdeckt (Rischewski et al. 2006). Hier wurde festgestellt, dass 2,3% der 445 registrierten ITP Patienten von positiven Fällen (ITP, anderer Art von Zytopenie oder Autoimmunerkrankung) in der Familie berichten konnten. Sogar 80% dieser Patienten hatten einen betroffenen Verwandten zweiten Grades. Einer der Probanden litt am Evans' Syndrom, ferner konnte

gezeigt werden, dass der Vater und zwei Onkel von ITP betroffen waren. Eine Segregationsanalyse wurde nicht durchgeführt (Rischewski et al. 2006). Bereits zehn Jahre früher wurde in einer spanischen Studie bei fünf Familienmitgliedern in zwei Generationen die ITP diagnostiziert. Daraus erkannten die Autoren ein autosomal-dominantes Vererbungsmuster der ITP in dieser Familie (Sanchez Fayos et al. 1994). Das familiäre Auftreten von ITP wurde auch in Zusammenhang mit anderen Autoimmunerkrankungen gesetzt. Dabei wurde festgestellt, dass familiäre Zusammenhänge, besonders auf der Basis von HLA-Haplotypen, zwischen dem Auftreten von ITP, IHA, SLE und rheumatoider Arthritis bestehen (Lippman et al. 1982).

Beim Hund wurde familiäre ITP nur in Zusammenhang mit einem familiären Auftreten von immunhämolytischer Anämie berichtet. Dabei war eine Thrombozytopenie begleitend zu einer immunhämolytischen Anämie bei sechs von 17 untersuchten Familienmitgliedern festgestellt worden. Es wurde ein Plättchen-Faktor-3-Test zur Diagnose der Thrombozyten-Antikörper durchgeführt (Dodds 1983). Ausführliche Familienstudien und Segregationsanalysen bezüglich der primären ITP wurden beim Hund bisher in der Literatur allerdings nicht beschrieben.

5.3.5. Prädispositionen

Untersuchungen zum Geschlechterverhältnis bei der pITP schwanken zwischen einer Ausgeglichenheit von weiblichen (53%) und männlichen (47%) Hunden (Jans et al. 1990) und einer Überrepräsentation von weiblichen Tieren von 69% (Williams und Maggio-Price 1984) bzw 62% (Lewis et al. 1995b). Eine andere Studie fand in einer pITP-Population ebenfalls eine Prädisposition weiblicher Hunde (n=11) (73%), verglichen zu den männlichen Probanden (n=4) (27%) (Engelbrecht 2001). Eine Überrepräsentation weiblicher an pITP erkrankter Hunde ergab auch eine Studie von Putsche und Kohn (2008), in der 73% aller betroffenen Hunde weiblich waren (n=22).

Unterschiedliche Veröffentlichungen berichteten von einer Prädisposition bestimmter Rassen: Dazu zählen insbesondere English Cocker Spaniel, Pudel und Altenglische Schäferhunde. In einer Studie von Williams und Maggio-Price (1984) waren Pudel (20%), Altenglischer Schäferhund (9%) und Cocker Spaniel (7%) gegenüber anderen Rassen überrepräsentiert. Allerdings gehörten 31% der Patienten Mischlingshunden an. Eine andere Studie stellte bei 15 erkrankten Patienten 4 Pudel (27%) und 3 Cocker Spaniel (20%) fest (Jans et al. 1990). Der Anteil von Mischlingshunden lag in dieser Studie bei 27%. Engelbrecht berichtete von einer Überrepräsentation von Cocker Spaniel (20%) und Golden Retriever (20%) (Engelbrecht 2001). Andere Angaben beziehen sich auf eine Häufung von Rottweiler (10%), Cocker Spaniel (6,6%), Golden Retriever (6,6%) und Deutschem Schäferhund (6,6%) (Putsche und Kohn 2008).

Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt in der Regel bei 6 Jahren (Wilkins et al. 1973), 6,3 Jahren (Williams und Maggio-Price 1984), 6,1 Jahren (Engelbrecht 2001) und 4,7 Jahren \pm 2,8 Jahren (Putsche, 2008). Im Allgemeinen wird der Bereich zwischen 7 Monaten und 14 Jahren angegeben (Wilkins et al. 1973), somit können Hunde jeden Alters erkranken.

5.4. Anamnese und Klinik

Die ITP tritt meist akut oder perakut auf. Die Anamnese spielt eine wichtige Rolle für eine Unterscheidung zwischen einer pITP und einer sITP. Dazu gehören Fragen nach Vorerkrankungen, Medikationen, Auslandsaufenthalten bzw. Herkunft des Hundes, Zeitpunkt und Art der letzten Impfung, Zeckenbefall sowie die mögliche Aufnahme von Toxinen. Der Patient wird zumeist mit Symptomen einer primären Hämostase vorgestellt: Typisch sind Oberflächenblutungen (z.B. Petechien, Ekchymosen, Zahnfleischblutungen) (Putsche und Kohn 2008). Seltener wird auch von Epistaxis, Hämaturie, skleralen und retinalen Blutungen berichtet (Joshi und Jain 1976; Jackson und Kruth 1985). Am häufigsten wurden in einer

Studie Petechien in der Haut/Schleimhaut (66%) sowie Zahnfleischbluten (26%) und Meläna (20%) erwähnt (Engelbrecht 2001). Trotz sehr niedriger Plättchenzahlen können auch keine oder nur geringgradige Blutungen auftreten. Viele Hunde erleiden einen schweren Blutverlust, der zu einer Anämie führt (Williams und Maggio-Price 1984). Eine Anämie kann durch eine Blutungsanämie bedingt sein oder aufgrund des gleichzeitigen Vorliegens einer IHA (Evans' Syndrom) vorkommen (Evans et al. 1951).

5.5. Diagnose

5.5.1. Thrombozyten

Eine Thrombozytenzählung ist unerlässlich für eine Diagnose der ITP. In der Literatur werden unterschiedliche Angaben über Thrombozytenzahlen bei der ITP gemacht, angefangen bei 0-38.000/ μ l (Halliwell 1978), über 3000-60.000/ μ l (Joshi und Jain 1976) hin zu 500-66.000/ μ l (Jackson und Kruth 1985). Eine Blutungsneigung wurde bei einer Plättchenanzahl <30.000/ μ l beobachtet, allerdings lag bei 80% der 54 Patienten die Thrombozytenzahl bei <10.000/ μ l (Williams und Maggio-Price 1984). Diese Studien unterschieden jedoch nicht strikt zwischen einer primären und einer sekundären ITP.

Andere Studien berichteten über Hunde mit Thrombozytenzahlen von 0-111G/l, wobei 76,7% (n=23) der vorgestellten Hunde (n=30) Thrombozytenzahlen < 30G/l zeigten (Putsche und Kohn 2008). Engelbrecht (2002) stellte bei 14 von 15 an pITP erkrankten Hunden (93%) Thrombozytenzahlen von <30.000/ μ l fest. Bei diesen beiden Studien wurde eine pITP durch bestmöglichen Ausschluss aller Fremderkrankungen diagnostiziert.

5.5.2 Nachweismöglichkeiten zur Bestimmung von Thrombozyten-gebundenen-Antikörper

Der Nachweis thrombozytengebundener Antikörper deutet auf eine immunbedingte Zerstörung der Thrombozyten hin, wobei aber nicht zwischen primärer und sekundärer ITP unterschieden werden kann. Ein negatives Testergebnis bei einem nicht mit Glukokortikoiden vorbehandeltem Hund ist bei primärer ITP selten (Kohn et al. 2000a).

In der Humanmedizin klassifizierte Kelton (1995) die verschiedenen Nachweisverfahren zur Bestimmung von antithrombozytären Antikörpern in 3 Gruppen:

Phase-I-Tests sind indirekte Nachweisverfahren, die auf plättchenabhängigen funktionellen Indikatoren (Aktivierung mit Freisetzung von radiomarkiertem Serotonin aus den Plättchengranula, Aggregation oder Verfügbarkeit der koagulierenden Aktivität des Plättchen-Faktor-3) basierten (McPherson 1998). Beim Plättchen-Faktor-3-Test wird über eine veränderte Gerinnungszeit auf das Vorhandensein von antithrombozytären Antikörpern geschlossen. Man geht davon aus, dass durch die Anwesenheit von Tc-gebundenen Antikörpern Plättchen-Faktor-3 aus den Thrombozyten freigesetzt wird und dadurch der Gerinnungskaskade zur Verfügung steht (Karpatkin und Siskind 1969). Der Plättchen-Faktor-3-Test hatte eine weite Verbreitung in der Veterinärmedizin, jedoch fehlt es ihm an Spezifität und die Sensitivität ist sehr variabel, so dass er als Nachweisverfahren nicht empfohlen werden kann (Scott 2000).

In Anlehnung an die Humanmedizin entwickelten Kristensen et al. (1994a) einen indirekten Plättchen-Immunfluoreszenz-Test (PIF-Test) zum Nachweis von antithrombozytären Antikörpern im Serum von Hunden mit ITP. In einer weiteren Untersuchung wurde ein durchflusszytometrisch (FC-PIFA) und mikroskopisch (MI-PIFA) durchgeführter Immunfluoreszenztest zum Nachweis zirkulierender Plättchenantikörper im Serum verglichen. Zwischen den Verfahren konnte kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Sensitivität nachgewiesen werden und die Spezifität lag bei beiden bei 100% (Kristensen et al. 1994b).

Phase-II-Tests messen Ig oder Komplement, entweder auf der Oberfläche der gewaschenen Thrombozyten oder innerhalb der Thrombozyten, nachdem sie lysiert wurden. Dies sind die sogenannten plättchenassoziierten Ig (PAIg) (Kelton 1995). Zum Nachweis der Ig werden Antikörper eingesetzt, die entweder an Radioisotope, fluoreszierende Stoffe oder Enzyme gekoppelt sind (McPherson 1998).

Eine verbreitete Methode zur Ermittlung der Menge fluoreszierender Antikörper, die an Ig oder Komplement auf der Thrombozyten-Oberfläche gebunden sind, ist die Durchflusszytometrie (Rosenfeld et al. 1987; Christopoulos et al. 1993; Hagenström et al., 2000). Das Verfahren hatte bei Hunden mit ITP eine Sensitivität von 90% (19/21) und bei Hunden mit einer nicht immunvermittelten Tc-penie eine Spezifität von 82% (23/28) (Lewis et al. 1995c). Die Durchflusszytometrie ist ein einfaches und schnelles Nachweisverfahren, bei dem nur eine geringe Menge an Blut benötigt wird (LEWIS et al. 1995a; Lewis et al. 1995c).

Phase-III-Tests weisen das Bindungsverhalten der AK gegen spezifische Proteine auf den Thrombozyten nach. Es gibt drei Hauptgruppen von Phase-III-Tests: Immunoblotting, Immunpräzipitation und Glykoprotein-Immobilisations-Test. Innerhalb der Glykoprotein-Immobilisations-Tests gibt es ebenfalls zwei Gruppen. Dazu gehören der Immunobead Assay und der Monoclonal Antibody Immobilization Platelet Antigen Test (MAIPA) (Kelton 1995). Der Immunoblot und die Immunpräzipitation sind technisch anspruchsvoll und daher für die Routinediagnostik nicht geeignet. MAIPA und Immunobead assay dagegen sind schnell, einfach, reproduzierbar und hilfreich zur Messung von plättchenassoziierten und im Plasma oder Serum befindlichen Auto- und Alloantikörpern mit einem hohen Grad an Sensitivität (McMillan 1990). Allerdings sind Phase-III-Tests für die Veterinärmedizin nicht etabliert.

III. Material und Methoden

1. Klinische Untersuchung

1.1. Patienten

Über einen Zeitraum von 8 Jahren (1998 – 2006) wurden an der Klinik für kleine Haustiere der FU Berlin Blutproben von an pIHA, pITP und am Evans' Syndrom erkrankten Cocker Spaniern und Irish Settern gesammelt. Voraussetzung für die Aufnahme in die Studie war eine ausführliche Krankengeschichte, vollständige Pedigree-Unterlagen und die Diagnose pIHA, pITP oder Evans' Syndrom.

Das Kriterium für die Diagnose einer pIHA war (1) eine Anämie mit einem Hämatokritwert unter dem Referenzbereich (42-56%) und (2) eine persistierende Agglutination (Material und Methoden, Kap. 1.3.1) und/oder ein positiver Coombs-Test (Material und Methoden, Kap. 1.3.2).

Für die Diagnose einer pITP war (1) eine Thrombozytopenie mit einer Plättchenzahl unter dem Referenzwert (190,000/ μ l–500,000/ μ l) und (2) der positive Nachweis von Thrombozyten-gebundenen Antikörpern mittels Durchflusszytometrie (Material und Methoden, Kap. 1.4) notwendig.

Hunde mit einer Grunderkrankung, die eine sIHA oder sITP hätte verursachen können, wurden ausgeschlossen. Auch durften für einen Zeitraum von 4 Wochen vor der Diagnose der IHA oder ITP weder Medikamente noch Impfungen verabreicht worden sein, die eine sekundäre IHA hätten auslösen können.

Die Diagnose „Evans' Syndrom“ wurde bei den Probanden gestellt, die sowohl an einer pIHA als auch einer pITP erkrankt waren.

Zusätzlich wurden im selben Zeitraum (1998 – 2006) Blutproben von Hunden gesammelt, die mit den erkrankten Hunden in verwandtschaftlicher Beziehung standen. Voraussetzung hierfür war ebenfalls eine ausführliche Krankengeschichte sowie eindeutige Verwandtschaftsverhältnisse. Stammbäume wurden mit Hilfe von Ahnentafeln erstellt. Insgesamt handelte es sich um zwei Pedigrees mit erkrankten und gesunden Hunden: eine English Cocker Spaniel-Familie mit 209 Mitgliedern (Zeitraum des Geburtsdatums 1977–2005) und ein Irish Red Setter-Pedigree mit 147 Familienmitgliedern (Zeitraum des Geburtsdatums 1983–2003).

Bereits verstorbene Hunde und Hunde, die aufgrund geographische Gegebenheiten nicht auf eine IHA oder ITP untersucht werden konnten, wurden anhand eines Fragebogens auf das mögliche Auftreten einer IHA und/oder ITP bewertet (Anhang 1). Bestehende tierärztliche Unterlagen dieser Fälle wurden – soweit vorhanden – ausgewertet und mit einbezogen.

Zusätzlich wurden vier nicht verwandte Hunde anderer Rassen, die an pIHA erkrankt waren, in die Studie mit aufgenommen. Dabei handelte es sich um je einen Shih Tzu, Dogo Canario, Dobermann und Staffordshire Terrier. Als gesunde Kontrollhunde wurden 4 Rhodesian Ridgebacks in die Studie einbezogen.

1.2. Anamnese, Signalement und Eingangsuntersuchung

Von allen in die Studie eingegangenen Hunden wurden die Rasse, das Geschlecht, das Alter sowie Erkrankungs- bzw. Testalter und die Verwandtschaftsverhältnisse untereinander betrachtet.

Eine ausführlich Anamnese wurde bei allen Hunden durchgeführt. Sie umfasste: Vorstellungsgrund, Auslandsaufenthalt, vorhergehende Erkrankungsepisoden, andere Erkrankungen, Medikamentengabe, Impfstatus, Läufigkeitsstatus, Zeckenprophylaxe und -befall.

Kranke und gesunde Hunde, die in der Klinik für kleine Haustiere der FU Berlin vorgestellt wurden, wurden einer klinischen Untersuchung unterzogen. Diese umfasste die Messung der Körpertemperatur, Schleimhautfarbe, kapilläre Füllungszeit, Palpation der Lymphknoten, Puls und Herzfrequenz, Pulsqualität, Beurteilung von Atmungstyp und -frequenz, Auskultation des Herzens und der Lunge sowie die Palpation des Abdomens. Alle an IHA und/oder ITP erkrankten Probanden (9 Cocker Spaniel, 7 Setter, 1 Dobermann, 1 Dogo Canario, 1 Staffordshire Terrier, 1 Shih Tzu), die in die MHC-Studie eingingen, wurden an der Klinik für kleine Haustiere der FU Berlin untersucht.

Auch bei allen gesunden Hunden wurde bei der Blutabnahme eine Allgemeinuntersuchung durchgeführt. Nur bei 2 Probanden (Cocker Spaniel-Pedigree #135 und #70) konnte keine Allgemeinuntersuchung gemacht werden. Bei einem Hund (#135) erfolgte die Blutabnahme beim Haustierarzt im Zuge der Euthanasie. Bei dem zweiten Hund (#70) war die Allgemeinuntersuchung nicht möglich, da er zu weit weg wohnte. Die Blutproben wurden mit der Post eingeschickt und der Gesundheitszustand anhand bestehender haustierärztlicher Unterlagen bewertet und beide Probanden als „gesund“ klassifiziert.

1.3. Diagnose IHA

Bei allen erkrankten Hunden wurden routinemäßig Laboruntersuchungen durchgeführt. Diese erfolgten gemäß Standardverfahren und beinhalteten 1. eine hämatologische Untersuchung (CELL DYN 3500, Fa. Abbott, Wiesbaden-Delkenheim), 2. das Differentialblutbild mit einer May-Grünwald-Färbung, 3. eine Retikulozytenzählung mit einer Brillantkresylblaufärbung (Sarstedt, Nümbrecht) und 4. eine klinisch-chemische Untersuchung des Blutes mit dem Analysegerät Konelab 30i (Thermo Electron GmbH, Dreieich) aus Heparinplasma.

1.3.1. Agglutination der Erythrozyten

Die Agglutination der Erythrozyten wurde vor und nach dem Waschen der Erythrozyten sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch beurteilt.

Ein Tropfen Blut wurde mit einem Tropfen isotoner Kochsalzlösung auf einem Objektträger versetzt, um eine eigentliche Agglutination von einer Rouleaux-Bildung unterscheiden zu können. Blieb eine Agglutination bestehen, wurde ihr Grad als 1+, 2+, 3+ und 4+ bezeichnet. Wurde makroskopisch keine Agglutination erkannt, wurde diese mikroskopisch beurteilt.

Zusätzlich wurden die Erythrozyten einem 3-fachen Waschvorgang mit NaCl unterzogen. Die gründlich aber vorsichtig aufgemischten Erythrozyten wurden pro Waschvorgang 2-3 Minuten lang bei 1500 Umdrehungen zentrifugiert. Die Spülflüssigkeit und der „Buffy coat“ wurden von den Erythrozyten vorsichtig abgesaugt. Nach dem Waschen der Erythrozyten wurde erneut auf Agglutination untersucht. Ließ sich makroskopisch keine Agglutination feststellen, so wurde noch mikroskopisch untersucht. Bei positiver Reaktion lag eine sogenannte persistierende Agglutination vor.

1.3.2. Direkter Coombs-Test (direkter Antiglobulin-Test, DAT)

Der direkte Coombs-Test dient dem Nachweis von Antikörpern, die an Erythrozyten gebunden sind. Er wurde im doppelten Ansatz mit EDTA-Blut bei 4°C (Kaltansatz) und 37°C (Warmansatz) durchgeführt. Verwendet wurden monospezifische Antisera (rabbit-anti-dog IgG [Dianova, Hamburg], goat-anti-dog IgM [ICN Biomedicals, Eschwege] und goat-anti-dog C3 [ICN Biomedicals, Eschwege]) in einer Verdünnungsreihe von 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320 und 1:640. Ein positives Ergebnis lag vor, wenn eine Agglutination der Erythrozyten stattgefunden hatte (Engelbrecht et al. 2002).

1.4. Untersuchung auf Thrombozyten-gebundene Antikörper

Die Untersuchung auf Thrombozyten-gebundene Antikörper wurde an der Tierärztlichen Hochschule Hannover (Arbeitsgruppe Immunologie) durchgeführt. Als Testprinzip diente die Durchflusszytometrie mit Doppelfluoreszenz (FACScan, Becton-Dickinson, Heidelberg). Die Thrombozyten-Population wurde aufgrund von Größe und Komplexität (d.h. Granularität und Oberflächenrelief der Thrombozyten) definiert. Nach Separierung und Waschung der Thrombozyten wurden diese mit einem monoklonalen Antikörper gegen Thrombozyten-Antigene (mAK 17-15, Code 3W-098) und einem Phycoerythrin-konjugierten polyklonalen Antikörper (rotfluoreszierender Ak) gegen Maus-Immunglobuline markiert. Dadurch konnten Partikel in Thrombozyten-Größe, die keine Thrombozyten darstellten (z.B. Erythrozytenfragmente), von Thrombozyten unterschieden werden. Mit Fluorescein-konjugierten polyklonalen Antikörpern (goat-anti-dog [H+L]) gegen canines Immunglobulin (grünfluoreszierender Ak) wurden jene Thrombozyten bestimmt, die mit Antikörpern beladen waren (Kohn et al. 2000a).

1.5. Weitere Untersuchungen

Um potenzielle Auslöser einer sekundären IHA bzw. ITP auszuschließen, wurden bei Hunden mit Verdacht auf pIHA und/oder pITP weiterführende Untersuchungen durchgeführt. Dazu gehörten Röntgenaufnahmen von Thorax und Abdomen in latero-lateralem und ventro-dorsalem Strahlengang, eine sonographische Untersuchung des Abdomens, Harnuntersuchung mittels Combur⁹-Teststreifens (Boehringer, Mannheim), die Bestimmung der Harndichte, eine mikrobiologische Untersuchung des Harns und eine Sedimentuntersuchung. Zusätzlich wurden Infektionserkrankungen durch serologische und molekularbiologische Untersuchungen ausgeschlossen. Dazu zählte routinemäßig die Untersuchung auf *Babesia canis*. Proben, die im Zeitraum nach Oktober 2005 gesammelt wurden, wurden auch routinemäßig auf *Anaplasma phagocytophilum*, teils auf *Hämoplasmen* getestet. Ein Test auf Ehrlichiose (*E. canis*) und Leishmaniose wurde nur bei entsprechendem Auslandsaufenthalt eingeleitet. Alle Untersuchungen erfolgten am Institut für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie (Ludwig-Maximilians-Universität München).

2. Molekularbiologische Untersuchungen

2.1. Probenentnahme

Als Material für die DNA-Isolierung dienten Blutproben, die im Zeitraum von 1998 bis 2006 an der Klinik für kleine Haustiere der FU Berlin gesammelt wurden. Das EDTA-antikoagulierte Blut wurde entweder aus der Vena saphena, Vena cephalica oder der Vena jugularis entnommen und für die weitere Verwendung bei -70°C gelagert. Damit keine Kontaminationen bei der Probenentnahme entstehen konnten, wurden die Hände zwischen den einzelnen Schritten gründlich gereinigt und desinfiziert. Zur Probenentnahme wurde ausschließlich steriles Einwegmaterial verwendet.

2.2. Probanden

Bei allen gesammelten Cocker Spaniel- und Irish Setter-Proben lagen vollständige Pedigree-Daten zum jeweiligen Tier vor. Um eine Doppelbeprobung einzelner Tiere zu vermeiden, wurden genaue Aufzeichnungen über Entnahmedatum, Tier- und Besitzername durchgeführt. Eine genaue Auflistung der Probanden ist in Tab. 2 aufgeführt.

Von den gesunden Cocker Spanieln hatten 5 Cocker Spaniel einen negativen Coombs-Test und einen negativen Test auf Thrombozyten-gebundene Antikörper, 3 weitere Cocker Spaniel hatten einen negativen Coombs-Test. Diese 3 Hunde wurden nicht auf Thrombozyten-gebundene Antikörper getestet. Ein Cocker Spaniel wurde negativ auf Thrombozyten-gebundene Antikörper getestet, bei diesem Probanden wurde kein Coombs-Test durchgeführt.

Alle anderen als gesund klassifizierten Cocker Spaniel waren klinisch und hämatologisch unauffällig, es wurde jedoch weder ein Coombs-Test noch ein Test auf Thrombozytengebundene Antikörper durchgeführt. Bei den 14 gesunden Irish Red Settern hatten alle sowohl einen negativen Coombs-Test als auch einen negativen Test auf Thrombozytengebundene Antikörper.

In Tab. 2 sind alle in dieser Studie untersuchten Patienten aufgelistet, eingeteilt nach Hunderasse, Erkrankung und Geschlecht. Es lag keine unabhängige Stichprobe vor, da alle aufgelisteten English Cocker Spaniel bis auf zwei Ausnahmen miteinander verwandt waren und alle Irish Red Setter einem Pedigree entstammten.

Rassen (n= Gesamtzahl)	IHA			ITP			Evans' Syndrom			gesund		
	#	Alter (Median)	Sex	#	Alter	Sex	#	Alter (Median)	Sex	#	Alter (Median)	Sex
Cocker Spaniel (n=32)	2	4,6 J	2 w 0 m	3	3,10,14 J	2 w 1 wk	4	5-10 J (7 J)	2 w 1 wk 1 m	23	3-17 J (9 J)	10 w 13 m
Irish Setter (n=21)	4	0,5-5 J (4,25 J)	2 w 2 m	2	5,9 J	1 w 1 m	1	3 J	1 w	14	2-13 J (5 J)	7 w 7 m
Dobermann (n=1)	1	9 J	1 w	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Dogo Canario (n=1)	1	1 J	1 m	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Shih Tzu (n=1)	1	5 J	1 mk	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Staffordshire Terrier (n=1)	1	7 J	1 mk	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Rhodesian Ridgeback (n=4)	---	---	---	---	---	---	---	---	---	4	3 J (3 J)	2 w 2 m

Tab. 2: Übersicht über die Stichproben für die DNA-Isolation, eingeteilt nach Rasse, Erkrankung, Geschlecht und Erkrankungsalter (# = Anzahl, J = Jahre, w = weiblich, wk = weiblich kastriert, m = männlich, mk = männlich kastriert)

2.3. DNA-Isolierung

Die Isolierung der DNA erfolgte mit dem vorher bei -70°C eingefrorenen, dann aufgetauten Blut unter Verwendung des Qiamp DNA Blood Mini Kits (Qiagen, Hilden). Nach der Zellyse und Proteinabtrennung wurde die DNA bei diesem Verfahren an eine selektive Membran gebunden und nach mehreren Waschschritten mit einem Puffer eluiert. Das zugehörige Protokoll war für humanes Blut ausgelegt und mußte für die Isolierung aus Hundeblood modifiziert werden. Dabei wurde 100µl nicht geronnenes Vollblut mit 100µl HPLC-Wasser, 200µl AL Puffer (Qiagen, Hilden) und 30µl Proteinase K (Qiagen, Hilden) in einem 1,5ml Reaktionsgefäß (Eppendorf-Tubes) 30sec gründlich durchmischt (Vortex) und dann im Schüttelwasserbad bei 65°C für 20min inkubiert. Nach Hinzufügen von 200µl Ethanol (96 %) und 30sec Durchmischen (Vortex) wurde die Lösung nach kurzem Abzentrifugieren in ein QIAamp Spin Column (Qiagen, Hilden) pipettiert und zur Adsorption der DNA an die QIAamp silica membrane (Qiagen, Hilden) bei 6000rpm für 4min zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen und ein neues Auffanggefäß montiert. Die Waschung erfolgte zweimalig mit 500µl AW1-Puffer (Qiagen, Hilden) und Zentrifugation bei 6000rpm für eine Minute sowie mit 500µl AW2-Puffer (Qiagen, Hilden) und Zentrifugation bei 6000rpm für 1min. Das Eluat wurde verworfen und die Säulen auf ein neues Reaktionsgefäß montiert. Die gebundene

DNA wurde nach einer Inkubation mit 100µl auf 60°C angewärmtem Elutionspuffer (AE-Puffer) im QIAamp Spin Column (Qiagen, Hilden) für 1min bei Raumtemperatur eluiert. Pure eluierte DNA wurde nach Zentrifugation bei 14000rpm für 1min gewonnen. Die isolierte DNA wurde in Eppendorf-Tubes bei -20°C eingefroren und aufbewahrt.

2.4. Genloci

Für die genetische Untersuchung der IHA/ITP/Evans' Syndrom-Patienten wurden Bereiche des DLA-I und DLA-II als Kandidatengene bestimmt und sequenziert. Dabei wurden alle bekannten codierenden Genloci im caninen MHC-I und MHC-II als relevant eingestuft und auf Polymorphismen geprüft (Tab. 3):

	<i>Locus</i>	<i>Chromosom</i>	<i>Größe (bp)</i>
Canine MHC-Klasse I	DLA-88	12	Ca. 1442 (Wagner et al. 2000)
	DLA-79	18	Ca. 4833 (Burnett et al. 1995a)
	DLA-12	12	Ca. 4662 (Wagner 2003)
	DLA-64	12	Ca. 4504 (Wagner 2003)
Canine MHC-Klasse II	DLA-DRA 1	12	Ca. 1762 (Wagner et al. 2005)
	DLA-DRB (exon 1)	12	Ca. 545 (Wagner 1996c)
	DLA-DRB1b (exon 2)	12	Ca. 270 (Angles et al. 2005a)
	DLA-DQA1 (exon 1)	12	ca. 581 (Wagner 1996d)
	DLA-DQA1B (exon 2)	12	Ca. 246 (Angles et al. 2005a)
	DLA-DQB1 (exon 1)	12	Ca. 1018 (Wagner et al. 1998)
	DLA-DQB1B (exon 2)	12	Ca. 267 (Angles et al. 2005a)

Tab. 3: Kandidatengene des caninen MHC für die Untersuchung der IHA und / oder ITP

Diese Genloci sind bereits an Hand des Boxergenoms identifiziert worden und online in der Datenbank des NCBI erhältlich (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Sequenzierte Loci wurden zur Definition von Polymorphismen mit den Daten der NCBI-Datenbank abgeglichen.

2.5. Primerdesign

Zur Sequenzierung der Loci wurden Primer erstellt, die die zu untersuchenden Kandidatengene flankieren. Das Primerdesign wurde mit Hilfe der Software Oligo 5.1. (NBI/Genovus, Plymouth, MN) durchgeführt. Kriterien für die gesuchten Primer waren folgende (Alphey 1998):

1. Primerlänge: Die Primerlänge sollte zwischen 20 und 25 Basenpaaren betragen, da kürzere Primer zu unspezifisch sind und die Gefahr sekundärer Bindungsstellen erhöhen. Zu lange Primer führen zu Reaktionen mit sich selbst (Self-annealing, Loops).
2. Primer mit mehr als 3- bis 4-facher Abfolge einer Base waren zu vermeiden.
3. Annealingtemperaturen für beide flankierenden Primer sollten sich nicht um mehr als 2°C unterscheiden. Bei zu niedriger Temperatur gehen Primer unspezifische Bindungen ein.
4. Die Reaktionstemperatur sollte im Allgemeinen 50°C bis 60°C betragen.
5. Der G/C-Gehalt des Primers sollte bei 50 bis 60% sein. Die G/C-Verbindung trägt aufgrund ihrer dreifachen Wasserstoffbrückenbindung maßgeblich zur Stabilität des Primers bei.
6. Die Primer sollten möglichst die Base G oder C am 3'-Ende enthalten.

Die nach den genannten Kriterien entwickelten Primer wurden im BLAST des NCBI mit den Daten des Hundegenoms verglichen, so dass weitestgehend ausgeschlossen war, dass vorliegende Primer auch an anderer Stelle im Hundegenom amplifizieren.

2.5.1. Primeretablierung

Die Fertigstellung und Lieferung der Primer erfolgten von der Firma MWG (Ebersberg). Sie wurden in lyophilisiertem Zustand gelagert und zur Anwendung mit einer angegebenen Menge gereinigtem Wasser (HPLC) gelöst. Die Primer wurden in 30µl Aliquots bei -20°C eingefroren. Das Testen der Primer erfolgte in acht Durchgängen mit der DNA eines gesunden Hundes. Zunächst wurde die Annealingtemperatur, bei der beide flankierenden Primer eine ideale Reaktion eingehen, bestimmt. Der Standard-Mastermix für die PCR ist in Tab. 4 aufgeführt. Puffer, Q-Solution und Taq-Polymerase wurden von Qiagen (Hilden) bezogen. Das PCR-Protokoll ist in Tab. 5 aufgezeichnet.

<i>Reaktionskomponenten (Konzentration)</i>	<i>Eingesetztes Volumen (µl)</i>
HPLC-Wasser	117
PCR-Puffer (10x)*	18
Q-Solution (5x)	36
d-NTPs (0,2mM)	1,9
Primer fwd (100µg/µl)	1,9
Primer rev (100µg/µl)	1,9
Taq Polymerase (5U/gl)	1,7
DNA	4

*= Enthält 1,5mM MgCl₂, pH 8,3

Tab. 4: Standard-Mastermix für PCR zur Primeretablierung, für 8 Proben berechnet (20 µl/ Reaktion)

<i>Vorgang</i>	<i>Zyklen</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Zeit</i>
Denaturierung	1	95°C	10 min
Denaturierung	35	94°C	45 sec
Primer Annealing	35	Primer-spezifisch	45 sec
Primer Extension	35	72°C	45 sec
Final Elongation	1	72°C	10 min

Tab. 5: PCR-Protokoll zur Primeretablierung

Zur Kontrolle der PCR-Produkte wurden die Proben mit 10ml Orange G vermischt und auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen. Das Gel wurde aus Agarose und 0,5%igem TBE-Puffer unter Erhitzung hergestellt. Für eine Visualisierung der PCR-Produkte unter UV-Licht wurde ein Tropfen Ethidiumbromid zugegeben. Als Längenstandard wurde eine 1 kb-Standardleiter verwendet. Sie diente der Bestimmung und Überprüfung der Größe der PCR-Produkte zwischen 250 - 1000bp im 2%igem Agarosegel.

Die Elektrophorese wurde im 0,5%igen TBE-Puffer bei 120 Volt im Zeitraum von 20 min durchgeführt. Das Gel wurde unter UV- Licht nach folgenden Kriterien ausgewertet:

1. Produktlänge: Die Produkte wurden mit einer standardisierten 1 kb-Leiter verglichen um festzustellen, ob die Primer ein Produkt mit der entsprechenden Länge amplifizieren.
2. Annealing-Temperatur: Es wurde die Temperatur bestimmt, bei der das gewünschte Produkt eine einheitliche Bande zeigte. Nebenbanden sind ein Zeichen dafür, dass die Primer noch an anderer Stelle amplifiziert haben und somit nicht ausschließlich die gewünschten Produkte gebildet haben. Diese zusätzlichen Amplifikate können zu falschen Ergebnissen bzw. Überlagerungen in der Sequenzierreaktion führen und waren somit unerwünscht.

2.5.2. Primerübersicht

Im Folgenden werden alle Kandidatengene einzeln aufgeführt und die Lokalisation der Primer markiert. Eine Zusammenfassung aller verwendeter Primer ist in Tab. 6 mit Angabe der Annealing-Temperatur und der Größe des amplifizierten Produktes angegeben. Primer werden immer in Sequenzrichtung 5'-3' angegeben.

2.5.2.1. DLA-12

DLA-12 wurde in insgesamt in 6 Abschnitte unterteilt, um ähnlich große Abschnitte mit max. 1200 Basen zu sequenzieren. Das Genom entstammte der NCBI-Datenbank mit der Acc.-No.: U55026 (Burnett et al. 1997). Die PCR-Optimierung erfolgte im Temperaturgradienten. Die vom Hersteller MWG angegebene Annealing-Temperatur diente als Mittelwert (+/- 4°C). Bei der jeweils angegebenen Temperatur wurden im Vergleich zu einer 1kb Standardleiter PCR-Produkte ohne Nebenbanden in gewünschter Länge produziert.

2.5.2.1.1. DLA-12A

Als optimale PCR-Temperatur wurde 59°C festgelegt. Im Folgenden ist der Abschnitt DLA-12A mit dem flankierenden Primerpaar aufgeführt (5'-3'):

```
ACCACCTGAGATCCTGAGTTGAGCGCAAGTCAAGGGTCTAAGGCTTACCTGACTGAGGCACCCAG
GCGCCCAATACATTTTTAAACCTCTTTTGTTCCTACTATGATAAATATTGACAGATTAACCCACAG
CCACAATTTTCCTGGGATCCTCAGTAATCTGTGAGACGGTGTAGATGCCCTGTGGGAACAGAATGT
TCTAGACTCACTGCCTCACACAGCTCCCTGACCAGGACTCAGGGAGTCAGAGTGACAAGAGCGCTG
TGGGGCAAGGTCTCAGGACCCCGGGTGCCTCTCAGGCTCTCATGCCCCAGGGCGGGTCCGGGGCG
GGGACGCTCAGGCTCGGGAGTCCCCACCTCCCCGGGGATTTCACTTCTTCTCCAACCTGGCTCTGG
GCCCCCTGCCTGGAGACTCATGACGCAGCCCCAGCGCGCACTCCCATTTGGGTGCAGCCTTTCTGGA
GGAGCCAATCAGCGGCACCGGGTCCCAGGCTCTGAAGTCCACACCCAGAACC GCCAGGACGCAGC
TGCTCCACCGACCCTAAAGGTCTGGGCTATGGTG
```

Abb. 1: Abschnitt DLA-12A, in gelb unterlegt die verwendeten Primer.

2.5.2.1.2. DLA-12D

Als optimale PCR-Temperatur für die Primer des DLA-12D wurde 56°C festgelegt. Im Folgenden ist der Abschnitt DLA-12D mit dem flankierenden Primerpaar aufgeführt (5'-3'):

```
TCAAGGCAGAGACTCAAGCTCAGCAAGGGTCTCCGGGAAGGAAGACAGGAAAAATGGCTGAGC
CCAGTCTGGTGTCTTCACTTGGTTCTTTCAGAAAGACCCTGGTCCAGGAGTCAGGGGGAAAGTGTA
ACAAAGAGCGCTGCACGCAAGATGAAAAGTGTGAGGTCCTATGGTCCCGGGGAGGGCGAGGC
TCTCAGGCTCTCAGGCCCCAGGGCGGGTCCGGGGCGGGGACGCTCAGGCTGGGGAGTCCCCACCT
CCCCGGGTTTCACTTCTCCGCTCCCAACCTGGCTCAGGGCCCCCTGCCTGGAGACTCGTGACGCAG
CCCCAGCGCGCACTCCCATTTGGGTGCAGCGTTTCTGGAGGAGCCAATCAGCGGCACCGGGTCCCGG
GCTCGAAAGCCTCCGCCGCCGCTCCGCCCCAGTCCGGCGGCGACGGCCAGTGTCCCCGGAGCC
CGGAGATGGAGGTGGTGTGATGCCGCGAGCCCTCCTCGTGTGCTGTCGGCGGCCCTGGCCGTGACCC
TGACCCGGGCGGGTGTGAGTGCGGGCGGGAGCGAGGGGACCGGCGGGCGGGGACGCGGGACCCCGG
GAAGCCGCTCTCCGCCGCCCGGGCCCCCGGGCCCTGGGCTCCCCGGTCCCTCCCGCCTCCGCC
CCGCCCGGGCATCTCCCTGGGCCCGGGCCCCCGGGCGGGAGGGGGTCCGGCGGGGTCTCAGC
CCTCGGCTCCGAGGCTCCCACTCCCTGAGGTTTTTCCACACCGCCGTGTCCCGGCCCGGCCGCGG
GGACCCCTCTACATCTCTGTGGGCTACG
```

Abb. 2: Abschnitt DLA-12D, in gelb unterlegt die verwendeten Primer.

2.5.2.1.3. DLA-12E

Als optimale PCR-Temperatur für DLA-12E wurde 53°C festgelegt. Im Folgenden ist der Abschnitt DLA-12E mit dem flankierenden Primerpaar aufgeführt (5'-3'):

GCAAGTCAAGGGTCTAAGGCTTACCTGACAGAGGCACCCAGGCGCCCAATACATTTTTAAACCTC
TTTTGTTCTACTATGATAAATATTGATAGATTAACCCACAGCCACAATTTCTCTGGGATCCTCAGT
AATCTGTGACACTGTATAGATGCCCTGGGGGAACAGAATGTTCTAGACTCACTGCCTCACACAGCT
CCCTGACCAGGACTCAGGGAGTCAGAGTGACAAGAGCGCTGTGGGGCAAGGTGTCAGGACCCCGG
GCTGCCTCTCAGGCTCTCAGGCCCCAGGGCGGGTCCGGGGCGGGGACGCTCGGGCTGGGGAGTCC
CCACCTCCCCGGGTTTCACTTCTCCGTCTCCAACCTGGCTCAGGGCCCCCTGCCTGGAGACTCGTG
ACGCAGCCCCAGCGCCTCCATTGGGTGCAGCGTTTCTGGAGGAGCCAATCAGCGGCACCCGG
GTCCCGGGCTCGAAAGCCTCCGCCTCCGCCTCCGCCTCCGCCCCCAGTCCGGCGGCACGGCCAG
TGTCCCGGAGCCCGGAGATGGAGGTGGTGATGCCGCGAGCCCTCCTCGTGCTGCTGTGCGCGGCC
CTGGCCGTGACCCTGACCTGGGCGGGTGAAGTGCAGGGCGGGAGCGAGGGGACCCGGCGGGCGGGGA
CGCGGGACCCCGGAAGCCGCCTCTCCGCCGCCCGGCCCTCCCGCCTCCGCCCCGCCCCGGGG
ATCTCCCCTGGGCCCGGGTCCGCGCGGGAGGGGTTCGGGGCGGGTCTCAGCCCTCGGCTCCGC
AGGTCCTCCACTCCCTGAGGTATTTCTACACCTCCGTGTCGCCGGCCCCGCGGGGACCCCGCTTC
ATCGCCGTGCGGTACGTGGACGACACGCAGTTCGTGCGGTTTCGACAGCGACGCGGCCACTGGGAG
GATGGAGCCGCGGGCGCCGTGGGTGGAGCAGGAGGGCCGGAGTATTGGGACCCCGCAGACGCGG
ACCATCAAGGAGACCGCACAGAGGTACCGAGTGAGCCTGGACACCCTGCGCGGCTACTACAACCA
GAGCGA

Abb. 3: Abschnitt DLA-12E, in gelb unterlegt die verwendeten Primer.

2.5.2.1.4. DLA-12F

Als optimale PCR-Temperatur für DLA-12F wurde 56°C festgelegt. Im Folgenden ist der Abschnitt DLA-12F mit dem flankierenden Primerpaar aufgeführt (5'-3'):

CTCCACCGACCCTAAAGGTCTGGGCTATGGTGCCCGGAACCCTAGCCCTGCTGCTGTCGGGGGCC
TGGCCGTGACCCTGACCCGGGCGGGTGAAGTGCAGGGCGGGAGCGAGGGGACCCGGCGGGCGGGGAC
GCGGGACCCCGGAAGCCGCCTCTCCGCCGCCCGGCCCTCCCGCCTCCGCCCCGCCCCGGGCA
TCTCCCCTGGGCCCGGGCCCCGCGCGGGAGGGGTTCGGGGCGGGTCTCAGCCCTCGGCTCCGCA
GGCTCCCACTCCCTGAGGTATTTCTACACCTCCGTGTCGCCGGCCCCGCGGGGACCCCGCTTCA
TCGCCGTGCGGTACGTGGACGACACGCAGTTCGTGCGGTTTCGACAGCGACGCGGCCACTGGGAGG
ATGGAGCCGCGGGCGCGGTGGATGGAGCAGGAGGGGCCGGAGTATTGGGACCCGACAGCGCGGA
CCATCAAGGAGACCGCACGGACTTTCCGAGTGGACCTGGACACCCTGCGCGGCTACTACAACCAG
AGCGAGGCCGGTGAAGCGCGGGGCCCGGGGCCAGGGCACGACCCCATCCCCCGACCCGGCCGG
GTCGCCCCGAGGGTCCGGGTCCGGGCGTACCCCGAGTCCGAGGCCCCCCACCCTAAACGGGTCTT
CAGAGCCAGGAAGAGGCCGTGCGCCCTTTCGAGCGGTTTTCTTTTCGTTTTGAACCTAGAAGTCTT
GCGGTCCCGGACTACTCGGGTGTTCACCGCGGGGCGGGGCCCTCGGGCCTCGGGGCGGAGCTGA
CCGCGGGGGGGGCCAGGGTCTCACACCTTCCAGTGGATGTTTGGCTGTGAC

Abb. 4: Abschnitt DLA-12F, in gelb unterlegt die verwendeten Primer.

2.5.2.1.5. DLA-12I

Als optimale PCR-Temperatur für DLA-12I wurde 57°C festgelegt. Im Folgenden ist der Abschnitt DLA-12I mit dem flankierenden Primerpaar aufgeführt (5'-3'):

TGGACAGGAGCAGAGATACACGTGCCACGTGCAGCATGAGGGGCTGGCGGAGCCTGTCACGCGGA
GATGGGGTAAGGAGGGCCTCGGGGTAGAGCTTCTACTCAGGGCAAGTGGAGCTCTTCTGGAGAAT
TTCAGCAGAGTCAGGTCTCAAGCCAGAGGCTGGACCCATCCTCCCTCCGTCCTTTCCAGAGC
CTTCCCCTCTGTCCACCATAGTCATCGTCAGCATTGCTGCTGTTCTCCTCGTGGTTCGCTGGGGT
GATTGGAGCTGTGATCTGGAGGAAGCAGCGCTCAGGTAGGGAACCGACTGAATACTCTGTGTTTTT
CTGTCTGTGGGGGTTTTCTAGGGAGCAGCTGTCTGCTGTTTAAACGGGAGGTGCCGTCCATAC
GCGGTTACTCTCCACACTGGAGCTGTGTACTCACACTCACTGTGCAGCAAACACTTGGGAAAATG
AAGGCCAGAGTTTCGCTTGGTGATTCGTGGTACGGGACTGATTCAGCCGTCACAAGACAGAG
CGGAAGGCCCTGCTGAGGACAGACCTCCAGCAAGTCAGGTGGTCCAGTGACCCCTCACCTCATGG
CTTGTCTCCTGACCTGACCTGGGCGGTCAGTCAGAATTCTGCAGACTCACTTTGCACCAGGACTG
GGAGCTTCTCGAGGATCTCCTGGCCCAGCCCTGTGCCCGGCCTCTACATGATGTTTTCTTCCAC
AGGAGGAAAAGGACCAGGCTACTCTCATGCTGCAGTGAAGTATGCAGGGAGTGATCCCTGAGACC
CCGGGGAGTGTAGACAGGACCCCATGGGGAGCTACCCACAGCTGCTCCTTTAGTCTCACCTCC
TGT

Abb. 5: Abschnitt DLA-12I, in gelb unterlegt die verwendeten Primer.

2.5.2.1.6. DLA-12K

Als optimale PCR-Temperatur für DLA-12K wurde 59°C festgelegt. Im Folgenden ist der Abschnitt DLA-12K mit dem flankierenden Primerpaar aufgeführt (5'-3'):

```
CCCACAGGAGGAAAAGGACCAGGCTACTCTCATGCTGCACGTGAGTATGCAGGGAGTGATCCCTG
AGACCCCGGGGAGTGTAGACAGGACCCCATGGGGAGCTACCCCCACAGCTGCTCCTTTAGTCTCA
CCTCCTGTGAGCTGTACCACATCCTGTTTATTCTCCTCTAGGTGATGACAGTGCCCAGGGCTCTGA
TGTGTCTCTGACAGCTCCTAGAGGTGAGACCCCTGGAGACCCTGAAGTGGGGAGGGTTGGGGCCTTG
GGGACCTGATGAGTGCAGGGGGCTGTTGAGAATGTCAGCACTTATGTGACTGACCTCAGTTTGTA
CTTGATTGTTTTTCAGTGTGAGACCAGCTGCCCTGTGGGGACTGAGCGATGCAAGATGTGTTTACA
TCTCATATGATGACATCAACAACCCTGGCTTGTCTCTGCAAACAGTGTGAGGATGTGCCTGTGTCCC
TAGGAGCATAATGTGAGGAGGTGGGAGATTGGCCCACTCTGCCCACTGACCTGTCCCTAATCTG
ATGTGCACTCTCTTCTCTGATGTGCTTTCCTGT
```

Abb. 6: Abschnitt DLA-12K, in gelb unterlegt die verwendeten Primer.

2.5.2.2. DLA-79

DLA-79 wurde in insgesamt in 5 Abschnitte unterteilt, um ähnlich große Abschnitte mit je max. 1200 Basen zu sequenzieren. Das Genom entstammte der NCBI-Datenbank mit der Acc.-No.: Z25418 (Burnett et al. 1995a). Die PCR-Optimierung erfolgte im Temperaturgradienten. Die vom Hersteller MWG angegebene Annealing-Temperatur diente als Mittelwert (+/- 4°C). Bei der jeweils angegebenen optimalen PCR-Temperatur wurden im Vergleich zu einer 1kb Standardleiter saubere PCR-Produkte in gewünschter Länge produziert.

2.5.2.2.1. DLA-79B

Als optimale PCR-Temperatur für DLA-79B wurde 54°C festgelegt. Im Folgenden ist der Abschnitt DLA-79B mit dem flankierenden Primerpaar aufgeführt (5'-3'):

```
GTTTCACTTCCTCTCACATCCTGCTTGAGGTCCTTCTGCCGGGATACTCGTGACGCGACTCCGGGTG
GCATTTCCATTGCCAGTCGGGTTTCTAGAGAAGCCAATCGGCGTCACTCACCGTGGCTCAGGGCT
GACAGTGTCTCCTCTGCAACTCAGTTGCTGCCTGGAACACGTGGATGCCTGTATGCGCCCCGAA
CCCTCCTCCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
GTGAGCCTGGGGTCCGCAGAGAAAGCGCCGACGCGGGGAGCGGGGAGGAAGCCCTACTCCACCC
GGGATGGACCCAGGCCCTACCTCCGCCTCGCCACACCTCGCCCCACTCACCTCCCGCCCTTG
CCCCTCCCCACCGACAGCCCTAAGCCCCCGGGACCCCCCGGGAGGAGGCTCAGCCTCTTG
GCGCCCCGAGGCTCGCACTCCCTGAGGTTCTTGAACACGTCGTATCCCGGGGCTGCCACGGGGAG
CCCCGCCACTGGGCAGTCGCCTACGTGGACGACACGCCGTTTCAACAGCGTTCAACAGCGAACGCGA
GGGTGCGGCGCCTGAGCCGCTGGTGCCTGGTGGCTGGAGCAGGAGGGCCTGAGTACTGGGAAGAGC
GCACGCTGAACTCCAGGACCTGCACACAGGTCCTCCGAAGGACGCTGAACGAAGTTTCGCAGGAC
TACTCCAATCAGAGCAGGACCGGTGAGCCACGGGGCGGGTCCAGGTCGCCATCCCCGTCTCCGCC
CACGGCCGAGGTCGCCCCGAGTGTCTGGGCGAGGGCCACCCGAGGCTGCGGACTCACCCGTCCC
CGTCCCCGAAAGGGAAGGAGACTCCTGGGGACGCGACTGGGTTTTGTTTTCA
```

Abb. 7: Abschnitt DLA-79B, in gelb unterlegt die verwendeten Primer.

2.5.2.2.2. DLA-79D

Als optimale PCR-Temperatur für DLA-79D wurde 57°C festgelegt. Im Folgenden ist der Abschnitt DLA-79D mit dem flankierenden Primerpaar aufgeführt (5'-3'):

```
TATGACGGCCTGGATTACATCACCTGAGCGAGGACCTGCGCTCCTGGATCGTGGAGGACCCGGTG
GCTCAGATCACTCGGCGCAAGTGGGATGCGGCCACTGTAGCTGAGAACCCTAAGAACTTCTGGA
GGCAGGTGCTTGGAGTGGCTCCGCAGACACTGGAGAATGGGAGGGAGACGCTGCAGCGCGCAG
```

GTACCAGGGGCTCCCCATCTTCACTCTGCTGGGGCTGGCTTCCCCAAGGAAGGGAGGGTGGACT
CAGTGTCAAGAACTGCCCCCTCCACAGGTGGGAAGAAAGAGATCCATCTCAACATTCATATTCC
CACTACAGAGTAATTCTTCAAAGAGCTGCTTTCCTCTAGAGGACAACCTGAGGAATCCAGTCTCCC
TGGAGGCAGGTGGAGACCATCCCTGAAATAACTCATCAGAGTTCTCCTCCATCCTGGAAACCACCT
TGTGAACCATGGCTTTCCTTCTCAAGGCCTTGTCTCCATCGGAGAACATTTTTGGAGGTCTGACTC
CAGGTTTTCTGAGTCACTGACCCTCTGCTGCAGTCCAGACCGTTAGTGTGTTCCCCACTCTAGACCT
GCACTCTCCTGTCTGGGATCTTCCGTGATTCTAAAAATGTTATTCCAGACAACCAAGTCTAGGCTG
TGTCAGGGTTTTGTGCTTTTTCTTCTAAACCAATTGTCTCTCCATCCTCAGCATGGTCACAAGTGC
TGCTTTAATGACCCATGAAGGTAACCCAGAGTGTG

Abb. 8: Abschnitt DLA-79D, in gelb unterlegt die verwendeten Primer.

2.5.2.2.3. DLA-79F

Als optimale PCR-Temperatur für DLA-79F wurde 58°C festgelegt. Im Folgenden ist der Abschnitt DLA-79F mit dem flankierenden Primerpaar aufgeführt (5'-3'):

TTCAGACCCCCCAAACATCTGTGACCCGCCGTCCCATCTCTGAGCATGAGGTCACCCTGAAGTG
CTGGGCTCTGGGCTTCTACCCTGCGGAGATCACCTTGACCTGGCAGCGTGATGGGGAGGACCAGAC
CCAGGACACAGAGCTTGTGGAGACCAGGCCTGGAGGAGATGGGACCTTCCAGAAGTGGGCAGCTG
TGGTGGTGCCTTCTGGAGAGGAGCAGAGATACACATGCCATATTCTGCACAAGAGCCTGACCAAG
CCCATCACCTTGAGATGGGGTAAGGAGGGGTTTGGCATA

Abb. 9: Abschnitt DLA-79F, in gelb unterlegt die verwendeten Primer.

2.5.2.2.4. DLA-79G

Als optimale PCR-Temperatur für DLA-79G wurde 57°C festgelegt. Im Folgenden ist der Abschnitt DLA-79G mit dem flankierenden Primerpaar aufgeführt (5'-3'):

TTGAGATGGGGTAAGGAGGGGTTTGGCATAGACACTCTTCTCAGAGAACAACCTGTGAGGTCATGA
CTCAAGCCTGAGGTCTGGGCCCTCGCCTTCCCTTCCCTTCCAGAACCACCTCCTCAGTCCACCAT
CCCCATAGTGAGCATCATTGCTGGCCTGGTTCTCCTTGTGATCACTGGAGCTATGCTGGTTGGAGTT
GTGATATGGAGGAAGAAGCACTCAGGTAGGGAAGGGAGTGGGGGAATCTGAGTTTTCTGTCTCT
ACTGGGAGGTTTCAAGCCAAAGTAGAAGTTTGTCTGTCTTGTAAATAAGAAGTGCCATCTGGAG
TAGCTGGGTGACTCAGTGGTTGAGCATCTGCCTTTGGCACAGGTCACGATCCCGGAGTCTGGGAT
CAAGTCTACATCAGGCTCCCTGCTCAGCACAGAGCCTGCTTCTCTCTGTCATATGTCTCTGCCTC
TCTCTGTATGTCTTTCATGAATACATAAATAAAATCTTTTAAAAAGAGACAGAAAAAGAGGTACCA
TCCACAATACATGTGCTAGCCAGCTGCTAACATTCCTCCTTAGTAAAGACTTGTGCAAATGAAGG
ACAGATTTTTACCTTTCTATTCTGGCATTGGGGACCTGAGCCCTAGCAGCTGAAGGTAGGGGGAA
TTCCCTGATACAGACAGACCTCCGGGAAGACAGTTGGCCCAGTGCCCTACATATACTTTCTCTGTG
GTCTCCCATACAGCCGTGAGTCTT

Abb. 10: Abschnitt DLA-79G, in gelb unterlegt die verwendeten Primer.

2.5.2.2.5. DLA-79H

Als optimale PCR-Temperatur für DLA-79H wurde 55°C festgelegt. Im Folgenden ist der Abschnitt DLA-79H mit dem flankierenden Primerpaar aufgeführt (5'-3'):

ACCATAGCCTTCTCCTTAGCCTCTGACATGATATTTTCTTCCCACAGGCAGAAAAGGAGGGAGCTA
CTCACAGGCTGAAAATAAGTTCCCTTGAGACCTGGGATAGTATAGATAGGACCCCATGGGGGAAC
TCAGCCACCCTATATAGCTCCTCCTTCTAGTCTCATCTTGTGGGTTTGACCACATCCTGTTGTTCTA
CCGTAGGCAGTGCTCAGGACTCTCAGATGTCTGTATGGCTCCTAATGGTGAGACCCTGGAGGGCC
TGAAGCCAAGGGGAGTGGTTGGGGCAGAGGGGACATGACTGGGTTATGAGGATTCTTTGAGTGGGA
ACATTATAAGCATGTGGAGATGTCAGCACTTAACATGATTGACCTGAATTTGTTTCATGACTATTTTC
TTTTACAGAGCAAGCCAGCTGCCTTGTGGGACTCTGAGTGATGCAAGATTTGTTTCACACTCCCCTT
AGCATAATGTGAGCAGGTGGGAAATTTGGCCACCTCTACTCATCATGTCCCTTCCCCCAACTGAC
CTGTGTTCTTCCCTAATCTGCTTTCTTCCAGCAGAGATGGACTGGTCAATTACCATCCTTGTCTT
TACTTCATATTTGGCTGGGAAGTAATATTTAACTTGTCTTATTCTGTATGTTAGTAAATTGAACACC
AATAAAAAAATAAATTAATAAAAAAAGTTAAAAAAGAAAATCTGGATATGACTTTGTTTTT

CCTATTCTTGTCATATAAAAATTGGCATGGTAATAAAGTAGAAGACTCTTAAAGTTGAGATACGAAA
TAAATGGAAGCACTGAGAACCTTCCAGAATCTGCCA **GATTGCTGTGCTGTCTGT**

Abb. 11: Abschnitt DLA-79H, in gelb unterlegt die verwendeten Primer.

2.5.2.3. DLA-64

DLA-64 wurde insgesamt in 4 Abschnitte unterteilt, um ähnlich große Abschnitte mit max. 1200 Basen zu sequenzieren. Das Genom entstammte der NCBI-Datenbank mit der Acc.-No.: U55027 (Burnett et al. 1997). Alle Primer zur Vervielfältigung der Sequenzabschnitte des DLA-64 wurden mit Hilfe der Software OLIGO 5.1 (NBI/Genovus, Plymouth, MN) erstellt. Ebenfalls wurden alle Primer für den optimalen Temperaturgradienten getestet, bei der es mit einer Elektrophorese auf einem 2%igen Agarosegel zu eindeutigen Banden der gewünschten Länge kam.

2.5.2.3.1. DLA-64A

Getestet wurden die Primer für den DLA-64A im Temperaturbereich 53°C-60°C. Dabei wurde 58°C als optimale Reaktionstemperatur für den Abschnitt DLA-64A bestimmt. Im Folgenden ist der Abschnitt DLA-64A mit den gewählten Primern dargestellt:

CTGGAGAGAGGGAAAGAGAC CCTGCAGCTCACAGGTCTGTGGGGCAGCTGGGACTCCGGGATCTC
CCCTCCCGCTGGGGCTGTACCTCCTGCTATCCCTACAAAAGGAAAATGGAATTGACACCAGAATT
CCTCCCCTGCCCACTTCTTGGATCCAGTCTTTATGGAGAGGGATAGAGATATCTCTGAAATAATTT
AATAGCAGATTTCTTTGACCCTGGCATTACCTTGGGCACCACTGACTGACTTCCTCCCTCAGGCCT
TGCTCCCTGTCCCACACCCCACTTAATTGGAGGTCTGCCTCCAGGTTTTAAGAGGCACTGGACTTCC
TCTACCTAGGTCAGGACCAGAAGTCTCTGTTGTCCCACTCAGAGACCTGGAACCTCCTACCTTAGG
CTATCTTATCCTGATTCTAGATCTTCCAAAGGGATAGGAAGGTATCCCAGATCCTGGAGTTCAGGC
TGGTGTCTGTATTTTGCACCTCCCTCTCCCCATTTGTCCTCTTCATTCTCAGCATGGTCACAACAGTG
CTGCTTAGGTGGCCACCCGGTATAATGCAAATTTGTAATTTTCTGACCCTTCTCCTTAGATCCTC
CAAAAATCTACCTGACCCGCCACCCATCTCTGACCATGAGGTCACCCTGAGGTGCTGGGCGCTGG
GCTTCTACCCTGCGGAGATCACCTGACCTGGCAGCGGGATGGGGAGGACCAGACCCAGGACACA
GAGGTTGTGGACACCAGGCCTGCAGGAGATGGGACCTTCCAGAAGTGGGCAGCTGTGGTGGTGCC
CTCTGGACAGGAGCAGAGATACACGTGCCACGTGCAGCATGAGGGGCTGGCGGAGCCTGTACCGC
GGAGATGGGGTAAGGAGGGCCTCGGGGTAGAGCTTCTACTCAGGGCAAGTGGAGCTCTTCTGGAG
AATTTACAGCAGAGTCAGGTCTCAAGT/C(P172)CAGAGGCTGGACCCTCATCCTCCCTCCCTTTCCA
GAGCCTTCCCTCTGTCC **CACCATTGTTCATCGTCAG**

Abb. 12: Abschnitt DLA-64A, in gelb unterlegt die verwendeten Primer.

2.5.2.3.2. DLA-64B

Getestet wurden die Primer für den DLA-64B im ersten Durchlauf im Temperaturbereich 53°C bis 60°C, im zweiten Durchgang bei den Temperaturgradienten 58,2°C bis 64,9°C. Dabei wurde 58°C als optimale Reaktionstemperatur für den Abschnitt DLA-64B bestimmt. Im Folgenden ist der Abschnitt DLA-64B mit den gewählten Primern dargestellt:

TGGACAGGAGCAGAGATAC ACGTGCCACGTGCAGCATGAGGGGCTGGCGGAGCCTGTACGCGGA
GATGGGGTAAGGAGGGCCTCGGGGTAGAGCTTCTACTCAGGGCAAGTGGAGCTCTTCTGGAGAAT
TTCAGCAGAGTCAGGTCTCAAGTCAGAGGCTGGACCCTCATCCTCCCTCCCTTTCCAGAGCCTTCC
CCTCTGTCCACCATTTGTTCATCGTCAGCATTGCTGCTCTGGTTCTCCTCGTGGTTCGCTGGGGTGATTG
GAGCTGTGATCTGGAGGAAGCAGCGCTCGGGTAGGGAACCGACTGAATACTCTGTGTTTTCTGTGTC
CTGTTGGGGTTTCTAGGGAGCACGCTGTCTGCCTTGTTAACGGGAGGTGCCGTCCATACACGG
TACTCTCCACACTGGAGCTGTGTACTCACTCACTGTGCAGCAAACACTTGGGAAAATGAAGG
CCAGAGTTTCGCCTTGGTGATTCTGGTGACGGGACTGATTCCCAGCCGTCACAGGACAGAGCGGA
AGCCCCCTGCTGAGGACAGACCTCCAGCAAGTCAGGTGGTCCAGTGACCCCTCACCTCATGGCTTG
TCTCCTGACCCTGACCTGGGCGGTACAGTCAGAATTCTGCAGACTCACTCTGCACCAGGACTGGGAG
CTTCTCGAGGATCTCCTGGCCAGCCCTGTGCCCGCCTCTCACATGATGTTTTCTTCCACACAG
GAGGAAAAGGACCAGGCTACTCTCATGCTGCACGTGAGTATGCAGGGAGTGATCCCTGAGACCCC

GGGGGAGTGTAGACAGGACCCCATGGGGAGCTCACCCCCACAGCTGCTCCTTTAGTCTCACCTCCTGT

Abb. 13: Abschnitt DLA-64B, in gelb unterlegt die verwendeten Primer.

2.5.2.3.3. DLA-64D

Getestet wurden die Primer für den DLA-64D im ersten Durchgang im Temperaturbereich 53°C bis 60°C, im zweiten Durchgang bei den Temperaturgradienten 58,2°C bis 64,9°C. Dabei wurde 55°C als optimale Reaktionstemperatur für den Abschnitt DLA-64D bestimmt. Im Folgenden ist der Abschnitt DLA-64D mit dem gewählten Primerpaar dargestellt:

GACCACGTCCTGTTTATTCTCCTCTAGGTGATGACAGTGCCAGGGCTCTGATGTGTCTCTGACAGC
TCCTAGAGGTGAGACCCAGAGACCCTGAAGTGGGGAGGGTTGGGGCACTGGGGACCAGATGAGC
ACGAGGGGGCTGTTGAGAATGTCAGCACTTATGTGACCGACCTCACAGTACCGACAATTTGTA
GATTTTTTCTCACAGTGTGAGACCAGCTGCCCTGTGGGGACTGAGCGATGCAAGATGTGTTTCA
CTCACGTGATGACATCAACAACCCTGGCTTGTCTCTGCAACAGTGTGAGGATGTGCCTGTGTC
AGGAGCATAATGTGAGGAGGTGGGGAGATTGGCCACCCTGCCACCATGACCTGTCCCTAATCTG
ATGTGCGCTCTTCTCTGATGTGCTTTCCTGTCCAGGAGAGGGAGGGCTGGACCATCTCCATCC
GTCTTTGTTTCATGTTGAGTACTAATGACTTACTACCCGATTGAAAATAAGAATCCCGATATGAG
TGTGTTTCTGAGTCTGGGATGTGGGGCTGATGAGGTAATAAAAGGAGATTTGTGAAGTTGAGAG
AGCAAATAAATGGAAGCCC

Abb. 14: Abschnitt DLA-64D, in gelb unterlegt die verwendeten Primer.

2.5.2.3.4. DLA-64F

Getestet wurden die Primer für den DLA-64F im Temperaturbereich 56°C bis 63°C. Dabei wurde 57°C als optimale Reaktionstemperatur für den Abschnitt DLA-64F bestimmt. Im Folgenden ist der Abschnitt DLA-64F mit dem gewählten Primerpaar dargestellt:

GGACCCCTCTACATCTCTGTGGGCTACGTGGACGACACGCAGTTCTGCGGTTCAACAGCGACGC
GGGAGTCCGAAGGTGGAGCCGCGGGCAGGGTGGATGGAGCAGGAGGGCCGGAGTTTTGGGAG
GAGCAGACGGAGATCGCAAGGTGCACGCCAGACCTCCCGATCCAACCTGCAGACGGCCCTCGG
CTACTACAACCAGAGCGAGGCCGGTGAGTGACCCGGGCGGGTCCAGTTCACGAGTCCATGAACC
CCCTTGCACAGCTGGGGTCTCCCCGAGTTCCCGGGTCCGAGATTGACCCCGGGCCAGGAGACCG
TCCTGGCCCCCTACGCGGGACGAGCCTGCAGGGACTTGCAGGACAGTTTCCGAGGTCTCTGACCA
CGCCGGCCGTAGGTCCAATGCCAGGGGAGTCTAGGTGGACCGGGCTGACGGCGGGGACCGGGCTA
CCGGGGCGGGACTGACTGAGACGGGGCGGGGGGGGTTGCCAGGGTCTCACACCTTCCAGTGG
ACTTCGGGCTGCGACGTGGGGCCGACGGGCGCCTCTCCGCGGGTATGAGCAGTTCGCGTA

Abb. 15: Abschnitt DLA-64D, in gelb unterlegt die verwendeten Primer.

2.5.2.4. DLA-88

Um die wichtigen Bereiche des DLA-88 abzudecken, wurde nur ein Primerpaar benötigt. Die Gensequenz entstammte der NCBI-Datenbank mit der Acc.-No.: NM001014767 (Burnett et al. 1997; Graumann et al. 1998; Wagner et al. 2000). Getestet wurden die Primer für den DLA-88 im Temperaturgradienten. Die vom Hersteller MWG angegebene Annealing Temperatur diente als Mittelwert (+/- 4°C). Als optimale PCR-Temperatur wurde 56°C festgelegt. Bei dieser Temperatur wurden im Vergleich zu einer 1kb Standardleiter PCR-Produkte in gewünschter Länge produziert. Im Folgenden ist der Locus DLA-88 mit dem gewählten Primerpaar dargestellt:

TGCGCGGCTACTACAACAGAGCGAGGCCGGTGAGCGGCGCGGGCCCGGGCCAGGGCACGACCC
CCATCCCCCGACCGGCCGGTTCGCCCCGAGGGTCCGGGTCCGGCGTCACCCCGAGTCCGAGGCC
CCCGCCCTCCCCCTCGTCCCCGTCCCGAACCCGCGGGAACCTCCCGGGAGGTTTACTTTCTCTTTG
GACTGATTGGCGCCTGTGCGGGCGGGGCCAGGGTCTCACACCCGCCAGACCATGTACGGCTGTG
ACCTGGGGCCCGGCGGGCGCCTCTCCGCGGGTACAGTCAGGACGCCTACGACGGCGCCGATTAC

ATCGCCCTGAACGAGGACCTGCGCTCCTGGACCGCGGCGGACACGGCGGCGCAGATCACCCGGCG
CAAGTGGGAGGCGGCAGGTACTGCAGAGCACGATAGGAACTACCTGGAGACGACGTGCGTGGAGT
GGCTGCGGAGGTACCTGGAGATGGGGAAGGAGACGCTGCTGCGCGCAGGTACCGGGGCCCCGGC
CTCCCCGATCTCGCCTCCACTAGGGAGGGCTTCCACCAGGAAGGGAATATGGACTCAGGGTCAGA
ACACCGCCCCCTCCACGGGTGGGGACAGGGGATCCGCCTGGGTGTTGATAGTCTACTAGGGTGAC
TCACCCAGAGGCCGCTTTTCTCGAAGGGCAATGGAGCAATCCAGGGTCTCCGGGAGGCAGGTGGA
GGCCATCCTGAGATAACCGCCAGTGGTGCCTTTGACCTGGCAGCTGGGTGGGAACCATGACTTTC
CCTCAAGGCCTTCTTCAATGAAAACATATTTGGAGCTTGAACCTCGGAGTTTTCTGACTCCTTCAGCC
TCCACCACGGTCAGGACCATTAGTGTGCTCTCCACCTTAGACCTGCAGCCTCCTACCCTGGACTCTC
TCCCTGATTCTAGAATTTCTAAAGATTAGGATATCCCAAAGGCTAGGTTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
TTCTTCCAAGTGAACCAACTGCCCTGTCCACCCTAGGATGGTCACAAAATGCAGTCTCAGTGGACC
ACGCAGTTAACCAAAATGTGGGTTTTCCAATTTCTTCTCAGAACCCCCAGCACACGTGTGACC
CGCCATCCTCTGACCATGAGGTCACCCTGAGGTGCTGGGCGCTGGGCTTCTACCCTGCGGAG
ATCACCTGACCTGGCAGCGGATGGGGAGGACCAGACCCAGGACACAGAGGTTGTGGACACAAG
GCCTGCAGGAGATGGGACCTTCCAGAAGTGGGCGGCCGTGGTGGTGGCCTCTGGACAGGAGCAGA
GATACACGTGCCACGTGCAGCATGAGGGGCTGGCGGAGCCTGTCACGCGGAGATGGGGTAAGGAG
GGCCTCGGGGTAGAGCTTCTACTCAGGGCAAGTGGAGCTTCTGGAGAATTCAGCAGAGTCAGG
ACTCAAGCCAGAGGCTGGACCCTCATCTCCCTCCCTTTCCAGAGCCTTCCCCTCTGTCCACCATT
GTCATCGTCAGCATTGCTGCTCTGGTTCTCTCGTGGTCTCTGGGGTGATTGGAGCTGTGATCTGGA
GGAAGCAGCGCTCGGGTAGGGAACCGACTGAATACTCTGTGTTTTCTGTCTGTGGGGGGTTTT
CTAGGGAGCACGCTGTCTGCCTTGTAAACGGGAGGTGCCGTCCATACGCAGTACTCTCCCACAC
TGGAGCTGTGTACTCACACTACTGTGCAGCAAACACTTGGGAAAATGAAGGCCAGAGTTTCGCCT
TGGTGATTCTGGTGACGGGACTGATTCCCAGCCGTACAGGACAGAGCGGAAGGCCCTGCTGA
GGACAGACCTCCAGCAAGTCAGGTGGTCCAGTGACCCCTCACCTCATGGCTTGTCTCCTGACCCTG
ACCTGGGCGGTGAGTCAGAATTCTGCAGACTACTCTGCACCAGGACTGGGAGCTTCTCGAGGAT
CTCCTGGCCAGCCCTGTGCCTGGCCTCTACATGATGTTTTCTTCCACAGGAGGAAAAGGACCA
GGCT

Abb. 16: Abschnitt DLA-88, in gelb unterlegt die verwendeten Primer.

2.5.2.5. DLA-DRA

DLA-DRA ist ein MHC-II-Locus und wurde für eine bessere Sequenzierung in 4 Abschnitte unterteilt. Die Sequenzen entstammten der NCBI-Datenbank mit der Acc.-No.: L37332 (Wagner et al. 1995). Getestet wurden die Primer für DLA-DRA im Temperaturgradienten. Die vom Hersteller MWG angegebene Annealing Temperatur diente als Mittelwert (+/- 4°C). Bei der jeweils angegebenen optimalen PCR-Temperatur wurden im Vergleich zu einer 1kb Standardleiter saubere PCR-Produkte in gewünschter Länge produziert.

2.5.2.5.1 DLA-DRA1A

Als optimale PCR-Temperatur wurde 55°C festgelegt. Im Folgenden ist der Locus DLA-DLA-DRA1A mit dem gewählten Primerpaar dargestellt:

TCATGGAGGAGAGTATCAGAGATAGGTATCTGAGACTGTAGTACAGATCCTCAGGGCAGAGTTTC
AACTGCTTATTCTGTTTCAGTGGGAGGGAGAAGGACTAGCCCAAGCAGGGAAGGCTAATTTCTGTC
CTGTGTCCTCAGTACCTCCAGAGGTGACTGTGCTCTCAAACACCCCTGTGGAAGTGGGAGAGCCCA
ACATCCTCATCTGTTTCATCGACAAGTTCTCCCCACCAGTGATCAATGTCACGTGGCTTCGAAATGG
AAACCCTGTCACCACAGGAGTGTGAGAGACAATCTTTTTGCCAGAGAAGACCACCTTTTCCGCAA
ATTCCACTATCTCCCCTTCTGCCCTCAGCCGAGGACGTTTATGACTGCAAGGTGGAGCACTGGGG
TTTGGATGAACCTTCTCAAGCACTGGGGTATGGACCATCCTTCCATCTCCTTTCTTTTATGATTTT
CCCCGGTGATGCATATGTCTGGTGTCTGGGATGTTCCCTAACTCATCCATAACAATTGCTATGACT
CCTATTCCTTGTCTTCTCCC

Abb. 17: Abschnitt DLA-DRA1A, in gelb unterlegt die verwendeten Primer.

2.5.2.5.2. DLA-DRA1B

Als optimale PCR-Temperatur wurde 58°C festgelegt. Im Folgenden ist der Locus DLA-DLA-DRA1B mit dem gewählten Primerpaar dargestellt (5'-3'):

ACGCCATACACAGTCATTACCTCTGTACTGTACTCTGTTTTATTTTCCCCAGAGTTTGAACCACCAA
CCCCCTCCCAGAGACAACAGAGAATGTGGTGTGTGCCCTGGGCCTGATCGTGGGTCTGGTGGGCA
TCATTACTGGGACCATTTTCATCATCAAGGGCATGCGCAAGGTCAAAGCTGGTGAACGCCGAGGGC
CTCTTTGAGGCACTTTCAGGTGGTTTTGATGTAGAGGAAGGC

Abb. 17: Abschnitt DLA-DRA1B, in gelb unterlegt die verwendeten Primer.

2.5.2.5.3. DLA-DRA1C

Als optimale PCR-Temperatur wurde 54°C festgelegt. Im Folgenden ist der Locus DLA-DRA1C mit dem gewählten Primerpaar dargestellt (5'-3'):

TTCTCCCCTCCTAGTTC TGTTCAACATGGATGTCCTGCACCTGAGCCTCATCTTCCAGCTCATTCTG
CTCTCTATCATTCTCCATTCCACATGGCCAATCCCTTCCACTGCCACACCCACATGTTTGTCTCAC
ATCTGGGTTTCTACTTCTTCTCCTGCTCCTGGTTTCCACCCTAACTCTTCCCTGCCTTTTCAGAGG
AGCACGTAATCATCCAGGCTGAGTTCTATCTGACCCCTGACCCATCAGGCGAGTTCATGTTTGACTT
CGATGGTGTAGAGATTTTCCACGTGGATATGGAAAAGAAGGAGACGGTGTGGCGCCTTGAAGAAT
TTGGACGTTTTGCCAGCTTTGAGGCCCTAGGGTGCCTTGGCCAACATAGCTGTGGACAAAGCTAAC
CTTGACACAATGATAAAGCGCTCCAACCACACCCCGAACACCAATGGTACGTGCTGCACTCCTAGA
CATGGGGATCATAACTTTGAAATAGATGCTTCAGCTTATGTGTTACATTATTGTGACTGACTTTCCC
TCCCAGGGGCCTAGTGTGGCCATAAACAAGTCCCTACTTCTCATGCCACAGGCCCAAGAATTCAT
ATGAGTTTGTTCCTTCTGATGTGCTCATATCTCATCCTTACCATCCACAGTCACTTATAGAGCCAT
TGCCCCAAATCTATGCTGGGGAGGGTGGGCAGGAATGAAATTATCTCCAGTGCCTAAAATATCCTG
TATATCTTACACCACAGCACTG

Abb. 18: Abschnitt DLA-DRA1C, in gelb unterlegt die verwendeten Primer.

2.5.2.5.4. DLA-DRA1D

Als optimale PCR-Temperatur wurde 58°C festgelegt. Im Folgenden ist der Locus DLA-DRA1D mit dem gewählten Primerpaar dargestellt (5'-3'):

GACCTCCCAACAAATCACAGAAGAAAATGACCATAAGTGGAGTCCCAGTGCTAGGATTTTTCATCA
TGGCTTTCCTGATGGGTCTCAGGAATCATGGGCTGTCAAAGGTAAGTGCTGAGAGAAAACAAAAT
TGGGATAGAAATTCTGAGAGCATTGGAGAGATAAATTGTAATATTTGCAAGACTGTCTTTGAAGT
GAAGGAAAAGTGTGGC

Abb. 19: Abschnitt DLA-DRA1D, in gelb unterlegt die verwendeten Primer.

2.5.2.6. DLA-DRB

DLA-DRA ist ein MHC-II-Locus und wurde für eine bessere Sequenzierung in 2 Abschnitte unterteilt. Die Sequenzen entstammten der NCBI-Datenbank mit der Acc.-No.: AH003370 (Wagner 1996c).

2.5.2.6.1. DLA-DRB1

Getestet wurden die Primer für den DLA-DRB im Temperaturgradienten. Die vom Hersteller MWG angegebene Annealing Temperatur diente als Mittelwert (+/- 4°C). Als optimale PCR-Temperatur wurde 57°C festgelegt. Bei dieser Temperatur wurden im Vergleich zu einer 1kb Standardleiter saubere PCR-Produkte in gewünschter Länge produziert. Im Folgenden ist der Locus DLA-DRB1 mit dem gewählten Primerpaar dargestellt (5'-3'):

TCAGCACCATCAGTATCAGCATCAGAGCTGTCATCCAGGAGCCTCCAAGAAAACACAGACACACC
ATGCTGGAAAACAGAAAGGACAGGGTGCAGGGGAGCAGTCAGGTGTCACTCAGTGAAGACTGGG
ACCCTACTTTGGCCACATCCTAAATAACACTAACCAAAGAATTCATTTTCATTGTCCCTGGATTGGGT
AATCTTGGTGATAAGAACCAATCAGCAACAGCAATATATTGCATCATCAGTTGCTGGTCAGAGATT
CAGTATGAAGAGCCTCTTCTGAACTTTGATTTTGTTCATTGAAAGGATTGTTTAACTTAATACTT

TAAAGATTTGATCCAGGTGTATATGAAACATTTTATTGGACCCCTATTGTGAGCCAGTTCTGTGCTG
GGCAGTGATGTGCACGAAAGTTCGAGCCTTCTAAGAGTATTCATGTCTCTCTTGAAGACAGAATTG
TTTTGATCCATGTAATGTGTTTTTAGGAGCTGAGGACATGGAGAGTGATTGCAAGTCAAGAACCCT
TTGCTCTGGACCTTGCT

Abb. 20: Abschnitt DLA-DRB1, in gelb unterlegt die verwendeten Primer.

2.5.2.6.2. DLA-DRB1B

Das Primerpaar für den Locus DLA-DRB1B wurde von Angles et al. (2005) übernommen. Als optimale Annealingtemperatur wurde 57°C angegeben. Im Folgenden wird der von den gewählten Primern flankierte Sequenzabschnitt DLA-DRB1B aufgeführt:

CCGTCCCCACAGCACATTTCTTGGAGATGTTAAAGTCCGAGTGCTATTTACCAACGGGACGGAGC
GGGTGCGGTTTCGTGGAAAGATACATCCATAACCGGGAGGAGAACGTGCGCTTCGACAGCGACGTG
GGGAGTACCGGGCGGTACGGAGCTCGGGCGGCCGACGCTGAGTACTGGAACCCGCAGAAGGA
GCTCTTGAGCGGGCGGGCCGCGGTGGACACCTACTGCAGACACAACACTACGGGGTGGGCGAGA
GCTTCACGGTGCAGCGGCGAGGTGAGCGCAGCGGGCGCCTGGTGCTGAGGTGTGTGACACA

Abb. 21: Abschnitt DLA-DRB1B, in gelb unterlegt die verwendeten Primer.

2.5.2.7. DLA-DQA

DLA-DQA ist ein MHC-II-Locus und wurde für eine bessere Sequenzierung wie DLA-DRB in 2 Abschnitte unterteilt. Die Sequenzen entstammten der NCBI-Datenbank mit der Acc.-No.: AH003446 (Wagner 1996d).

2.5.2.7.1 DLA-DQA1

Getestet wurden die Primer für den DLA-DQA1 im Temperaturgradienten. Die vom Hersteller MWG angegebene Annealing Temperatur diente als Mittelwert (+/- 4°C). Als optimale PCR-Temperatur wurde 60°C festgelegt. Bei dieser Temperatur wurden im Vergleich zu einer 1kb Standardleiter saubere PCR-Produkte in gewünschter Länge produziert. Im Folgenden ist der Locus DLA-DQA1 mit dem gewählten Primerpaar dargestellt (5'-3'):

GCCACCAACAAGCATACACATCCATAGAAAGATTGATTGAGTGAGCCTCCTCCTGTCCTAGGTAAT
TCCCCAGGTCCACTCTCCATGCAGGCTACCTCAGAACAAGGGGATTTCCCAGTATCTTCTGGCTTC
TAGTACAAACTCTTCAACTGGCAACAGCAGTGTACCATAAAGGCATTTTCTGATTGGCCAGAAC
CTGACCTGGCAGTTTTGGTTTGGGTGCTTTAGATTCCCCTTTCTGTTGGGTCCCTACCCTAGTTCT
ACAATTCAGAACAGCAAGTGTGGAGACCGCACGGAGAAGAGGATGATCCTAAACAGAGTTCTGAT
TCTGGGGACCTCATCCTGACTATTATGATGAGCCCCTCTGGAGGTGAAGAGATTGTGGGTGAGTG
CACACCTGAGGGATATGGGGACTAGACTAGGGAAAAGGAATTGGAAGGGGAAAAAGAGAGAATG
GCATAAAATAGTGGAGACTCCTCAAAGGTGTTCTCAATATTAAGCAATTCTAAAATTTTAATCATT
CTTCCTCAGGAACTAGAGACCCAACCCACTGTCTTTGCTCCCTGA

Abb. 22: Abschnitt DLA-DQA1, in gelb unterlegt die verwendeten Primer.

2.5.2.7.2. DLA-DQA1B

Das Primerpaar für den Locus DLA-DQA1B wurde von Angles et al. (2005) übernommen. Als optimale Annealingtemperatur wurde 57°C angegeben. Im Folgenden wird der von den gewählten Primern flankierte Sequenzabschnitt DLA-DQA1B aufgeführt:

TAAGGTTCTTTTCTCCCTCTGTTTTCTGCTTCCTGCTCCTCACCCCTGCTGCTCAGCTGACCATGTTG
CCAACACTACGGCATAAATGTCTACCAGTCTTACGGTCCCTCTGGCCAGTACACCCATGAATTTGATG
GCGATGAGGAGTTCTACGTGGACCTGGAGAAGAAGGAAACTGTCTGGCGGCTGCCTGTGTTTAGC
ACATTTAGAAGTTTTGACCCACAGGGTGCACCTGAGAACTTGCTATAATAAAAACAAAACCTTGAAC

ATCATGACTAAAAGGTCCAACCAAAGTCTGCTACCAATGGGTATGTGTCTACCATTCTGCC**TCTCT**
TCACTGAATCTGTCC

Abb. 23: Abschnitt DLA-DQA1B, in gelb unterlegt die verwendeten Primer.

2.5.2.8. DLA-DQB

DLA-DQB ist ein MHC-II-Locus und wurde für eine bessere Sequenzierung ebenfalls in 2 Abschnitte unterteilt. Die Sequenzen entstammten der NCBI-Datenbank mit der Acc.-No.: AH006318 (Wagner 1998b).

2.5.2.8.1. DLA-DQB1

Getestet wurden die Primer für den DLA-DQB1 im Temperaturgradienten. Die vom Hersteller MWG angegebene Annealing Temperatur diente als Mittelwert (+/- 4°C). Als optimale PCR-Temperatur wurde 53°C festgelegt. Bei dieser Temperatur wurden im Vergleich zu einer 1kb Standardleiter saubere PCR-Produkte in gewünschter Länge produziert. Im Folgenden ist der Locus DLA-DQB1 mit dem gewählten Primerpaar dargestellt (5'-3'):

CCCCATTAGGAGGATTGAGCCACAGGATGGGGATGTCCTCATCTCATCCTTAGAGGTGGACATGA
GAATGTCACAGAGCTCTCTCCCAAAGAGAGGAAACTGTGATAAAAGTCTATATTCTGAGATCAT
AGAACCTTCCACACTCCACCAAAGGTCTTCAGAGCCTGTTCCCAAGAGCAGTGGCCCTGGGGA
GCAGGTGCTCCTGCACTTACGTGGAGAGTCTCTGCCCTCAGCCACTGGGATGCTCAGCACCACCAGG
ATCATCATCACAGCTGCTGTCCAGAAGCCTCGGGGGATGCACAGAGTCATCTTCCCAGACATAACT
GAGAACAAAGGAAAAAGTTGGTAGTCAACACAGCTCCTACCTGGTGGCTCTGAAGTACTCACTTCA
AAGAATAAAAATCTGTAAAAGCTTCCATCCATAGTAGGATTGGAGAGTTCCTAGGGAGGGAAACCA
ATCAGCACCGGAGCTGAAGTACCTCACCTGTCTCCGGGCAGACATTCGTTATGAAGGTTCTCAGTC
CAGTGCCTGGCGCTGTGTCTTCATCAGATTACACTAGATGAACACTTGAGGTGACGATTTTCTCCTA
TAGAAGACCTAAAGATTGAATGCCTTAGGGGTTAAGAACTGAACAAAAAATGACTCGAGAGTA
GACATCTTTGTGCAATTTTGGATTATTTAGTTCTTATACCTTTGGTTTTTAGTAAATAAGTGGGATCC
TATTTTCAGGGAAGAGAAAATTATGTACAGAGTTGTTCACTTCTATTGTCTTAGACACTCTGAGGA
GCCTTCAGTCACGCTGGGAAGAGCATAGTTCTTAGGAGGAAATGGTTTTGAATTGCAATTTACCA
CTAATAGGCTTTATGAGAGCAAATTAAGCCTCTTTTTGCCTCAGGCTTCTTTGGTAAAATGTG
GATCACGTTGCCTGCATTGTATATCCAGGTCATTATATATACGAACTTAAGAGTAATAGGACTTGT
TAATATT**GCAAAGTGTTCTCAGC**

Abb. 24: Abschnitt DLA-DQB1, in gelb unterlegt die verwendeten Primer.

2.5.2.8.2. DLA-DQB1B

Das Primerpaar für den Locus DLA-DQB1B wurde von Angles et al. (2005) übernommen. Als optimale Annealingtemperatur wurde 60°C angegeben. Im Folgenden wird der von den gewählten Primern flankierte Sequenzabschnitt DLA-DQB1B aufgeführt:

TCACTGGCCCGGCTGTCTCCCGCAGAGGATTCGTGTACCAGTTTAAGGGCGAGTGCTATTTCCAC
AACGGGACGGAGCGGGTTCGGCTTCTGACTAAATACATCTATAACCGGGAGGAGTTCGTGCGCTTC
GACAGCGACGTGGGGGAGTACCGGGCGGTACGGAGCTCGGGCGGCCCGACGCTGAGTACTGGAA
CCGACAGAAGGACGAGATGGACCGGGTACGGGCCGAGCTGGACACGGTGTGCAGACACAACACTAC
GGGAGGGAAGAGCTACACAGTTGC**AGCGGCGAGGTGAGCGCAC**

Abb. 25: Abschnitt DLA-DQB1B, in gelb unterlegt die verwendeten Primer

- Material und Methoden -

<i>Primer Name</i> (Locus)	<i>Primer forward (5'-3')</i>	<i>Primer reverse (5'-3')</i>	<i>PCR Produkt in bp</i>	<i>Gewählte Annealing Temperatur in °C für PCR</i>
DRA1A	TCATGGAGGAGATATCAG	GGGAGAAGACAAGGAATAG	551	55
DRA1B	ACGCCATACACAGTCATTACC	GCCTTCCCTCTACATCAAACC	241	58
DRA1C	TTCCTCCCTCCTAGTTC	CAGTGTCTGTGGTGTAAAG	756	54
DRA1D	GACCTCCCCAACAAAATCACAG	GCCACACTTTTTCCTTCACTTC	214	58
DRB1	TCAGCACCATCAGTATCAGC	AGCAAAGGTCCAGAGCAAAG	545	57
DRB1B*	CCGTCCCCACAGCACATTC	TGTGTACACACCTCAGCACC	270	57
DQA1	GCCACCAACAAGCATACACATC	ACATCACAGGGAGCAAAGACAG	581	60
DQA1B*	TAAGGTCTTTTCTCCCTCT	GGACAGATTTCAGTGAAGAGA	246	57
DQB1	CCCCATTAGGAGGATTG	GCTGAGGAAACACTTTGC	1018	53
DQB1B*	TCACTGGCCCGGCTGTCTCC	GGTGGCTCACCTCGCCGCT	267	60
DLA12A	ACCACCTGAGATCCTGAGTTG	CACCTAAGCCCAGACCTTTAG	562	59
DLA12D	TCAAGGCAGAGACTCAAG	CGTAGCCACACAGAGATG	815	56
DLA12E	GCAAGTCAAGGGTCTAAG	TCGCTCTGGTTGTAGTAG	1034	53
DLA12F	CTCCACCGACCCCTAAAG	GTCACAGCCAAAACATCC	860	56
DLA12I	TGGACAGGAGCAGAGATAC	ACAGGAGGTGAGACTAAAGG	837	57
DLA12K	CCCACAGGAGGAAAAGGAC	ACAGGAAAGCACATCAGAGAAG	555	59

Primer Name (Locus)	Primer forward (5'-3')	Primer reverse (5'-3')	PCR Produkt in bp	Gewählte Annealing Temperatur in °C für PCR
DLA88	TGCGGGGCTACTACAAC	AGCCTGGTCTCTTTTCCTC	2011	56
DLA79B	GTTTCACCTTCTCTCACATC	TCAGCACGAAAAGTCTACAAC	930	54
DLA79D	TATGACGGCCTGGATTAC	CACACTCTGGGTTACCTTC	764	57
DLA79F	TTCAGACCCCCCCCCAAAAC	ATGCCAAAACCCCTCCTTAC	300	58
DLA79G	TTGAGATGGGGTAAAGGAG	GAAGACTCACGGCTGTATG	752	57
DLA79H	ACCATAGCCTTCTCCTTAG	ACAGACAGCACAGCAAATC	933	55
DLA64A	CTGGAGAGAGGGAAAAGAGAC	CTGACGATGACAAATGGTG	1021	58
DLA64B	TGGACAGGAGCAGAGATAC	ACAGGAGGTGAGACTAAAAGG	860	58
DLA64D	GACCACGTCCTGTTTATTCTCC	GGGCTTCCATTATTTTGCTC	616	55
DLA64F	GGACCCCCCTCTACATCTCTG	TACGGGAACTGCTCATAACC	584	57

* = Primer bereits etabliert (Angles et al. 2005)

Tab. 6: Liste der verwendeten Primer mit Länge des amplifizierten Produktes in Basenpaaren (bp) und optimaler Annealing-Temperatur

2.6. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Alle unter 2.4 aufgeführte Genloci wurden mit Hilfe der in Tab. 6 genannten Primer über eine Polymerasekettenreaktion (PCR) vervielfältigt und untersucht. Die PCR ist ein Verfahren zur enzymatischen Vermehrung eines DNA-Abschnittes zwischen zwei Oligonucleotid-Primern, die gegenläufig an komplementären DNA-Abschnitten gebunden sind. Dabei bedient man sich in vitro natürlicher Replikations- und Reparaturmechanismen der DNA. Der zu amplifizierende Bereich wird durch die Auswahl der jeweiligen Primerpaare determiniert. Die Bedingungen der PCR sind abhängig von den Primersequenzen, die bei der zugehörigen Optimaltemperatur am besten binden und damit eine maximale Produktmenge erreichen. Für die PCR wurde eine 96-Well-Mikrotiterplatte verwendet. Die Amplifikation erfolgte in einer Gesamtmenge von 30µl, der Reaktionsansatz ist in Tab. 7 aufgelistet. Die PCR wurde in einem auf 95°C vorgeheizten Biometra Thermocycler (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Das PCR-Protokoll ist in Tab. 8 aufgeführt.

<i>Reaktionskomponenten (Konzentration)</i>	<i>Eingesetztes Volumen (µl)</i>
HPLC-Wasser	18
PCR-Puffer (10x)*	2,5
Q-Solution (5x)	5
d-NTPs (0,2mM)	0,2
Primer fwd (100µg/µl)	0,2
Primer rev (100µg/µl)	0,2
Taq Polymerase (5U/µl)	0,2
DNA	4

* = Enthält 1,5mM MgCl₂, pH 8,3

Tab. 7: Reaktionsansatz für die PCR einer einzelnen Probe (Mastermix)

<i>Vorgang</i>	<i>Anzahl Zyklen</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Zeit</i>
Denaturierung	1	95°C	10 min
Denaturierung	35	94°C	45 sec
Primer Annealing	35	Primer-spezifisch	45 sec
Primer Extension	35	72°C	45 sec
Final Elongation	1	72°C	10 min

Tab. 8: PCR-Protokoll zur Amplifikation der caninen MHC-Loci

2.7. Aufreinigung der PCR- Produkte

Vor der Sequenzierung mussten die PCR-Produkte von überschüssigen Nukleotiden und Primern sowie Polymerase-Resten gereinigt werden. Dies erfolgte mit dem QIAquick PCR Purification kit (Qiagen, Hilden). Die PCR-Produkte wurden dafür in eine Säulenmatrix überführt, die DNA wurde dabei an eine Silica-Matrix gebunden und nachfolgend in mehreren Schritten gemäß QIAquick Protokoll, Handbuch 4/2000, gereinigt. Verwendet wurden zunächst 100µl AL1-Puffer (Qiagen, Hilden). Nach dem Abzentrifugieren des Puffers bei 13000rpm für 30sec wurden 600µl des AL2-Puffers (Qiagen, Hilden) aufgetragen und ebenfalls bei 13000rpm für 30sec abzentrifugiert. Das Trockenzentrifugieren erfolgte bei 13000rpm für 1min. 30µl des AE-Elutionspuffers (Qiagen, Hilden) wurden auf die Säule aufgetragen und nach einminütiger Einwirkzeit bei 13000rpm für 1min in ein Eppendorf-Tube zentrifugiert. Die Endmenge von 30µl gereinigtem PCR-Produkt wurde bei -20°C verwahrt.

2.8. Sequenzierreaktion

Die Sequenzierung erfolgte mit dem ABI-Prism™ BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Darmstadt) in einem 8er Strip. Die Reaktion wurde in einem 10µl-Ansatz (Reaktionsansatz s. Tab. 9) gemäß dem in Tab. 10 angegebenen Protokoll in einem Biometra Thermocycler (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Die überschüssigen Dye Terminator Ingredienzen wurden über eine Sephadex-G45 Säule (Millipore, Billerica MA, USA und Sigma-Aldrich Inc., München) nach dem Prinzip der Gelfiltration entfernt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in einem automatischen Sequenziergerät (ABI Prism® 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Darmstadt) nach Angaben des Herstellers. Dort wurden die Fluoreszenzemissionen der markierten PCR-Fragmente detektiert. Mit der „Data Collection Software 40100“ wurde aus den registrierten Emissionswerten die Reihenfolge der Strangabbruchsfragmente berechnet und aus diesen Informationen ein Chromatogramm erstellt. Die „Sequencing Analysis Software“ ermittelte daraus die Basensequenz der Matrizen-DNA.

<i>Reaktionskomponenten (Konzentration)</i>	<i>Eingesetztes Volumen (µl)</i>
BigDye Premix	3
Primer (10pmol/µl)	1
Matrizen-DNA	2
HPLC-Wasser	4

Tab. 9: Reaktionsansatz (BigDyeMix) für die PCR zur Sequenzierung

<i>Vorgang</i>	<i>Zyklen</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Zeit</i>
Denaturierung	33	94°C	50 sec
Primer Annealing	33	55°C	10 sec
Primer Extention	33	60°C	3 min
Kühlung	1	4°C	4min

Tab. 10: PCR Protokoll für das Cycle-Sequencing

2.9. Verwendete Datenbanken und Software

2.9.1. Alignment und Auswertung der Sequenzen

Die Peakprofile der Sequenzen wurden mit Hilfe der Software Bioedit (Carlsbad, CA, USA) analysiert. Sequenzdaten wurden einem Editing unterzogen, die ausgewerteten Loci aller getesteten Hunde wurden miteinander verglichen (Alignment). Das Alignment wurde in Bezug zu bereits publizierten Daten der NCBI-GenBank gesetzt.

2.9.2. Klassifizierung der Allele

Die Klassifizierung der Allele erfolgte nach Nomenklatur-Vorgaben der International Society for Animal Genetics (ISAG DLA) (Kennedy et al. 2001). Heterozygote Stellen wurden nach der vorgeschlagenen Nomenklatur der International Union of Biochemistry manuell editiert (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac>):

$$R=G+A; Y=T+C; M=A+C; K=G+T; S=G+C; W=A+T$$

2.9.3. Nomenklatur der Haplotypen

Für Haplotypen der Loci DLA-88, DLA-DRB, DLA-DQA und DLA-DQB wurde 2001 vom ISAG DLA-Nomenklatur Komitee eine Nomenklatur festgelegt, die eine bessere Übersicht über die verschiedenen Haplotypen ergibt (Kennedy et al. 2001). Die Nomenklatur ist abhängig von Allelen des jeweiligen Exon 2. Für die vorliegende Studie wurde die Nomenklatur für die Loci DLA-DRB, DLA-DQA und DLA-DQB übernommen, Allele des Exon 1 wurden gesondert dokumentiert.

2.9.4. Statistische Auswertung

Die statistische Signifikanz der DLA-Allelfrequenzen wurde mittels eines χ^2 -Tests nach Pearson (SPSS 13) bzw. bei niedriger Fallzahl (bei $n < 5$) mittels zweiseitigem Fischer-Exakt-Test einschließlich der Ermittlung des 95%igen Konfidenzintervalls durchgeführt (SPSS 13). Die odds ratio (OR) wurde über die Methode der Haldane's Modifikation der Woolf's-Methode durchgeführt, die bereits im Rahmen von HLA-Assoziationsstudien erfolgreich angewandt wurde (<http://home.clara.net/sisa/two2hlp.htm>).

3. Segregationsanalyse

Die Segregationsanalyse wurde zur Untersuchung und Ausschluß von Erbgangshypothesen eingesetzt. Ziel war es, aufgrund vorliegender Phänotypen einer Krankheit innerhalb einer Familie den Vererbungsgang zu bestimmen. Die Analyse beruhte auf der Anpassung von verschiedenen genetischen und nicht-genetischen Modellen und der Selektion des Modells, welches die Daten am besten erklärte. Modelle, die in der komplexen Segregationsanalyse Verwendung finden, beruhen auf Maximum-Likelihood-Methoden und erlauben daher den Test auf monogene, polygene und gemischt monogen-polygene Erbgänge (Bonney, 1984, 1992).

3.1. Probanden

Die Cocker Spaniel- und Irish Red Setter-Pedigrees wurden jeweils in mehrere Unterfamilien eingeteilt, die von jeweils einem kranken Probanden ausgingen. Dabei wurden die direkten Eltern des Probanden, Großeltern und Geschwister des kranken Hundes erfasst. Ein Hund, der in zwei Familien auftrat, wurde dupliziert, um die Familienstrukturen zu erhalten. Die Probanden und somit auch die Unterfamilien wurden anhand bestimmter Kriterien in Gruppen eingeteilt, für jede Gruppe wurde die Berechnung einzeln durchgeführt.

Kriterium für die Aufnahme in die Gruppe „Cocker Spaniel 1“ bzw. „Irish Setter 1“ war die Diagnose pIHA des Probanden (Material und Methoden, Kap. 1.3 und 1.5). In der Gruppe „Cocker Spaniel 1“ wurden 7 Hunde als IHA-positiv getestet. Alle anderen Hunde wurden als nicht erkrankt eingestuft ($n = 77$). In der Gruppe „Irish Setter 1“ wurden 8 Hunde als IHA-positiv getestet, alle anderen Hunde als gesund eingestuft ($n=66$) (Tab. 11).

In die zweite Gruppe „Cocker Spaniel 2“ bzw. „Irish Setter 2“ wurden die Unterfamilien aller Hunde aufgenommen, bei denen entweder eine IHA, ITP oder das Evans' Syndrom diagnostiziert wurde (Material & Methoden, Kap. 1.3 – 1.5). Die Gruppe „Cocker Spaniel 2“ umfasste insgesamt 16 kranke Hunde, davon waren 8 an IHA, 4 an ITP und 4 am Evans' Syndrom erkrankt. Alle anderen verwandten Hunde aus dem Pedigree, die in die Berechnung mit einfließen, wurden als gesund eingestuft ($n=105$). Die Gruppe „Irish Red Setter 2“ umfasste insgesamt 10 kranke Hunde, davon waren 7 an IHA, 2 an ITP und 1 am Evans' Syndrom erkrankt. Alle anderen Pedigree-Mitglieder, die mit in die Berechnungen einfließen, wurden als gesund klassifiziert ($n=66$) (Tab. 11).

<i>Gruppe</i>	<i>Einschlusskriterium für Proband + zusätzliche Mitglieder</i>	<i>Anzahl Pedigrees</i>	<i>Anzahl kranke Hunde/ Hunde insgesamt</i>
Cocker Spaniel 1	1. Mitglieder des Cocker Spaniel Pedigrees 2. Proband = Erkrankung an IHA 3. Zusätzlich: Eltern, Großeltern und Geschwister des Probanden	4	7 (2 m, 5 w) / 77 (41 m, 36 w)
Cocker Spaniel 2	1. Mitglieder des Cocker Spaniel Pedigrees 2. Proband = Erkrankung an IHA, ITP oder Evans' Syndrom 3. Zusätzlich: Eltern, Großeltern und Geschwister des Probanden	5	16 (2 m, 14 w) / 105 (47 m, 58 w)
Irish Setter 1	1. Mitglieder des Irish Setter Pedigrees 2. Proband = Erkrankung an IHA 3. Zusätzlich: Eltern, Großeltern und Geschwister des Probanden	3	8 (2 m, 6 w) / 66 (24 m, 42 w)
Irish Setter 2	1. Mitglieder des Irish Setter Pedigrees 2. Proband = Erkrankung an IHA, ITP oder Evans' Syndrom 3. Zusätzlich: Eltern, Großeltern und Geschwister des Probanden	3	10 (3 m, 7 w) / 66 (24 m, 42 w)

Tab. 11: Einschlusskriterien für Probanden und Anzahl der Pedigrees, die in die Segregationsanalyse gingen. (m= männlich, w= weiblich)

3.2. Segregationsanalyse

Die komplexen Segregationsanalysen der vorliegenden Studie wurden mit der Software jPAP (Prozedur „papfghw“) unter Annahme eines Hardy-Weinberg-Gleichgewichtes durchgeführt (Hasstedt, 2002). jPAP wurde als Programm ausgewählt, weil es derzeit das einzige Programm ist, das neben einer Ascertainment-Korrektur auch Inzuchtschleifen zulässt. Eine Ascertainment-Verfälschung würde dadurch entstehen, dass bestimmte erkrankte Tiere eines Pedigrees aufgrund ihrer Erkrankung die Aufnahme des Pedigrees in die Untersuchung veranlasst haben.

Bei der Analyse wurde die Diagnose IHA/ITP/Evans' Syndrom als binäres Merkmal (gesund – erkrankt) unter der Annahme erhoben, dass diesem Merkmal eine kontinuierliche Variable (liability) zugrunde liegt, wobei ein Schwellenwert den Krankheitsstatus bestimmt (Falconer et al. 1996). Diese Variable beschreibt die Gesamtheit aller krankheitsauslösenden Faktoren. Sobald ein Individuum auf der Achse dieser Variablen den Schwellenwert überschreitet, tritt die Krankheit auf.

Für die Datenanalyse wurden 5 Modelle verwendet:

- (1) Das „allgemeine Modell“ nahm eine nicht-Mendel'sche Segregation und einen Effekt der polygenen Komponente an. In diesem Modell wurden keine Restriktionen gesetzt, wodurch die beste Anpassung an die beobachteten Werte erreicht wurde. Daher konnte dieses Modell als Referenzmodell dienen.
- (2) Das „Mendel'sche Modell“ nahm eine Mendel'sche Segregation ohne polygene Komponente an. Die Transmissionswahrscheinlichkeiten wurden für eine Mendel'sche Vererbung fixiert.
- (3) Das „rezessive Modell“ nahm eine rezessive Vererbung der Erkrankung mit unvollständiger Penetranz an.

- (4) Das „dominante Modell“ beschrieb eine ausschließlich dominante Vererbung der Krankheitsmerkmale mit unvollständiger Penetranz.
- (5) Das „Umwelt-Modell“ nahm an, dass genetische Effekte keinen Einfluss auf die Krankheit haben. Dafür wurden alle Ausgangswerte gleich gesetzt (equality constraint).

Die Hypothese, ob eines der Modelle verworfen werden konnte, wurden über den Likelihood-Ratio-Test geprüft. Um die einzelnen Modelle vergleichen zu können, wurde das „Informationskriterium nach Akaike“ (AIC) zur Beurteilung herangezogen (Akaike 1974). Das AIC berücksichtigte zusätzlich die Anzahl der geschätzten Parameter und bevorzugte somit das Modell, das die beste Anpassung der Daten an das Modell mit der geringsten Anzahl unabhängiger Parameter ermöglicht. Der AIC wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{AIC} = -2 \ln(\text{maximum likelihood}) + 2 (\text{Anzahl unabhängig geschätzter Parameter})$$

Unter diesen Voraussetzungen und nach Berechnung des AIC wurden die Modelle (1) bis (5) miteinander verglichen, die nicht verworfen werden konnten. Das Modell mit dem niedrigsten AIC-Wert beschrieb die Daten am besten.

Verwendete Parameter und die jeweils eingesetzten Startwerte sind in den Tabellen 59-62 im Ergebnisteil aufgeführt.

IV. Ergebnisse

1. Pedigrees

1.1. Cocker Spaniel

Der Gesamtstammbaum umfasste insgesamt 209 Hunde. Sie wurden bis auf fünf Generationen zurückverfolgt. Abb. 1 und 2 zeigen Ausschnitte der Pedigrees, mit Zentrierung der kranken Hunde und Kennzeichnung der Hunde, die untersucht worden sind. Alle Pedigreeteile lassen sich zu einem großen Pedigree zusammenführen. Von den erkrankten Hunden waren zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit bereits 10 (6 IHA, 1 ITP, 3 Evans' Syndrom erkrankte) verstorben, 4 (1 IHA, 1 ITP, 2 Evans' Syndrom) leben noch.

Das Alter aller erkrankten Hunde lag zwischen 4 und 14 Jahren, mit einem Mittelwert von 7,3 Jahren und einem Median von 7 Jahren. Mit 12 weiblichen erkrankten Hunden (86%) und 2 kranken männlichen Hunden (14%) war das Geschlecht zugunsten der weiblichen Hunde verschoben. Bei den gesunden Hunden waren 94 Hunde weiblich und 93 Hunde männlich. Die Prädisposition weiblicher Hunde für IHA / ITP / Evans' Syndrom war mit $p = 0,01$ signifikant (Signifikanzniveau $\alpha=0,05$).

1.2. Irish Red Setter

Die Irish Setter-Familie bestand aus insgesamt 147 Mitgliedern. Die Kernfamilien sind in Abb. 3 und Abb. 4 dargestellt. Von den kranken Hunden sind bis zum Moment der Erstellung der Dissertation 2 (1 IHA, 1 Evans' Syndrom) verstorben, 8 (6 IHA, 2 ITP) lebten noch.

Das Alter aller erkrankten Hunde lag zwischen 0,5 und 10 Jahren, mit einem Mittelwert von 5,1 Jahren und einem Median von 5 Jahren. Mit 7 weiblichen erkrankten Hunden (70 %) und 3 kranken männlichen Hunden (30%) war das Geschlecht auf die Seite der weiblichen Hunde verschoben. Bei den gesunden Hunden waren 73 Hunde weiblich und 64 Hunde männlich. Eine signifikante Prädisposition weiblicher Hunde für IHA / ITP / Evans' Syndrom konnte mit $p = 0,35$ nicht bestätigt werden (Signifikanzniveau $p=0,05$).

Abb. 1: Cocker-Pedigree 1

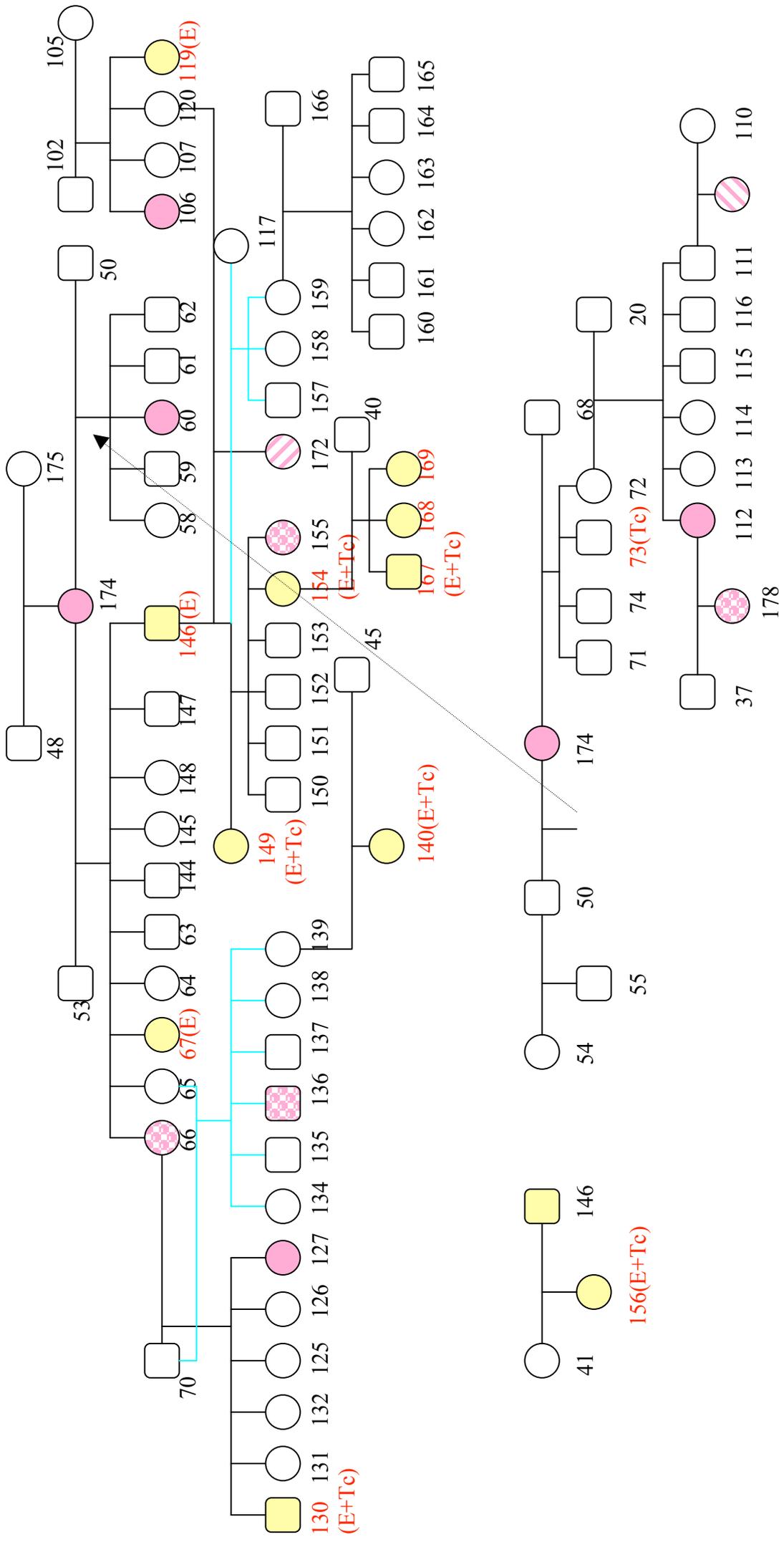


Abb. 2: Cocker Spaniel Pedigree 2

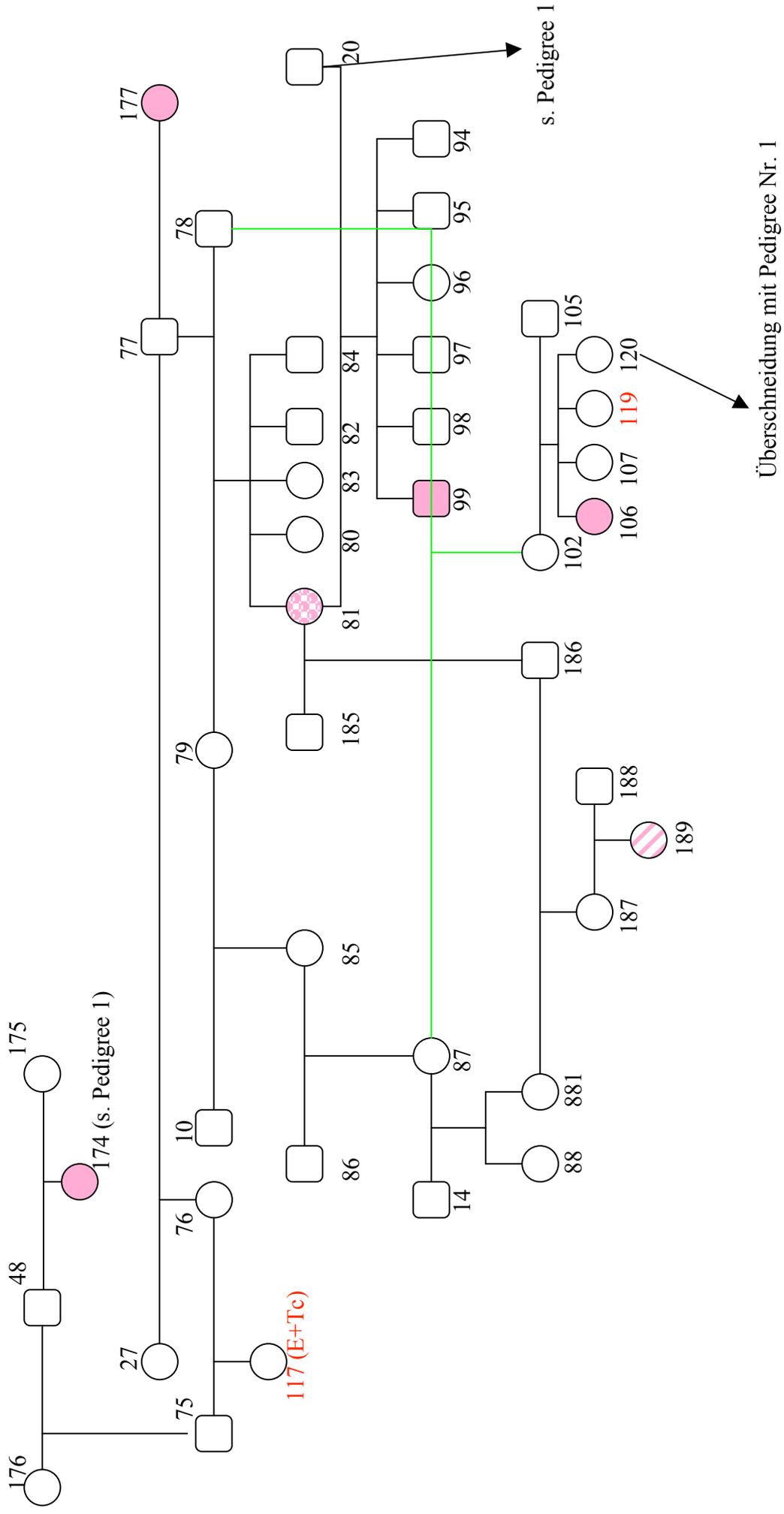
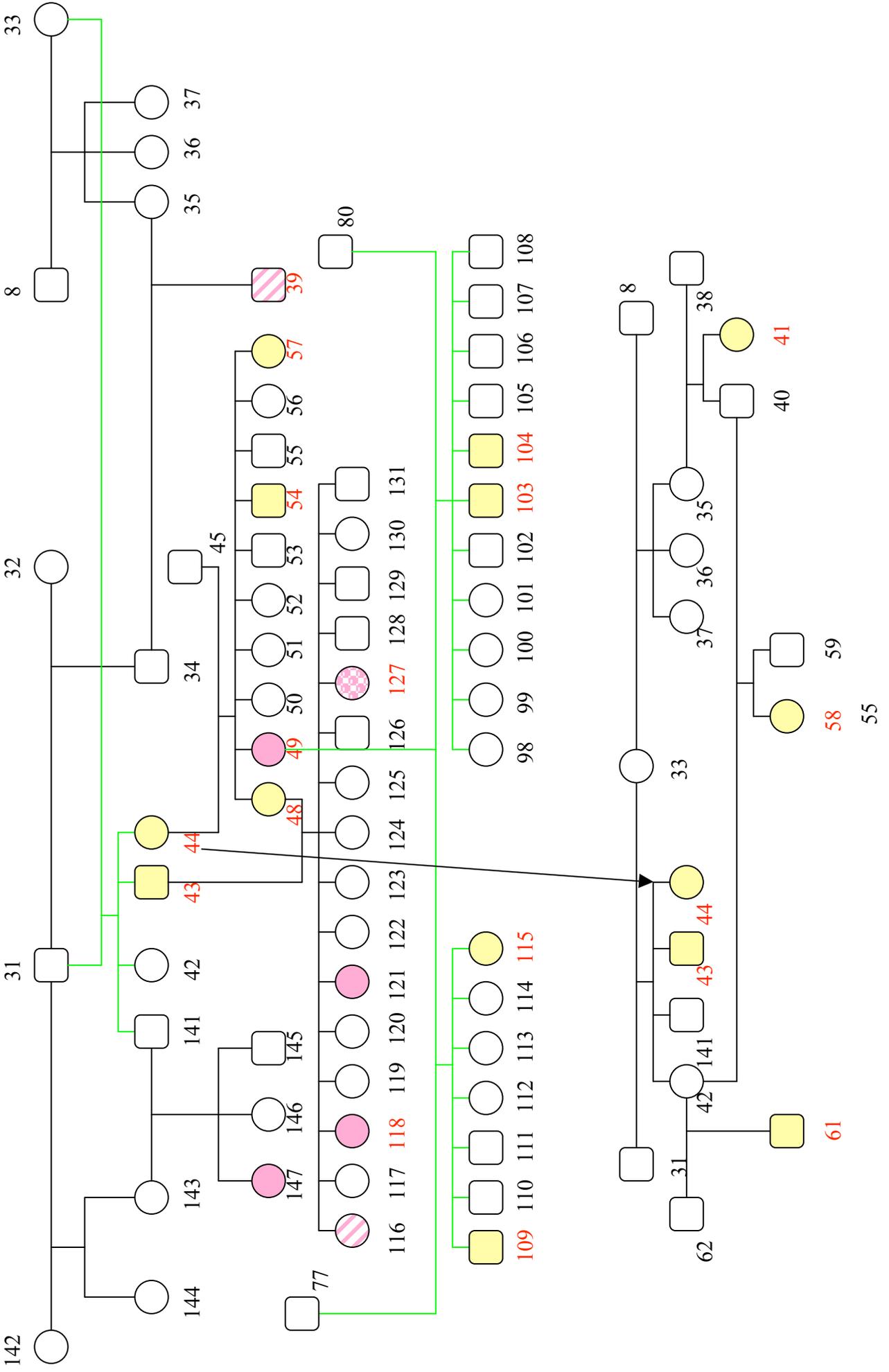


Abb. 3: Irish Red Setter Pedigree 1



Zugehörig zu Abb. 3: Irish Setter Pedigree 1

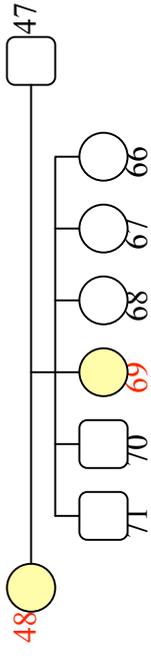
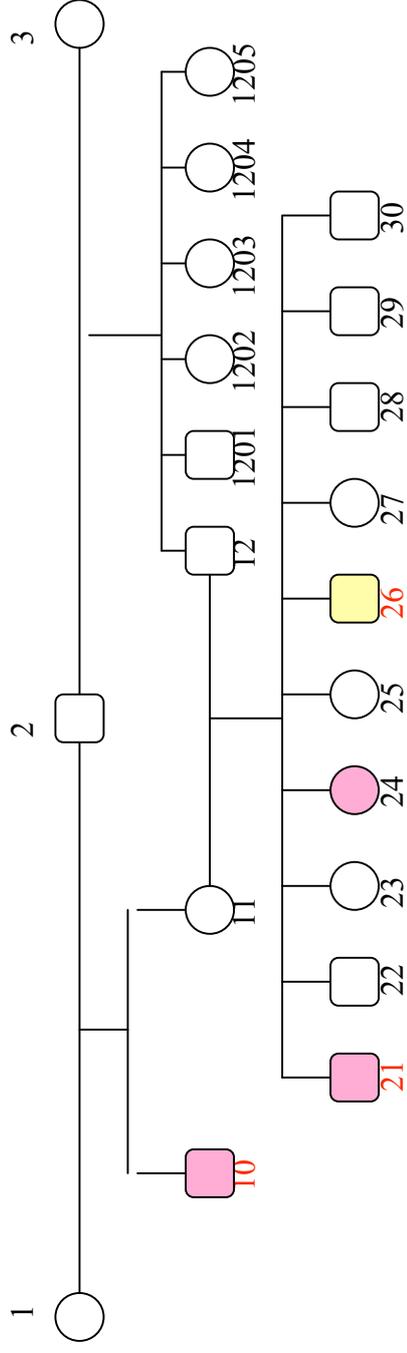


Abb. 4: Irish Red Setter Pedigree 4



Legende für Abb. 1-4:

-  Männlicher Hund, nicht getestet, keine Anzeichen von IHA oder ITP
-  Weiblicher Hund, nicht getestet, keine Anzeichen von IHA oder ITP
-  pITP
-  Evans' Syndrom (pIHA/pITP)
-  pIHA
-  Negativ getestet auf IHA und ITP, hämatologische Untersuchung unauffällig, keine klinischen Symptome

123(E) Coombs-Test durchgeführt

123(Tc) Thrombozyten-Antikörper-Test durchgeführt

2. MHC-I-Untersuchung

2.1. Probanden

Zur Untersuchung von MHC-I-Allelen wurden insgesamt 32 Hunde ausgewählt (Tab. 12). Dazu zählten 2 an IHA und 2 am Evans' Syndrom erkrankte Cocker Spaniel, 3 an IHA und 1 am Evans' Syndrom erkrankte Irish Setter und je 1 an ITP erkrankter Irish Setter und Cocker Spaniel. Zusätzlich wurden 4 an IHA erkrankte Hunde unterschiedlicher Rassen untersucht. Als gesunde Kontrollgruppe dienten je 7 Cocker Spaniel und Irish Setter, die in verwandschaftlichem Verhältnis zu den erkrankten Hunden standen und 4 gesunde, nicht verwandte Rhodesian Ridgebacks. Das mittlere Alter aller untersuchten Hunde lag bei 6,5 Jahren, der Altersmedian bei 5 Jahren. Das mittlere Alter aller kranken Hunde lag bei 5,1 Jahren, der Altersmedian bei 5 Jahren.

In Tab. 12 sind alle für die MHC-I-Untersuchung zugelassenen Probanden mit Pedigreezugehörigkeit, Rasse, Geschlecht, Alter bei Erkrankung und Art der Erkrankung aufgeführt.

<i>Nummer</i>	<i>Nummer im Pedigree</i>	<i>Rasse</i>	<i>Geschlecht</i>	<i>Alter erkrankt/ getestet (J)</i>	<i>Erkrankung</i>
1	66	Cocker Spaniel	wk	8	Evans' Syndrom
2	155	Cocker Spaniel	w	6	Evans' Syndrom
3	--	Cocker Spaniel	w	4	IHA
4	106	Cocker Spaniel	w	6	IHA
5	49	Irish Setter	w	5	IHA
6	130	Irish Setter	w	5	Evans' Syndrom
7	118	Irish Setter	w	3	IHA
8	10	Irish Setter	w	5	IHA
9	54	Irish Setter	m	8	gesund
10	57	Irish Setter	w	8	gesund
11	103	Irish Setter	m	3	gesund
12	44	Irish Setter	w	13	gesund
13	109	Irish Setter	m	3	gesund
14	104	Irish Setter	m	3	gesund
15	115	Irish Setter	w	3	gesund
16	116	Irish Setter	w	5	ITP
17	67	Cocker Spaniel	wk	17	gesund
18	126	Cocker Spaniel	w	14	gesund
19	130	Cocker Spaniel	m	14	gesund
20	149	Cocker Spaniel	w	10	gesund
21	154	Cocker Spaniel	w	7	gesund
22	70	Cocker Spaniel	m	15	gesund
23	146	Cocker Spaniel	m	7	gesund
24	--	Cocker Spaniel	w	3	ITP
25	--	Dobermann	w	9	IHA
26	--	Dogo Canario	m	1	IHA
27	--	Staffordshire Terrier	mk	7	IHA
28	--	Shih Tzu	mk	5	IHA
29	--	Rhodesian Ridgeback	w	3	gesund
30	--	Rhodesian Ridgeback	w	3	gesund
31	--	Rhodesian Ridgeback	m	3	gesund
32	--	Rhodesian Ridgeback	m	3	gesund

Tab. 12: Probandenpool für die Untersuchung des MHC-I mit Rasse, Geschlecht, Alter und Art der Erkrankung. Das Alter wird in Jahren (J) aufgeführt und bezieht sich bei den gesunden Hunden auf das Alter, in dem die Hunde getestet wurden. Bei den kranken Hunden bezieht es sich auf das Alter, wo erstmals die IHA oder ITP diagnostiziert wurde. „Nummer im Pedigree“ bezieht sich bei den Cocker Spaniern auf die Abb. 1 und 2, bei den Irish Settern auf die Abb. 3 und 4. Mit „--“ gekennzeichnete Hunde sind nicht verwandt und daher nicht im Pedigree aufgeführt.

Bei signifikant auffälligen Allelen wurden als Gegenprobe 8 weitere Probanden eingesetzt, um mögliche Prädispositionen bestimmter Polymorphismen zu überprüfen (Tab. 13). Dabei handelte es es um 2 Cocker Spaniel (1 w, 1 wk) mit ITP, 2 Cocker Spaniel (1 w, 1 m) mit Evans' Syndrom, 2 Setter (1 w, 1 m) mit IHA, ein Irish Setter (m) mit ITP und einen gesunden Irish Setter (m) (Tab. 12). Alle Cocker Spaniel und Irish Setter entstammten demselben Pedigree. Das mittlere Alter betrug in dieser Gruppe 7,8 Jahre, der Median 9 Jahre.

<i>Nummer</i>	<i>Nummer im Pedigree</i>	<i>Rasse</i>	<i>Geschlecht</i>	<i>Alter erkrankt/getestet (J)</i>	<i>Erkrankung</i>
33	81	Cocker Spaniel	wk	14	ITP
34	118	Cocker Spaniel	w	10	ITP
35	178	Cocker Spaniel	w	5	Evans' Syndrom
36	49	Irish Setter	w	5	IHA
37	21	Irish Setter	m	0,5	IHA
38	39	Irish Setter	m	9	ITP
39	43	Irish Setter	m	9	gesund
40	136	Cocker Spaniel	m	10	Evans' Syndrom

Tab. 13: Probanden zur Überprüfung von signifikanten Polymorphismen mit Rasse, Geschlecht, Alter und Art der Erkrankung. Das Alter wird in Jahren (J) aufgeführt und bezieht sich bei den gesunden Hunden auf das Alter, in dem die Hunde getestet wurden. Bei den kranken Hunden bezieht es sich auf das Alter, wo erstmals die IHA oder ITP diagnostiziert wurde. „Nummer im Pedigree“ beziehen sich bei den Cocker Spaniern auf die Abb. 1 und 2, bei den Irish Settern auf die Abb. 3 und 4.

2.2. MHC-I-Kandidatengenscreen

Eine Übersicht über die Ergebnisse der MHC-I-Untersuchung an den Loci DLA-12, DLA-64, DLA-79 und DLA-88 ist in Tab. 14 angegeben. Dabei wurde die Größe des PCR-Produktes, die Anzahl der Polymorphismen und die jeweils untersuchten Exone berücksichtigt.

<i>Kandidatengen</i>	<i>PCR-Produkte</i>	<i>Größe</i>	<i>Status</i>	<i>Heterozygote Positionen</i>	<i>Untersuchte Exone</i>
DLA-12	DLA-12A	562	6 Polymorphismen	homozygot	Teil I des 1. Exon
	DLA-12E	1034	16 Polymorphismen	Y, R, S, K	Exon 1 und Exon 2
	DLA12F	860	5 Polymorphismen	S	Exon 2
	DLA12I	837	2 Polymorphismen	K, Y	Exon 5
	DLA-12K	555	5 Polymorphismen	Y, S	Exon 7
DLA-64	DLA64A	1021	1 Insertion	Homozygot	Teile Exon 4
	DLA64 B	860	3 Polymorphismen	K, W, Y	Teile Exon 4, komplett Exon 5 und Exon 6
	DLA64D	616	11 Polymorphismen + 1 Deletion	R, Y,	Exon 7 und Exon 8
	DLA64 F	584	2 Polymorphismen + 1 Deletion	K, S	Teile von Exon 2 und Teile von Exon 3
DLA-79	DLA-79B	930	8 Polymorphismen + 1 Deletion	R, K, Y, S	Exon 1 und Exon 2
	DLA-79D	764	Monomorph	Homozygot	Teile von Exon 3
	DLA-79F	300	1 Polymorphismus	M	Exon 4
	DLA-79G	752	Monomorph	Homozygot	Exon 5
	DLA-79H	933	Monomorph	Homozygot	Exon 7 + 8
DLA-88	DLA88A	705	Ergebnisse nicht auswertbar		Exon 3,4,5

Tab. 14: Untersuchte Loci mit Größe des PCR-Produktes, Anzahl der gefunden Polymorphismen, heterozygote Stellen und untersuchte Exone.

Im Folgenden werden die Besonderheiten eines jeden MHC-I-Kandidatengens genauer dargestellt. Die codierenden Bereiche (Exone) sind sowohl in der Sequenz als auch in den Tabellen fett unterlegt. Für Genloci mit unvollständigen Ergebnissen werden die Sequenzen nicht einzeln aufgeführt. Lückenhafte Resultate sind durch suboptimales Primerannealing bedingt. In einigen Fällen konnten selbst nach wiederholtem Primerdesign und Temperaturanpassungen nicht die gewünschten Sequenzen amplifiziert werden. Die Polymorphismen wurden in der Reihenfolge benannt, in der sie in der Sequenz vorkamen. Die „kranken Hunde“ umfassten im ersten Berechnungsschritt alle erkrankten Hunde, unabhängig ob IHA, ITP oder Evans' Syndrom vorlag. Im zweiten Rechnungsschritt wurden nur die an IHA erkrankten Hunde als „krank“ definiert, um genauere, möglicherweise krankheitsabhängige Mutationen zu finden. Die nur an ITP und Evans' Syndrom erkrankten Hunde konnten aufgrund einer zu geringen Fallzahl nicht gesondert berechnet werden. Die Kandidatengene, die eine Rassespezifität aufwiesen, wurden zudem nach Rasse getrennt bewertet, um eine möglichst genaue Zuordnung der Mutationen zu bewirken und eventuell rassebedingte Mutationen auszuschließen.

Jeder definierte Single Nucleotid Polymorphism (SNP) – unabhängig ob im Intron- oder Exonbereich – wurde auf einen möglichen Zusammenhang zu den erkrankten bzw. gesunden Hunden untersucht. Dabei lautete die Nullhypothese: „Es besteht kein Zusammenhang zwischen dem untersuchten Polymorphismus und der Erkrankung IHA, ITP oder Evans' Syndrom“. Die Berechnung der Odds Ratio bezieht sich immer auf das Allel der selben Zeile und wird wie folgt interpretiert: Die Chance der Hunde, die das gegebene Allel tragen, ist um die Menge der berechneten Odds Ratio höher an IHA/ITP/Evans' Syndrom zu erkranken, als bei Hunden, die das Allel nicht tragen.

2.2.1. MHC-I: DLA-12

DLA-12 ist im caninen Genom auf Chromosom 12 lokalisiert und wurde 1997 von Burnett et al. erstmals beschrieben. 1998 erfolgte eine offizielle Benennung durch die International Society for Animal Genetics (ISAG) (Kennedy et al. 1999). In der vorliegenden Studie wurden 5 Primerpaare designed, um einen Bereich von etwa 4700 bp einschließlich aller codierenden Bereiche des Kandidatengens abzudecken. Eine graphische Darstellung des DLA-12 Locus ist in Abb. 5 wiedergegeben.

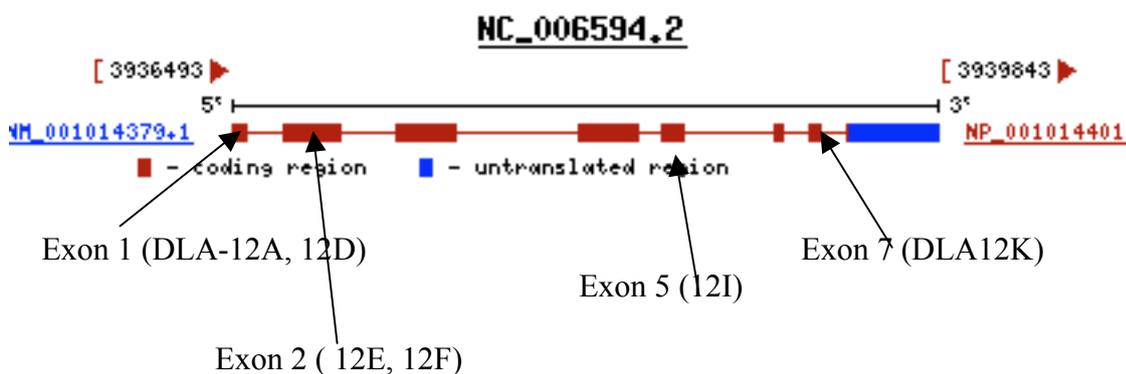


Abb. 5: DLA-12 mit graphischer Darstellung der codierenden Regionen und korrespondierenden Loci, Benennung der Loci s. Tab. 14.

2.2.1.1. Haplotyp-Status DLA-12A

Es wurden 6 Polymorphismen in dem untersuchten 562bp großen Fragment gefunden, die alle im nicht-codierenden Bereich lokalisiert waren. Alle Polymorphismen waren nur homozygot vorhanden.

untersuchte Sequenz 5'-3':

CTGACTGAGGCACCCAGGCACCCCAATACATTTTTAAACCTCTTTTGTTCCTACTATGATAAATATT
 GA^{C/T₁}AGATTAACCCACAGCCACAATTTTCCTGGGATCCTCA^{A/G₂}TAATCTGTGAGACGGTGTAGAT
 GCCCTGTGGGAACAGAAT^{G/A₃}TTCTAGACTCACTGCCTCACACAGCTCCCTGACCAGGACTCAGGG
 AGTCAGAGTGACAAGAGCGCTGTGGGGCAAGGT^{G/C₄}TCAGGACCCCGGGCTGCCTCTCAGGCTCTC
 A^{G/T₅}GCCCCAGGGCGGGTCCGGGGCGGGGACGCTCAGGCTCGGGAGTCCCCACCTCCCCGGGGAT
 TTCACTT^{C/T₆}TTCTCCCAACCTGGCTCTGGGCCCCCTGCCTGGAGACTCATGACGCAGCCCCAGCGC
 GCACTCCCATTGGGTGCAGCCTTTCTGGAGGAGCCAATCAGCGGCACCGGGTCCCGGGCTCTGAAG
 TCCACACCAGAACCGCCAGGACGCAGCTGCTCCACCGACCCTAAAGGTCTG

Es wurde eine Berechnung für alle DLA-12A Polymorphismen durchgeführt. Eine vermutete Assoziation der Variablen „Polymorphismus im DLA-12A“ und „Erkrankung“ wurde durch den Test auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ abgelehnt (p-Werte s. Tab. 15).

<i>Polymorphismus</i>	<i>SNP</i>	<i>Kranke Hunde</i>	<i>Gesunde Hunde</i>	<i>p-Wert (Fisher's exact Test)</i>	<i>Odds ratio</i>	<i>95% Konfidenzintervall</i>	<i>Niveau</i>
1	CC	11/14 (79,6%)	17/18 (94,4%)	0,295	0,22	0,43 - 50,44	0,05
	TT	3/14 (21,4%)	1/18 (5,6%)		4,6	0,02 - 2,35	
2	AA	11/14 (79,6%)	17/18 (94,4%)	0,295	4,6	0,02 - 2,35	0,05
	GG	3/14 (21,4%)	1/18 (5,6%)		0,22	0,43 - 50,44	
3	AA	1/14 (7,1%)	0/18 (0%)	0,437	--	--	0,05
	GG	13/14 (92,9%)	18/18 (100%)		--	--	
4	GG	14/14 (100%)	18/18 (100%)	--	--	--	--
5	TT	1/14 (7,1%)	0/18 (0%)	0,437	--	--	0,05
	GG	13/14 (92,9%)	18/18 (100%)		--	--	
6	TT	1/14 (7,1 %)	0/18 (0%)	0,437	--	--	0,05
	CC	13/14 (92,9%)	18/18 (100%)		--	--	

Tab. 15: p-Werte der im DLA-12A Bereich lokalisierten Polymorphismen zur Prüfung der Nullhypothese; „--“ = alle Hunde wiesen dasselbe Allel auf: Berechnung von p-Wert (DLA-12A₄) und Odds Ratio nicht möglich.

Eine Berechnung der DLA-12A Polymorphismen wurde zusätzlich unter der Voraussetzung durchgeführt, dass nur die an IHA erkrankten Hunde als „krank“ definiert wurden. Auch hier wurde eine vermutete Assoziation der Variablen auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ abgelehnt (p-Werte s. Tab. 16).

<i>Polymorphismus</i>	<i>SNP</i>	<i>Kranke Hunde</i>	<i>Gesunde Hunde</i>	<i>p-Wert (Fisher's exact Test)</i>	<i>Odds ratio</i>	<i>95% Konfidenzintervall</i>	<i>Niveau</i>
1	CC	9/12 (75%)	19/20 (95%)	0,136	0,16	0,01 - 1,74	0,05
	TT	3/12 (25%)	1/20 (5%)		6,3	0,58 - 69,69	
2	AA	9/12 (75%)	19/20 (95%)	0,136	6,3	0,58 - 69,69	0,05
	GG	3/12 (25%)	1/20 (5%)		0,16	0,01 - 1,74	
3	AA	1/12 (8,3%)	0/20 (0%)	0,375	--	--	0,05
	GG	11/12 (91,7%)	20/20 (100%)		--	--	
4	GG	12/12 (100%)	20/20 (100%)	--	--	--	--
5	TT	1/12 (8,3%)	0/18 (0%)	0,375	--	--	0,05
	GG	11/12 (91,7%)	18/18 (100%)		--	--	
6	TT	1/12 (8,3 %)	0/20 (0%)	0,375	--	--	0,05
	CC	11/12 (91,7%)	20/20 (100%)		--	--	

Tab. 16: p-Werte der im DLA-12A Bereich lokalisierten Polymorphismen zur Prüfung der Nullhypothese mit nur an IHA erkrankten Probanden; „--“ = alle Hunde wiesen dasselbe Allel auf: Berechnung von p-Wert (DLA-12A₄) und Odds Ratio nicht möglich.

Rassespezifität

DLA-12A zeigte eine deutliche Assoziation der Variablen „Polymorphismen im DLA-12A“ und „Rasse“. Aufgrund dessen war eine Berechnung für alle DLA-12A-Polymorphismen innerhalb der einzelnen Rassen notwendig. Dabei wurden zwischen den kranken und gesunden Hunden innerhalb einer Rasse keine unterschiedlichen Polymorphismen gefunden. Alle Polymorphismen waren innerhalb einer Rasse konstant, so dass eine statistische Berechnung nicht möglich war.

2.2.1.2. Haplotyp-Status DLA-12E

Insgesamt konnten 16 Polymorphismen im analysierten Sequenz-Abschnitt (1034bp) ermittelt werden. Dabei wurden im Exon 2 drei Polymorphismen im codierenden Bereich und zwei im flankierenden Intronbereich gefunden. Die Polymorphismen DLA-12E₁ bis DLA-12E₁₂ stimmen teils überein mit den Polymorphismen von 12A, da es sich um einen Sequenzabschnitt im überlappenden Bereich handelt. Eine Heterozygotie wurde in DLA-12E₁ (Y), DLA-12E₂ (R), DLA-12E₄ (K), DLA-12E₅ (R), DLA-12E₆ (K), DLA-12E₁₂ (S) festgestellt.

Untersuchte Sequenz 5'-3':

CCCAATACATTTTAAACCTCTTTTGTTCCTACTATGATAAATATTGAC/T₇AGATTAACCCACAGCC
 ACAATTTTCCTGGGATCCTCA/A/G₂TAATCTGTGAG/C₃ACG/T₄GTG/T₅TAGATGCCCTG/T₆GGGAA
 CAGAAT/G/A-TTCTAGACTCACTGCCTCACACAGCTCCCTGACCAGGACTCAGGGAGTCAGAGTGAC
 AAGAGCGCTGTGG/G/A,GCAAGGT/G/C₉TCAGGACCCCGGGCTGCCTCTCAGGCTCTCA/G/T₁₀GCCCCA
 GGGCGGGTCCGGGGCGGGGACGCTCA/G₁₁GGCT/C/G₁₂GGGAGTCCCCACCTCCCCGGGGATTTCACT
 TCTTCTCCCAACCTGGCTCTGGGCCCCCTGCCTGGAGACTCATGACGCAGCCCCAGCGCGCACTCC
 CATTGGGTGCAGCCTTTCTGGAGGAGCCAATCAGCGGCACCGGGTCCCGGGCTCTGAAGTCCACAC
 CAGAACC GCCAGGACGCAGCTGCTCCACCGACCCTAAAGGTCTGGGCTATGGTGCCCCGGAACCC
TAGCCCTGCTGCTGTCGGGGGCCCTGGCCGTGACCCTGACCCGGGCGGGTGAGTGCGGGCGG
 NAGCGAGGGGACCGGCGGNCGGGGACGCGGGACGGGAAGCCGCCTCTCCGNCGNCCCCGGNCCC
 TCCCGCCTCCGCCCCGNCCCCGGGNATCTCCCTGGGCCCCGGGCTCCGCCCCGCCCCGGGCATCT
 CCCCTGGGCCCCGGGCCCCGCGGGCGGGAGGGGGTTCGGGCGGGGTCTCACCC/A/G₁₃TCGGTCCGCA
 GGCTCCCACTCCCTGAGGTATTCTACACCTCCGTGTCCCGG/C/T₁₄CCGGCCGCGGGGACCCC
CGCTTCATCGCCGTCCGGCTACGTGGACGACACGCAGTTCGTGCGGTTTCGACAGCGACGCGG
CCACTGGGAGGATGGAGCCGCGGGCGC/A/C/G₁₅GTGG/G/C₁₆TGGAGCAGGAGGGGCCGGAGTAT
 TGGGACCCGCAGACGCGGACCATCAAGGAGACCGCACGGACTTCCGA

Es wurde eine Berechnung für alle DLA-12E Polymorphismen durchgeführt. Eine vermutete Assoziation der Variablen „Polymorphismus im DLA-12E“ und „Erkrankung“ wurde sowohl für den Intron- als auch für den Exonbereich durch den Test auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ abgelehnt (p-Werte s. Tab. 17).

Polymor phismus	SNP	Kranke Hunde	Gesunde Hunde	p-Wert (Fisher's exact Test)	Odds ratio	95% Konfidenzintervall	Niveau
1	TT	3/14 (21,4%)	1/18 (5,6%)	0,295	4,64	0,43 – 50,44	0,05
	CC	10/14 (71,4%)	15/18 (83,3%)	0,669	0,5	0,092 – 2,73	0,05
	TC	1/14 (7,1%)	2/18 (11,1%)	1,0	0,62	0,05 – 7,57	0,05
2	AA	10/14 (71,4%)	15/18 (83,3%)	0,669	0,5	0,092 – 2,73	0,05
	GG	3/14 (21,4%)	1/18 (5,6%)	0,295	4,64	0,43 – 50,44	0,05
	AG	1/14 (7,1%)	2/18 (11,1%)	1,0	0,62	0,05 – 7,57	0,05
3	CC	1/14 (7,1%)	0/18 (0%)	0,438	--	--	0,05
	GG	11/14 (78,6%)	15/18 (83,3%)	1,0	0,73	0,12 – 4,35	0,05
	CG	2/14 (14,3%)	3/18 (16,7%)	1,0	0,83	0,12 – 5,82	0,05
4	TT	1/14 (7,1%)	0/18(0%)	0,438	--	--	0,05
	GG	11/14 (78,6%)	15/18 (83,3%)	1,0	0,73	0,12 – 4,35	0,05
	T	2/14 (14,3%)	3/18 (16,6%)	1,0	0,83	0,12 – 5,82	0,05
5	AA	1/14 (7,1%)	0/18 (0%)	0,438	--	--	0,05

- Ergebnisse -

	GG	11/14 (78,6%)	15/18 (83,3%)	1,0	0,73	0,12 – 4,35	0,05
	GA	2/14 (14,3%)	3/18 (16,6%)	1,0	0,83	0,12 – 5,82	0,05
6	TT	11/14 (78,6 %)	15/18 (83,3%)	1,0	0,73	0,12 – 4,35	0,05
	GG	1/14 (7,1%)	0/18 (0%)	0,438	--	--	0,05
	TG	2/14 (14,3%)	3/18 (16,6%)	1,0	0,83	0,12 – 5,82	0,05
7	AA	1/14 (7,1%)	0/18 (0%)	0,437	--	--	0,05
	GG	13/14 (92,9%)	18/18 (100%)	--	--	--	--
8	GG	13/14 (92,9%)	16/18 (88,9%)	1,0	1,63	0,13 – 19,99	0,05
	GA	1/14 (7,1%)	2/18 (11,1%)	--	0,62	0,05 – 7,57	--
9	GG	14/14 (100%)	18/18 (100%)	--	--	--	--
10	TT	1/14 (7,1%)	0/18 (0%)	0,437	--	--	0,05
	GG	13/14 (92,9%)	18/18 (100%)	--	--	--	--
11	AA	13/14 (92,2%)	18/18 (100%)	0,437	--	--	0,05
	GG	1/14 (7,1%)	0/18 (0%)	--	--	--	--
12	CC	11/14 (78,6%)	14/18 (77,8%)	1,0	1,05	0,19 – 5,69	0,05
	GG	1/14 (7,1%)	1/18 (5,6%)	1,0	1,31	0,08 – 22,94	0,05
	CG	2/14 (14,3%)	3/18 (16,7%)	1,0	0,83	0,12 – 5,82	0,05
13	AA	7/14 (50%)	9/18 (50%)	1,0	1	0,25 – 4,04	0,05
	GG	6/14 (42,9%)	7/18 (38,9%)	1,0	1,18	0,29 – 4,88	0,05
	AG	1/14 (7,1%)	2/18 (11,1%)	1,0	0,62	0,05 – 7,569	0,05
14	TT	9/14 (64,3%)	12/18 (66,7%)	1,0	0,9	0,21 – 3,91	0,05
	CC	5/14 (35,7%)	4/18 (22,2%)	0,453	1,94	0,41 – 9,24	0,05
	TC	0/14 (0%)	2/18 (11,1%)	0,492	--	--	0,05
15	GG	10/14 (71,4%)	12/18 (66,7%)	1,0	1,25	0,274 – 5,705	0,05
	AA	1/14 (7,1%)	2/18 (11,1%)	1,0	0,62	0,05 – 7,57	0,05
	GA	2/14 (14,3%)	4/18 (22,2%)	0,672	0,58	0,09 – 3,76	0,05
	CC	1/14 (7,1%)	0/18 (0%)	0,438	--	--	0,05
16	GG	14/14 (100%)	18/18 (100%)	--	--	--	--

Tab. 17: p-Werte der im DLA-12E Bereich lokalisierten Polymorphismen zur Prüfung der Nullhypothese; „--“ = alle Hunde wiesen dasselbe Allel auf, daher Berechnung der p-Werte (DLA-12E₉ und DLA-12E₁₆) und der Odds Ratio nicht möglich.

Ebenfalls wurde eine Berechnung der DLA-12E Polymorphismen für die nur an IHA erkrankten Hunde durchgeführt. Auch hier wurde eine vermutete Assoziation der Variablen auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ abgelehnt (p-Werte s. Tab. 18).

<i>Polymorphismus</i>	<i>SNP</i>	<i>Kranke Hunde</i>	<i>Gesunde Hunde</i>	<i>p-Wert (Fisher's exact Test)</i>	<i>Odds ratio</i>	<i>95% Konfidenzintervall</i>	<i>Niveau</i>
1	TT	3/12 (25%)	1/20 (5%)	0,136	0,63	0,58 – 69,69	0,05
	CC	8/12 (66,7%)	17/20 (85%)	0,379	0,35	0,06 -1,97	0,05
	TC	1/12 (8,3%)	2/20 (10%)	1,0	0,83	0,07 – 10,66	0,05
2	AA	8/12 (66,7%)	17/20 (85%)	0,379	0,35	0,06 – 1,97	0,05
	GG	3/12 (25%)	1/20 (5%)	0,136	0,63	0,58 – 69,69	0,05
	AG	1/12 (8,3 %)	2/20 (10%)	1,0	0,83	0,07 – 10,66	0,05
3	CC	1/12 (8,3%)	0/20 (0%)	0,375	--	--	0,05
	GG	9/12 (75%)	17/20 (85%)	0,647	0,53	0,09 – 3,18	0,05
	CG	2/12 (16,7%)	3/20 (15%)	1,0	1,13	0,16 – 7,98	0,05
4	TT	1/12 (8,3%)	0/20 (0%)	0,375	--	--	0,05
	GG	9/12 (75%)	17/20 (85%)	0,647	0,53	0,09 – 3,18	0,05
	T	2/12 (16,7%)	3/20 (15%)	1,0	1,13	0,16 – 7,98	0,05
5	AA	1/12 (8,3%)	0/20 (0%)	0,375	--	--	0,05
	GG	9/12 (75%)	17/20 (85%)	0,647	0,53	0,09 – 3,18	0,05
	GA	2/12 (16,7%)	3/20 (15%)	1,0	1,13	0,16 – 7,98	0,05
6	TT	9/12 (75%)	17/20 (85%)	0,647	0,53	0,09 – 3,18	0,05

	GG	1/12 (8,3%)	0/20 (0%)	0,375	--	--	0,05
	TG	2/12 (16,7%)	3/20 (15%)	1,0	1,13	0,16 – 7,98	0,05
7	AA	1/12 (8,3%)	0/20 (0%)	0,375	--	--	0,05
	GG	11/12 (91,7%)	20/20 (100%)	--	--	--	--
8	GG	11/12 (91,7%)	18/20 (90%)	1,0	1,22	0,1 – 15,11	0,05
	GA	1/12 (8,3%)	2/20 (10%)	--	0,82	0,07 – 10,12	0,05
9	GG	12/12 (100%)	20/20 (100%)	--	--	--	--
10	TT	1/12 (8,3%)	0/20 (0%)	0,375	--	--	0,05
	GG	11/12 (91,7%)	20/20 (100%)	--	--	--	--
11	AA	11/12 (91,7%)	20/20 (100%)	0,375	--	--	0,05
	GG	1/12 (8,3%)	0/20 (0%)	--	--	--	--
12	CC	9/12 (75%)	16/20 (80%)	1,0	0,75	0,14 – 4,13	0,05
	GG	1/12 (8,3%)	1/20 (5%)	1,0	1,727	0,1 – 30,45	0,05
	CG	2/12 (16,7%)	3/20 (15%)	1,0	1,133	0,16 – 7,98	0,05
13	AA	6/12 (50%)	10/20 (50%)	1,0	1	0,24 – 4,19	0,05
	GG	5/12 (41,7%)	8/20 (40%)	1,0	1,071	0,25 – 4,59	0,05
	AG	1/12 (8,3%)	2/20 (10%)	1,0	0,818	0,07 – 10,12	0,05
14	TT	8/12 (66,7%)	13/20 (65%)	1,0	1,077	0,24 – 4,88	0,05
	CC	4/12 (33,3%)	5/20 (25%)	0,696	1,5	0,31 – 7,21	0,05
	TC	0/12 (0%)	2/20 (10%)	0,516	--	--	0,05
15	GG	9/12 (75%)	13/20 (65%)	0,703	1,615	0,33 – 7,98	0,05
	AA	1/12 (8,3%)	2/20 (10%)	1,0	0,818	0,07 – 10,12	0,05
	GA	1/12 (8,3%)	5/20 (25%)	0,37	0,273	0,03 – 2,68	0,05
	CC	1/12 (8,3%)	0/20 (0%)	0,375	--	--	0,05
16	GG	12/12 (100%)	20/20 (100%)	--	--	--	--

Tab. 18: p-Werte der im DLA-12E Bereich lokalisierten Polymorphismen zur Prüfung der Nullhypothese mit nur an IHA erkrankten Probanden; „--“ = alle Hunde wiesen dasselbe Allel auf: Berechnung der p-Werte (DLA-12E₉ und DLA-12E₁₆) und Odds Ratio nicht möglich.

Rassespezifität

DLA-12E zeigte – außer DLA-12E₈ – eine deutliche Assoziation der Variablen „Polymorphismen im DLA-12E“ und „Rasse“. Aufgrund dessen war eine Berechnung für alle DLA-12E-Polymorphismen innerhalb der einzelnen Rassen notwendig. Dabei wurden zwischen den kranken und gesunden Hunden innerhalb einer Rasse keine unterschiedlichen Polymorphismen gefunden. Eine Assoziation von „Erkrankung“ und „DLA-12E-Polymorphismen“ unter Berücksichtigung der Rasse musste abgelehnt werden.

2.2.1.3. Haplotyp-Status DLA-12F

In dem untersuchten 860bp Fragment konnten zwei Polymorphismen im codierenden Bereich dargestellt werden. Die übrigen 3 Polymorphismen waren im flankierenden Intronbereich lokalisiert. Von den aufgezeigten Polymorphismen waren DLA-12F₁ (S), DLA-12F₂ (S), DLA-12F₄ (S) heterozygot.

Untersuchte Sequenz 5'-3':

```
GCCCTGCTGCTGTCGGGGCCCTGGCCGTGACCCTGACCCGGGCGGGTGAGTGCGGGCGGGAGCG
AGGGGACCGGCGGGCGGGGACGCGGGACCCCGGAAGCCGCCTCTCCGCCCTCCCGCCTCCGCC
CGCCCCGGGCATCTCCCTGGGCCCGGGCCCCGCGGGCGGGAGGGGGTTCGGGGCGGGGTCTCA/C1/G1
CC/G2/C2/TCGGCTCCGCAGGCTCCCACTCCCTGAGGTATTTCTACACCTCCGTGTCCCGGCCCGG
CCGCGGGGACCCCGCTTCATCGCCGTGCGGTACGTGGACGACACGCAGTTCGTGCGGGTTC
GACAGCGACGCGGCCACTGGGAGGATGGAGCCGCGGGCGCCGTGG/G3/A3/TGGAGCAGGAGG
GGCCGGAGTATTGGGACC/C4/G4/GCAGACGCGGACCATCAAGGAGACCGCACGGACTTCCGA
GTGGACCTGGACACCCTGCGCGGCTACTACAACCAGAGCGAGGCCGGTGAGCGGGCGGGGCC
CGGGGCCGGGGCAGACCCCATCCCCGACCGGCCGGGTCGCCCCGAGGGTCCGGGTCCGGGC
GTCACCGAGTCCGAGGCCCCCCACCCTAAACGGGTCTCAGAGCCAGGAAGAGGCCGTGCGCCCT
```

TTCGAGCGGTTTTCTTTTCGGTTTGAACCTTAGAAGTCTTGCGGTCCCGGGACTACTA/C/G₅GGGTGTT
CACCGCGGGGCGGGGCCTCGGGGCCTCGGGGCGGAGCTGACCGCGGGGGCGGGGCCAGGTCTCAC
AC

Es wurde eine Berechnung für alle DLA-12F Polymorphismen durchgeführt. Eine vermutete Assoziation der Variablen „Polymorphismus im DLA-12F“ und „Erkrankung“ wurde sowohl für den Intron- als auch für den Exonbereich durch den Test auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ abgelehnt (p-Werte s. Tab. 19).

<i>Polymor phismus</i>	<i>SNP</i>	<i>Kranke Hunde</i>	<i>Gesunde Hunde</i>	<i>p-Wert (Fisher's exact Test)</i>	<i>Odds ratio</i>	<i>95% Konfidenzintervall</i>	<i>Niveau</i>
1	CC	11/14 (78,6%)	15/18 (83,3%)	1,0	0,73	0,12 – 4,35	0,05
	GG	0/14 (0%)	1/18 (5,6%)	1,0	--	--	0,05
	CG	3/14 (21,4%)	2/18 (11%)	0,631	2,18	0,31 – 15,3	0,05
2	GG	10/14 (71,4%)	17/18 (94,4%)	0,142	0,15	0,01 – 1,51	0,05
	CG	4/14 (28,6%)	1/18 (5,6%)		6,8	0,66 – 69,64	
3	GG	13/14 (92,9%)	17/18 (94,4%)	1,0	0,77	0,04 – 13,41	0,05
	AA	1/14 (7,1%)	1/18 (5,6%)		1,31	0,08 – 22,94	
4	CC	13/14 (92,9%)	17/18 (94,4%)	1,0	0,76	0,04 – 13,41	0,05
	GG	0/14 (0%)	1/18 (5,6%)	1,0	--	--	0,05
	CG	1/14 (7,1%)	0/18 (0%)	0,438	--	--	0,05
5	AA	5/14 (35,7%)	10/18 (55,6%)	0,308	0,44	0,11 – 1,87	0,05
	CC	7/14 (0,5%)	8/18 (44,4%)	1,0	1,25	0,31 – 5,07	0,05
	GG	2/14 (14,3%)	0/18 (0%)	0,183	--	--	0,05

Tab. 19: p-Werte der im DLA-12F Bereich lokalisierten Polymorphismen zur Prüfung der Nullhypothese; „--“ = alle Hunde wiesen dasselbe Allel auf: Berechnung von Odds Ratio nicht möglich.

Zusätzlich wurde eine Berechnung der DLA-12F Polymorphismen unter der Voraussetzung durchgeführt, dass nur die an IHA erkrankten Hunde als „krank“ definiert werden. Auch hier wurde eine vermutete Assoziation der Variablen auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ abgelehnt (p-Werte s. Tab. 20).

<i>Polymor phismus</i>	<i>SNP</i>	<i>Kranke Hunde</i>	<i>Gesunde Hunde</i>	<i>p-Wert (Fisher's exact Test)</i>	<i>Odds ratio</i>	<i>95% Konfidenzintervall</i>	<i>Niveau</i>
1	CC	10/12 (83,3%)	16/20 (80%)	1,0	1,25	0,19 – 8,13	0,05
	GG	0/12 (0%)	1/20 (5%)	1,0	--	--	0,05
	CG	2/12 (16,7%)	3/20 (15%)	1,0	1,13	0,16 – 7,98	0,05
2	GG	9/12 (75%)	18/20 (90%)	0,338	0,33	0,05 – 2,37	0,05
	CG	3/12 (25%)	2/20 (10%)		3	0,42 – 21,3	
3	GG	11/12 (91,7%)	19/20 (95%)	1,0	0,58	0,03 – 10,21	0,05
	AA	1/12 (8,3%)	1/20 (5%)		1,73	0,1 – 30,45	
4	CC	11/12 (91,7%)	19/20 (95%)	1,0	0,58	0,03 – 10,21	0,05
	GG	0/12 (0%)	1/20 (5%)	1,0	--	--	0,05
	CG	1/12 (8,3%)	0/20 (0%)	0,375	--	--	0,05
5	AA	4/12 (33,3%)	11/20 (55%)	0,291	0,41	0,09 – 1,81	0,05
	CC	6/12 (50%)	9/20 (45%)	1,0	1,22	0,29 – 5,13	0,05
	GG	2/12 (16,7%)	0/20 (0%)	0,133	--	--	0,05

Tab. 20: p-Werte der im DLA-12F Bereich lokalisierten Polymorphismen zur Prüfung der Nullhypothese mit nur an IHA erkrankten Probanden; „--“ = alle Hunde wiesen dasselbe Allel auf: Berechnung von Odds Ratio nicht möglich.

Rassespezifität

DLA-12F zeigte – außer am DLA-12F₁ und DLA-12F₂ – eine deutliche Assoziation der Variablen „Polymorphismen im DLA-12F“ und „Rasse“. Aufgrund dessen war eine Berechnung für diese DLA-12F-Polymorphismen innerhalb der einzelnen Rassen notwendig. Dabei wurden zwischen den kranken und gesunden Hunden innerhalb einer Rasse keine unterschiedlichen Polymorphismen gefunden. Alle Polymorphismen waren innerhalb einer Rasse konstant, so dass eine statistische Berechnung nicht möglich war.

2.2.1.4. Haplotyp-Status 12I

Es konnten 2 Polymorphismen im 837bp großem Bereich ermittelt werden, die sich jedoch nicht im codieren Bereich befanden. Beide polymorphen Stellen wiesen eine Heterozygotie auf: DLA-12I₁ (K) und DLA-12I₂ (Y).

Untersuchte Sequenz 5'-3':

GTGCACATGAGGGGCTGGCGGACCTGTCACG/T₁CGGAGATGGGGTAAGGAGGGCCTCGGGGTAGA
GCTTCTACTCAGGGCAAGTGGAGCTCTTCTGGAGAATTTTCAGCAGAGTCAGGTCTCAAGC/T₂CAGA
GGCTGGACCCTCATCTCCCTCCCCTTTCCAGAGCCTTCCCCTCTGTCCACCATTGTCATCGTCA
GCATTGCTGCTCTGGTTCTCCTCGTGGTTCGCTGGGGGTGATTGGAGCTGTGATCTGGAGGAA
GCAGCGCTCGGGTAGGGAACCGACTGAATACTCTGTGTTTTCTGTCTGCTGGGGGGTTTCNTAG
GAAGNANGCTG

Es wurde eine Berechnung für alle DLA-12I Polymorphismen durchgeführt. Eine vermutete Assoziation beider Variablen „Polymorphismus im DLA-12I“ und „Erkrankung“ wurde durch den Test auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ abgelehnt (p-Werte s. Tab. 21).

Polymorphismus	SNP	Kranke Hunde	Gesunde Hunde	p-Wert (Fisher's exact Test)	Odds ratio	95% Konfidenzintervall	Niveau
1	GG	2/14 (14,3%)	0/18 (0%)	0,183	--	--	0,05
	TG	12/14 (85,7%)	18/18 (100%)		--	--	
2	CC	9/14 (64,3%)	16/18 (88,9%)	0,195	0,23	0,04 – 1,41	0,05
	TC	5/14 (35,7%)	2/18 (11,1%)		4,44	0,71 – 27,76	

Tab. 21: p-Werte der im DLA-12I Bereich lokalisierten Polymorphismen zur Prüfung der Nullhypothese; „--“ = alle Hunde wiesen dasselbe Allel auf; Berechnung von Odds Ratio nicht möglich.

Zusätzlich wurde eine Berechnung der DLA-12I Polymorphismen für die nur an IHA erkrankten Hunde durchgeführt. Eine vermutete Assoziation beider Variablen „Polymorphismus im DLA-12I“ und „Erkrankung“ wurde durch den Test auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ abgelehnt (p-Werte s. Tab. 22).

Polymorphismus	SNP	Kranke Hunde	Gesunde Hunde	p-Wert (Fisher's exact Test)	Odds ratio	95% Konfidenzintervall	Niveau
1	GG	2/12 (16,7%)	0/20 (0%)	0,133	--	--	0,05
	TG	10/12 (83,3%)	20/20 (100%)		--	--	
2	CC	7/12 (58,3%)	18/20 (90%)	0,073	0,156	0,024 -0,997	0,05
	TC	5/12 (41,7%)	2/20 (10%)		6,43	1,003 – 41,204	

Tab. 22: p-Werte der im DLA-12F Bereich lokalisierten Polymorphismen zur Prüfung der Nullhypothese mit nur an IHA erkrankten Probanden; „--“ = alle Hunde wiesen dasselbe Allel auf; Berechnung von Odds Ratio nicht möglich.

Rassespezifität

DLA-12I zeigte eine deutliche Assoziation der Variablen „Polymorphismen im DLA-12I“ und „Rasse“. Aufgrund dessen war eine Berechnung für diese DLA-12I-Polymorphismen

innerhalb der einzelnen Rassen notwendig. Dabei wurden zwischen den kranken und gesunden Hunden innerhalb einer Rasse keine unterschiedlichen Polymorphismen gefunden. Eine Assoziation zwischen einem Allel und der Erkrankung unter Berücksichtigung der Rasse konnte nicht dargestellt werden.

2.2.1.5. Haplotyp-Status 12K

Insgesamt wurden 5 Polymorphismen in dem 535bp umfassenden PCR-Produkt gefunden. Ein Polymorphismus befand sich im Exon 7 und 4 Polymorphismen im flankierenden Intronbereich. Alle Polymorphismen waren heterozygot: DLA-12K₁ (Y), DLA-12K₂ (Y,S), DLA-12K₃ (Y), DLA-12K₄ (Y) und DLA-12K₅ (Y).

Untersuchte Sequenz 5'-3':

GCTTCACCCCCACAGCTGCTCCTTTAGTCTCACCTCCTGTGAGCTCTGACCACGTCCTGTTTATTCT
 CCTCTAGGTCG₂GATGACAGTGCCCAGGGCTCTGATGTGTCTCTGACAGCTCCTAGAGGTGAG
 ACCCCAGAGACCTC₃TGAAGTGGGGAGGGTTGGGGCC₄TTGGGGACCTGATGAGTC₃GCGAGGGG
 GACTGTTGAGAATGTCAGCACTTATGTGACTGACCTCAGTTTGTACTTGATTGTTTTTCAGTGTGAG
 ACCAGCTGCCTGTGGGACTGAGCGATGCAAGATGTGTTACATCTCACGTGATGACATCAACAACC
 CTGGCTTGTCTCTGCAAACAGTGTGAGGATGTGCCTGTGTCCCTAGGAGCATAATGTGAGGAGGTG
 GGGAGATTGGCCACCCTGCCACCATGACCTGTCCC

Eine vermutete Assoziation der Variablen „DLA-12K₁“, „DLA-12K₂“, „DLA-12K₃“ sowie „DLA-12K₄“ und „Erkrankung“ wurde sowohl für den Intron- als auch für den Exonbereich durch den Test auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ abgelehnt (p-Werte s. Tab. 23). Das Allel TT des DLA-12K₅ hingegen zeigte eine signifikante Assoziation ($p = 0,024$) mit den gesunden Hunde: Keiner der kranken Hunde trug das Allel TT.

Polymorphismus	SNP	Kranke Hunde	Gesunde Hunde	p-Wert (Fisher's exact Test)	Odds ratio	95% Konfidenzintervall	Niveau
1	TT	3/14 (21,4%)	0/18 (0%)	0,073	--	--	0,05
	CC	10/14 (71,4%)	15/18 (83,3%)	0,669	0,5	0,09 – 2,73	0,05
	TC	1/14 (7,1%)	3/18 (16,7%)	0,613	0,39	0,04 – 4,16	0,05
2	CC	7/14 (50%)	6/18 (33,3%)	0,473	2	0,48 – 8,4	0,05
	TT	5/14 (35,7)	7/18 (38,9%)	1,0	0,87	0,21 – 3,71	0,05
	TC	0/14 (0%)	1/18 (5,6%)	1,0	--	--	0,05
	CG	2/14 (14,3%)	2/18 (11,1%)	1,0	1,33	0,16 – 10,87	0,05
	TG	0/14 (0%)	2/18 (11,1%)	0,492	--	--	0,05
3	CC	7/14 (50%)	6/18 (33,3%)	0,473	2	0,48 – 8,4	0,05
	CT	5/14 (35,7%)	8/18 (44,4%)	0,725	0,69	0,17 – 2,92	0,05
	CG	2/14 (14,3%)	2/18 (11,1%)	1,0	1,33	0,16 – 10,87	0,05
	TG	0/14 (0%)	2/18 (11,1%)	0,492	--	--	0,05
4	CC	7/14 (50%)	8/18 (44,4%)	1,0	1,25	0,31 – 5,07	0,05
	TT	2/14 (14,3%)	0/18 (0%)	0,183	--	--	0,05
	CT	5/14 (35,7%)	10/18 (55,6%)	0,308	0,571	0,13 – 2,5	0,05
5	CC	7/14 (50%)	6/18 (33,3%)	0,473	2	0,48 – 8,4	0,05
	TT	0/14 (0%)	6/18 (33,3%)	0,024	--	--	0,05
	CT	7/14 (50%)	6/18 (33,3%)	0,473	2	0,48 – 8,4	0,05

Tab. 23: p-Werte der im DLA-12K Bereich lokalisierten Polymorphismen zur Prüfung der Nullhypothese; „--“ = alle Hunde wiesen dasselbe Allel auf: Berechnung von Odds Ratio nicht möglich.

Außerdem wurde eine Berechnung der DLA-12K Polymorphismen unter der Voraussetzung durchgeführt, dass nur die an IHA erkrankten Hunde als „krank“ definiert wurden. Dabei zeigte das Allel TT bei DLA-12K₁ eine signifikante Assoziation mit der Erkrankung an IHA: Nur kranke Hunde trugen das Allel TT ($p = 0,044$).

Für alle anderen Polymorphismen wurde eine vermutete Assoziation mit der IHA auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ abgelehnt (p-Werte s. Tab. 24).

<i>Polymorphismus</i>	<i>SNP</i>	<i>Kranke Hunde</i>	<i>Gesunde Hunde</i>	<i>p-Wert (Fisher's exact Test)</i>	<i>Odds ratio</i>	<i>95% Konfidenzintervall</i>	<i>Niveau</i>
1	TT	3/12 (25%)	0/20 (0%)	0,044	--	--	0,05
	CC	8/12 (66,7%)	17/20 (85%)	0,379	0,35	0,06 – 1,97	0,05
	TC	1/12 (8,3%)	3/20 (15%)	1,0	0,52	0,05 – 5,61	0,05
2	CC	6/12 (50%)	7/20 (35%)	0,473	1,86	0,43 – 7,98	0,05
	TT	4/12 (33,3%)	8/20 (40%)	1,0	0,75	0,17 – 3,35	0,05
	TC	0/12 (0%)	1/20 (5%)	1,0	--	--	0,05
	CG	2/12 (16,7%)	2/20 (10%)	0,62	1,8	0,22 – 14,8	0,05
	TG	0/12 (0%)	2/20 (10%)	0,516	--	--	0,05
3	CC	6/12 (50%)	7/20 (35%)	0,473	1,86	0,43 – 7,98	0,05
	CT	4/12 (33,3%)	9/20 (45%)	0,713	0,61	0,14 – 2,71	0,05
	CG	2/12 (16,7%)	2/20 (10%)	0,62	1,8	0,22 – 14,8	0,05
	TG	0/12 (0%)	2/20 (10%)	0,516	--	--	0,05
4	CC	7/12 (58,3%)	8/20 (40%)	0,467	2,1	0,49 – 8,99	0,05
	TT	1/12 (8,3%)	1/20 (5%)	1,0	1,73	0,1 – 30,45	0,05
	CT	4/12 (33,3%)	11/20 (55%)	0,291	0,41	0,09 – 1,81	0,05
5	CC	7/12 (58,3%)	6/20 (30%)	0,15	3,27	0,73 – 14,55	0,05
	TT	0/12 (0%)	6/20 (30%)	0,06	--	--	0,05
	CT	5/12 (41,7%)	8/20 (40%)	1,0	1,07	0,25 – 4,59	0,05

Tab. 24: p-Werte der im DLA-12K Bereich lokalisierten Polymorphismen zur Prüfung der Nullhypothese mit nur an IHA erkrankten Probanden; „--“ = alle Hunde wiesen dasselbe Allel auf: Berechnung von Odds Ratio nicht möglich.

Rassespezifität

DLA-12K – ausser DLA-12K₅ – zeigte eine deutliche Assoziation aller Polymorphismen mit der Rasse. Aufgrund dessen war eine Berechnung für diese DLA-12K-Polymorphismen innerhalb der einzelnen Rassen notwendig. Dabei wurden bei DLA-12K₁₋₃ keine Assoziationen von Allelen zur Erkrankung festgestellt. Für DLA-12K₄ jedoch wurden folgende Ergebnisse vorgefunden: Beim Irish Red Setter war bei den kranken Hunden das Allel CC signifikant häufiger vorzufinden als bei den gesunden Hunden (p = 0,01). Diese Tatsache konnte nicht für den Cocker Spaniel bestätigt werden, die anderen Rassen konnten nicht beurteilt werden, da es keine Kontrollhunde der selben Rasse gab (Tab. 25).

<i>DLA-12K₄</i>	<i>SNP</i>	<i>Kranke Hunde</i>	<i>Gesunde Hunde</i>	<i>p-Wert (Fisher's exact Test)</i>	<i>Odds ratio</i>	<i>95% Konfidenzintervall</i>	<i>Niveau</i>
Cocker Spaniel	CC	0/5 (0%)	4/7 (57,1%)	0,08	--	--	0,05
	TT	1/5 (20%)	0/7 (0%)	0,417	--	--	
	CT	4/5 (80%)	3/7 (42,9%)	0,293	--	--	
Irish Setter	CC	4/5 (80%)	0/7 (100%)	0,01	--	--	0,05
	CT	1/5 (20%)	7/7 (100%)		--	--	
Dobermann	TT	1/1 (100%)	--	--	--	--	--
Staffordshire	CC	1/1 (100%)	--	--	--	--	--
Shih Tzu	CC	1/1 (100%)	--	--	--	--	--
Dogo Canario	CC	1/1 (100%)	--	--	--	--	--
Rhodesian Ridgeback	CC	--	4/4 (100%)	--	--	--	--

Tab. 25: DLA-12K₄: Assoziationen zwischen Allel und Erkrankung unter Berücksichtigung der Rasse; „--“ = alle Hunde wiesen dasselbe Allel auf: Berechnung von Odds Ratio nicht möglich.

2.2.2. MHC-I: DLA-64

Beim DLA-64 handelt es sich genauso wie beim DLA-12 um ein MHC-I Gen, welches sich auf dem Chromosom 12 befindet. Es wurde ebenfalls erstmalig 1997 von Burnett et al. beschrieben. In vorliegender Studie wurden 6 Primerpaare etabliert, um einen Bereich von ca. 3400 bp des Gens zu analysieren. Die Lokalisation der untersuchten Bereiche sind in Abb. 6 graphisch aufgeführt.

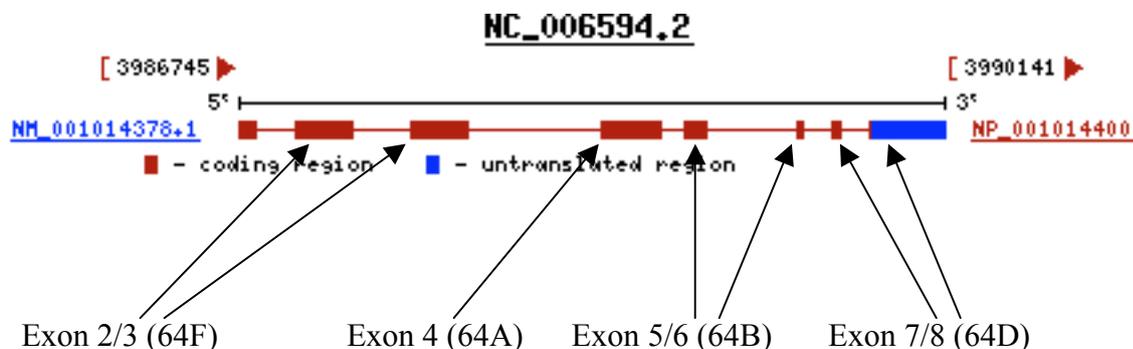


Abb. 6: Graphische Darstellung von DLA-64 mit korrespondierenden Loci. Benennung der Loci s. Tab. 14

2.2.2.1. Haplotyp-Status DLA-64A

In dem 1021bp großen Fragment wurden keine auffälligen SNP's festgestellt. Allerdings wiesen alle sequenzierten Proben in vorliegender Studie eine Insertion von ca. 100bp auf (rosa unterlegt, kursiv).

Untersuchte Sequenz 5'-3':

```
GGGTCTGTGGGCGAGCTGGGACTCCGGGATCTCCCCTCCCCTGGGGCTGTACCTCCTGCTATCCCT
ACAAAAAGGAAAATGGAATTGACACCAGAATTCCTCCCCTGCCCACTTCTTGGATCCTGAAAGTGA
AGACTTCTTGTTTTTCAGTTCTGTACTAAAGAGAGACTTGCTCAGAAAACCCATCTTCTCTCTGGACATT
TAAGGGATCCAGTCTTTATGGAGAGGGATAGAGATATCTCTGAAATAATTTAATAGCAGATTTCTTT
GACCCTGGCATTACCTTGGGCACCACTGACTGACTTCCTCCCCTCAGGCCTTGCTCCCTGTCCCACA
CCCCACTTAATTGGAGGTCTGCCTCCAGTTTTAAGAGGCACTGGACTTCCTCTACCTAGGTCAGG
ACCAGAAGTCTCTGTTGTCCCACTCAGAGACCTGGAACCTTCTACCTTAGGCTATCTTATCCTGATT
CTAGATCTTCCAAAGGGATAGGAAGGTATCCAGATCCTGGAGTTCAGGCTGGNGNCTGNATTTTG
CACTCCCTCTCCCCATTTGTCTCTTCATTCTCA
```

2.2.2.2. Haplotyp-Status DLA-64B

Insgesamt wurden 3 Polymorphismen in dem 860bp umfassenden Fragment entdeckt. Ein Polymorphismus befand sich im Exon 4. Heterozygote Positionen waren an allen polymorphen Stellen vorhanden: DLA-64B₁ (K), DLA-64B₂ (W) und DLA-64B₃ (Y).

Untersuchte Sequenz 5'-3':

```
GTGCACATGAGGGGCTGGCGGAGCCTGTCACG/TCGGAGATGGGGTAAGGAGGGCCTCGGGGT
AGAGCTTCTACTCAGGGCAAGTGGAGCTTCTTGAGAATTCAGCAGAGTCAGGT/ACTCAAG
CT3CAGAGG
```

Es wurde eine Berechnung für alle DLA-64B Polymorphismen durchgeführt. Eine vermutete Assoziation der Variablen „DLA-64B₁, DLA-64B₂ sowie DLA-64B₃“ und „Erkrankung“ wurde sowohl für den Intron- als auch für den Exonbereich durch den Test auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ abgelehnt (p-Werte s. Tab. 26).

<i>Polymorphismus</i>	<i>SNP</i>	<i>Kranke Hunde</i>	<i>Gesunde Hunde</i>	<i>p-Wert (Fisher's exact Test)</i>	<i>Odds ratio</i>	<i>95% Konfidenzintervall</i>	<i>Niveau</i>
1	GT	13/14 (92,9%)	18/18 (100%)	0,438	--	--	0,05
	GG	1/14 (7,1%)	0/18 (0%)		--	--	
2	AA	1/14 (7,1%)	0/18 (0%)	0,438	--	--	0,05
	TT	5/14 (35,7)	9/18 (50%)	0,49	0,56	0,13 – 2,33	0,05
	AT	8/14 (57,1%)	9/18 (50%)	0,735	1,33	0,33 – 5,43	0,05
3	CC	9/14 (64,3%)	12/18 (66,7%)	1,0	0,9	0,21 – 3,9	0,05
	TC	5/14 (35,7%)	6/18 (33,3%)		1,11	0,26 – 4,82	

Tab. 26: p-Werte der im DLA-64B Bereich lokalisierten Polymorphismen zur Prüfung der Nullhypothese; „--“ = alle Hunde wiesen dasselbe Allel auf: Berechnung von Odds Ratio nicht möglich.

Zusätzlich wurde eine Berechnung der DLA-64B Polymorphismen für die nur an IHA erkrankten Hunde durchgeführt. Auch hier wurde eine vermutete Assoziation der Variablen auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ abgelehnt (p-Werte s. Tab. 27).

<i>Polymorphismus</i>	<i>SNP</i>	<i>Kranke Hunde</i>	<i>Gesunde Hunde</i>	<i>p-Wert (Fisher's exact Test)</i>	<i>Odds ratio</i>	<i>95% Konfidenzintervall</i>	<i>Niveau</i>
1	GT	11/12 (91,7%)	20/20 (100%)	0,375	--	--	0,05
	GG	1/12 (8,3%)	0/20 (0%)		--	--	
2	AA	1/12 (8,3%)	0/20 (0%)	0,375	--	--	0,05
	TT	5/12 (41,7%)	9/20 (45%)	1,0	0,87	0,21 – 3,71	0,05
	AT	6/12 (50%)	11/20 (55%)	1,0	0,82	0,2 – 3,43	0,05
3	CC	9/14 (64,3%)	12/18 (66,7%)	1,0	1,077	0,24 – 4,88	0,05
	TC	5/14 (35,7%)	6/18 (33,3%)		0,93	0,21 – 4,21	

Tab. 27: p-Werte der im DLA-64B Bereich lokalisierten Polymorphismen zur Prüfung der Nullhypothese mit nur an IHA erkrankten Probanden; „--“ = alle Hunde wiesen dasselbe Allel auf: Berechnung von Odds Ratio nicht möglich.

Rassespezifität

DLA-64B – ausser DLA-64B₃ – zeigte eine deutliche Assoziation aller Polymorphismen mit der Rasse. Aufgrund dessen war eine Berechnung für diese DLA-64B-Polymorphismen innerhalb der einzelnen Rassen notwendig. Dabei wurden zwischen den kranken und gesunden Hunden innerhalb einer Rasse keine Unterschiede gefunden. DLA-64B₁ war innerhalb der Rassen konstant. Für alle anderen Polymorphismen musste die vermutete Assoziation verworfen werden ($\alpha = 0,05$).

2.2.2.3. Haplotyp-Status DLA-64D

Dieser 616bp große Locus umfasste 11 Polymorphismen und 1 Deletion. Davon befand sich im Exon 7 ein Polymorphismus und 7 Polymorphismen im Exon 8. Die Deletion erstreckte sich bei allen untersuchten Tieren über eine Länge von 10 bp (DLA-64D₅). Heterozygotie war an allen Stellen vorhanden: DLA-64D₁ (R), DLA-64D₂ (Y), DLA-64D₃ (R), DLA-64D₄ (R), DLA-64D₆ (Y), DLA-64D₇ (S), DLA-64D₈ (S), DLA-64D₉ (S), DLA-64D₁₀ (W), DLA-64D₁₁ (Y) und DLA-64D₁₂ (M).

Untersuchte Sequenz 5'-3':

TTATTCTCCTNTAGGCGATGACAGTGCCAGGGCTNTGATGTGTCTCTGACG/A₁GCTCCTAGAGGTGAGACCCCAGAGACCCTGAAGTGGGGAGGGTTGGGGCACTGGGGACC/T₂A/G₃GATGAGCG/A₄CGAGGGGGCTGTTGAGAATGTCAGCACTTATGTGACCGACCTCACAGTACCGA₅CAATTTGACTTGTATTTTTCTCACAGTGTGAGACCAGCTGCCCTGTGGGGACTGAGCGATGCAAGATGTGTTCCATCTCACGTGATGACATCAACAACCCTGGCTTGTCTCTGCAAACAGTGTGAGGATGTGCCCTGTGCCCTAGGAGCATAATGTGAGGAGGTGGGGAGATTGGCCACCCTGCCACCATGACCTG

TCCCTAATCTGATGTGCGCTCTC**T/C₆**TCTCTGATGTGCTTTCTGTCCAG**C/G₇**AGAGG**C/G₈**AG
GGCTGGACCATCTCCATCCCTGTCTTTGTTTCATGTTGAGTACTAAT**C/G₉A/T₁₀**CTTACTA**C/T₁₁**
CCGATTGAAAATAAGAATCC**A/C₁₂**GATATGAGTTTGTGTTTCTGTAGTCTTGGGATGTGGGGC
TGATGAGGAATAAAAGGAGATTGGAAGT

Es wurde eine Berechnung für alle DLA-64D Polymorphismen durchgeführt. Eine vermutete Assoziation der „Polymorphismen im DLA-64D“ und „Erkrankung“ wurde sowohl für den Intron- als auch Exonbereich durch den Test auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ abgelehnt (p-Werte s. Tab. 28). Die Deletion wurde nicht berechnet, da sie bei allen Hunden vorhanden war.

<i>Polymor- phismus</i>	<i>SNP</i>	<i>Kranke Hunde</i>	<i>Gesunde Hunde</i>	<i>p-Wert (Fisher's exact Test)</i>	<i>Odds ratio</i>	<i>95% Konfidenzintervall</i>	<i>Niveau</i>
1	AA	13/14 (92,9%)	17/18 (94,4%)	1,0	0,76	0,04 – 13,41	0,05
	AG	1/14 (7,1%)	1/18 (5,6%)		1,31	0,08 – 22,94	
2	CC	13/14 (92,9%)	17/18 (94,4%)	1,0	0,76	0,04 – 13,41	0,05
	TC	1/14 (7,1%)	1/18 (5,6%)		1,31	0,08 – 22,94	
3	AA	1/14 (7,1%)	0/18 (0%)	0,438	--	--	0,05
	GG	1/14 (7,1%)	1/18 (5,6%)	1,0	1,31	0,08 – 22,94	0,05
	AG	12/14 (85,7%)	17/18 (94,4%)	0,568	0,35	0,03 – 4,35	0,05
4	GG	13/14 (92,9%)	18/18 (100%)	0,437	--	--	0,05
	AG	1/14 (7,1%)	0/18 (0%)		--	--	
6	TT	3/14 (21,4%)	2/18 (11,1%)	0,425	2,18	0,31 – 15,29	0,05
	TC	11/14 (78,6%)	16/18 (88,9%)		0,46	0,07 – 3,21	
7	CG	12/14 (85,7%)	17/18 (94,4%)	0,568	0,35	0,03 – 4,35	0,05
	CC	1/14 (7,1%)	1/18 (5,6%)	1,0	1,31	0,08 – 22,94	0,05
	GG	1/14 (7,1%)	0/18 (0%)	0,438	--	--	0,05
8	CC	2/14 (14,3%)	1/18 (5,6%)	0,568	2,83	0,23 – 34,92	0,05
	GG	2/14 (14,3%)	1/18 (5,6%)	0,568	2,83	0,23 – 34,92	0,05
	CG	10/14 (71,4%)	16/18 (88,9%)	0,365	0,31	0,05 – 2,03	0,05
9	CC	2/14 (14,3%)	1/18 (5,6%)	0,568	2,83	0,23 – 34,92	0,05
	GG	1/14 (7,1%)	1/18 (5,6%)	1,0	1,31	0,08 – 22,94	0,05
	CG	10/14 (71,4%)	16/18 (88,9%)	0,365	0,31	0,05 – 2,03	0,05
	AG	1/14 (7,1%)	0/18 (0%)	0,438	--	--	0,05
10	AA	2/14 (14,3%)	0/18 (0%)	0,183	--	--	0,05
	TT	2/14 (14,3%)	1/18 (5,6%)	0,568	2,83	0,23 – 34,92	0,05
	AT	10/14 (71,4%)	17/18 (94,4%)	0,142	0,15	0,01 – 1,51	0,05
11	CC	2/14 (14,3%)	1/18 (5,6%)	0,568	2,83	0,23 – 34,92	0,05
	TT	1/14 (7,1%)	0/18 (0%)	0,438	--	--	0,05
	CT	11/14 (78,6%)	17/18 (94,4%)	0,295	0,22	0,02 – 2,35	0,05
12	AA	1/14 (7,1%)	1/18 (5,6%)	1,0	1,31	0,08 – 22,94	0,05
	CC	1/14 (7,1%)	0/18 (0%)	0,438	--	--	0,05
	AC	12/14 (87,7%)	17/18 (94,4%)	0,568	0,35	0,03 – 4,35	0,05

Tab. 28: p-Werte der im DLA-64D Bereich lokalisierten Polymorphismen zur Prüfung der Nullhypothese; „--“ = alle Hunde wiesen dasselbe Allel auf: Berechnung von Odds Ratio nicht möglich.

Zusätzlich wurde eine Berechnung der DLA-64D-Polymorphismen unter der Voraussetzung, dass nur die an IHA erkrankten Hunde als „krank“ definiert wurden, durchgeführt. Auch hier wurde eine vermutete Assoziation der Variablen auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ abgelehnt (p-Werte s. Tab. 29).

<i>Polymorphismus</i>	<i>SNP</i>	<i>Kranke Hunde</i>	<i>Gesunde Hunde</i>	<i>p-Wert (Fisher's exact Test)</i>	<i>Odds ratio</i>	<i>95% Konfidenzintervall</i>	<i>Niveau</i>	
1	AA	11/12 (91,7%)	19/20 (95%)	0,375	0,58	0,03 – 10,21	0,05	
	AG	1/12 (8,3%)	1/20 (5%)		1,73	0,1 – 30,45		
2	CC	11/12 (91,7%)	19/20 (95%)	1,0	0,58	0,03 – 10,21	0,05	
	TC	1/12 (8,3%)	1/20 (5%)		1,73	0,1 – 30,45		
3	AA	1/12 (8,3%)	0/20 (0%)	0,375	--	--	0,05	
	GG	1/12 (8,3%)	1/20 (5%)	1,0	1,73	0,1 – 30,45	0,05	
	AG	10/12 (83,3%)	19/20 (95%)	0,54	0,26	0,02 – 3,27	0,05	
4	GG	11/12 (91,7%)	20/20 (100%)	0,375	--	--	0,05	
	AG	1/12 (8,3%)	0/20 (0%)		--	--		
6	TT	3/12 (25%)	2/20 (10%)	0,338	3	0,42 – 21,3	0,05	
	TC	9/12 (75%)	18/20 (90%)		0,33	0,05 – 2,37		
7	CG	10/12 (83,3%)	19/20 (95%)	0,54	0,26	0,02 – 3,27	0,05	
	CC	1/12 (8,3%)	1/20 (5%)		1,0	1,73		0,1 – 30,45
	GG	1/12 (8,3%)	0/20 (0%)		0,375	--		--
8	CC	2/12 (16,7%)	1/20 (5%)	0,54	3,8	0,31 – 47,21	0,05	
	GG	2/12 (16,7%)	1/20 (5%)		3,8	0,31 – 47,21		
	CG	8/12 (66,7%)	18/20 (90%)		0,165	0,22		0,03 – 1,47
9	CC	2/12 (16,7%)	1/20 (5%)	0,54	3,8	0,31 – 47,21	0,05	
	GG	1/12 (8,3%)	1/20 (5%)		1,0	1,73		0,1 – 30,45
	CG	8/12 (66,7%)	18/20 (90%)		0,165	0,22		0,03 – 1,47
	AG	1/12 (8,3%)	0/20 (0%)		0,375	--		--
10	AA	2/12 (16,7%)	0/20 (0%)	0,133	--	--	0,05	
	TT	2/12 (16,7%)	1/20 (5%)		0,54	3,8		0,31 – 47,21
	AT	8/12 (66,7%)	19/20 (95%)		0,053	0,11		0,01 – 1,1
11	CC	2/12 (16,7%)	1/20 (5%)	0,54	3,8	0,31 – 47,21	0,05	
	TT	1/12 (8,3%)	0/20 (0%)		0,375	--		--
	CT	9/12 (75%)	19/20 (95%)		0,136	0,16		0,02 – 1,74
12	AA	1/12 (8,3%)	1/20 (5%)	1,0	1,73	0,1 – 30,45	0,05	
	CC	1/12 (8,3%)	0/20 (0%)		0,375	--		--
	AC	10/12 (83,3%)	19/20 (95%)		0,54	0,26		0,02 – 3,27

Tab. 29: p-Werte der im DLA-64D Bereich lokalisierten Polymorphismen zur Prüfung der Nullhypothese mit nur an IHA erkrankten Probanden; „--“ = alle Hunde wiesen dasselbe Allel auf: Berechnung von Odds Ratio nicht möglich.

Rassespezifität

DLA-64D zeigte sowohl im Intron- als auch im Exonbereich eine deutliche Assoziation aller Polymorphismen mit der Rasse. Aufgrund dessen war eine Berechnung für diese Polymorphismen innerhalb der einzelnen Rassen notwendig. Dabei wurden zwischen den kranken und gesunden Hunden innerhalb einer Rasse keine Unterschiede gefunden. DLA-64D₁, DLA-64D₂, DLA-64D₄ und DLA-64D₁₁ waren innerhalb der Rassen konstant. Für alle anderen Polymorphismen musste die vermutete Assoziation verworfen werden ($\alpha = 0,05$).

2.2.2.4. Haplotyp-Status DLA-64F

Es wurden 2 Polymorphismen in dem 584bp großen Fragment entdeckt; beide befanden sich im nicht-codierenden Bereich. Beide polymorphe Stellen waren heterozygot: DLA-64F₁ (K), DLA-64F₂ (S).

Untersuchte Sequenz 5'-3':

**CAGTTCCTGCGGTTACAGCGACGCGGCGAGTCCGAAGGTGGAGCCGCGGGCGCGGTGGAT
GGAGCAGGAGGGGCCGGAGTTTGGGAGGAGCAGACGGAGATCGCCAAGGTGCACGCCAG
ACCTCCCGATCCAACCTGCAGACGGCCCTCGGCTACTACAACCAGAGCGAGGCCGGTGAGTG
ACCCGGGCCGGGTCCAGTTCACGAGTCCATGAACCCCTTGCACAGCCTGGGGTCTCCCCGAGTTC**

CCGGGTCT/G₁GAGATT/C/G₂ACCCCCGGGCCAGGAGACCGTCCTGGCCCCCTACGCGGGACGAGCCTGCAGGGACTTGCGGACAGTTTCCGAGGTCTCTGACCACTCGCCGGCCGTAGTCCAATGCCAGGGAGTCTAGG

Es wurde eine Berechnung für beide DLA-64F Polymorphismen durchgeführt. Eine vermutete Assoziation der Variablen „DLA-64F₁“ sowie „DLA-64F₂“ und „Erkrankung“ wurde durch den Test auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ abgelehnt (p-Werte s. Tab. 30).

<i>Polymorphismus</i>	<i>SNP</i>	<i>Kranke Hunde</i>	<i>Gesunde Hunde</i>	<i>p-Wert (Fisher's exact Test)</i>	<i>Odds ratio</i>	<i>95% Konfidenzintervall</i>	<i>Niveau</i>
1	TT	13/14 (92,9%)	16/18 (88,9%)	1,0	1,63	0,13 – 19,99	0,05
	GG	1/14 (7,1%)	0/18 (0%)	0,438	--	--	0,05
	TG	0/14 (0%)	2/18 (11,1%)	0,492	--	--	0,05
2	CC	3/14 (21,4%)	9/18 (50%)	0,147	0,27	0,06 – 1,32	0,05
	GG	6/14 (42,9%)	4/18 (22,2%)	0,267	2,63	0,57 – 12,18	0,05
	CG	5/14 (35,7%)	5/18 (27,8%)	0,712	1,44	0,32 – 6,49	0,05

Tab. 30: p-Werte der im DLA-64F Bereich lokalisierten Polymorphismen zur Prüfung der Nullhypothese; „--“ = alle Hunde wiesen dasselbe Allel auf: Berechnung von Odds Ratio nicht möglich.

Zusätzlich wurde eine Berechnung der DLA-64F-Polymorphismen für die nur an IHA erkrankten Hunde durchgeführt. Auch hier wurde eine vermutete Assoziation der Variablen auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ abgelehnt (p-Werte s. Tab. 31).

<i>Polymorphismus</i>	<i>SNP</i>	<i>Kranke Hunde</i>	<i>Gesunde Hunde</i>	<i>p-Wert (Fisher's Exact Test)</i>	<i>Odds ratio</i>	<i>95% Konfidenzintervall</i>	<i>Niveau</i>
1	TT	12/12 (100%)	17/20 (85%)	0,274	--	--	0,05
	GG	0/12 (0%)	1/20 (5%)	1,0	--	--	0,05
	TG	0/12 (0%)	2/20 (10%)	0,516	--	--	0,05
2	CC	3/12 (25%)	9/20 (45%)	0,452	0,41	0,08 – 1,97	0,05
	GG	5/12 (41,7%)	5/20 (25%)	0,438	2,14	0,46 – 9,9	0,05
	CG	4/12 (33,3%)	6/20 (30%)	1,0	1,17	0,25 – 5,41	0,05

Tab. 31: p-Werte der im DLA-64D Bereich lokalisierten Polymorphismen zur Prüfung der Nullhypothese mit nur an IHA erkrankten Probanden; „--“ = alle Hunde wiesen dasselbe Allel auf: Berechnung von Odds Ratio nicht möglich.

Rassespezifität

Eine vermutete Assoziation der Variablen „Rasse“ und „DLA-64F-Allele“ wurde durch den Test auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ verworfen. Dadurch wurde eine Berechnung der DLA-64F-Polymorphismen innerhalb der einzelnen Rassen überflüssig und wurde nicht durchgeführt.

2.2.3. MHC-I: DLA-79

DLA-79 wurde bereits 1995 von Burnett et al. (Burnett et al. 1995a) beschrieben. Das Gen liegt, im Gegensatz zu den anderen MHC-Genen, beim Hund auf Chromosom 18. Für diese Studie wurden 5 Primerpaare entwickelt, um einen Bereich von ca. 4800 bp zu untersuchen. Eine graphische Darstellung des DLA-79 mit den korrespondierenden Loci und den codierenden Bereichen ist in Abb. 7 dokumentiert.

6	CC	11/14 (78,6%)	8/18 (44,4%)	0,075	4,58	0,95 – 22,24	0,05
	GG	1/14 (7,1%)	3/18 (16,7%)	0,613	0,39	0,04 – 4,16	0,05
	CG	2/14 (14,3%)	7/18 (38,9%)	0,235	0,26	0,05 – 1,54	0,05
7	AA	12/14 (85,7%)	7/18 (38,9%)	0,012	9,43	1,6 – 55,45	0,05
	GG	0/14 (0%)	3/18 (16,7%)	0,238	--	--	0,05
	AG	2/14 (14,3%)	8/18 (44,4%)	0,124	0,21	0,04 – 1,21	0,05
8	GG	7/14 (50%)	14/18 (77,8%)	0,142	0,29	0,06 – 1,32	0,05
	GT	7/14 (50%)	4/18 (22,2%)		3,5	0,76 – 16,12	0,05
9	GG	12/14 (85,7%)	18/18 (100%)	0,183	--	--	0,05
	GT	2/14 (14,3%)	0/18 (0%)		--	--	

Tab. 32: p-Werte der im DLA-79B lokalisierten Polymorphismen zur Prüfung der Nullhypothese; „--“ = alle Hunde wiesen dasselbe Allel auf: Berechnung von Odds Ratio nicht möglich.

Für die Variablen „DLA-79B₄“ und „Erkrankung“ sowie „DLA-79B₇“ und „Erkrankung“ wurde die vermutete Assoziation durch den Test auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ bestätigt. Bei DLA-79B₄ kam das Allel TT deutlich häufiger bei den kranken Hunden vor als bei den gesunden. Die Chance, dass Hunde mit dem Allel TT eher an IHA/ITP/Evans' Syndrom erkrankten, war um 9,43 höher als bei Hunden, die das Allel TT nicht trugen. Dasselbe galt für DLA-79B₇: Eher kranke Hunde trugen das Allel AA. Die Chance der Hunde, die AA trugen, an IHA/ITP/Evans' Syndrom zu erkranken, war daher 9,43 mal höher als bei den Hunden, die das Allel nicht trugen. Diese beiden Polymorphismen wurden anhand der Kontrollprobanden (Tab. 13) nochmals überprüft. Die vermutete Assoziation dieser beiden Variablen musste nach dem zweiten Testdurchlauf auf dem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ abgelehnt werden (p-Werte s. Tab. 33).

<i>Polymorphismus</i>	<i>SNP</i>	<i>Kranke Hunde</i>	<i>Gesunde Hunde</i>	<i>p-Wert (Fisher's exact Test)</i>	<i>Odds ratio</i>	<i>95% Konfidenzintervall</i>	<i>Niveau</i>
4	TT	14/21 (66,7%)	8/19 (42,1%)	0,203	2,75	0,76 – 9,95	0,05
	GG	2/21 (9,5%)	5/19 (26,3%)	0,226	0,3	0,05 – 1,75	0,05
	TG	5/21 (23,8%)	6/19 (31,6%)	0,727	0,68	0,17 – 2,73	0,05
7	AA	15/21 (71,4%)	8/19 (42,1%)	0,109	3,44	0,92 – 12,79	0,05
	GG	1/21 (4,8%)	3/19 (15,8%)	0,331	0,27	0,03 – 2,82	0,05
	AG	5/21 (23,8%)	8/19 (42,1%)	0,314	0,43	0,11- 1,67	0,05

Tab. 33: p-Werte der im DLA-79B Bereich als signifikant befundenen Polymorphismen nach Testung an Kontrollhunden zur Prüfung der Nullhypothese.

Zusätzlich wurde eine Berechnung der DLA-79B-Polymorphismen unter der Voraussetzung durchgeführt, dass nur die an IHA erkrankten Hunde als „krank“ definiert wurden. Eine Assoziation zwischen allen Polymorphismen des DLA-79B und den an IHA erkrankten Hunden wurde auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ abgelehnt (p-Werte s. Tab. 34).

<i>Polymorphismus</i>	<i>SNP</i>	<i>Kranke Hunde</i>	<i>Gesunde Hunde</i>	<i>p-Wert (Fisher's exact Test)</i>	<i>Odds ratio</i>	<i>95% Konfidenzintervall</i>	<i>Niveau</i>
1	TT	12/12 (100%)	19/20 (95%)	1,0	--	--	0,05
	CC	0/12 (0%)	1/20 (5%)		--	--	
2	AA	0/12 (100%)	1/20 (5%)	1,0	--	--	0,05
	GG	11/12 (91,7%)	16/20 (80%)	0,626	2,75	0,27 – 28,04	0,05
	AG	1/12 (8,3%)	3/20 (15%)	1,0	0,52	0,05 – 5,61	0,05
4	TT	10/12 (83,3%)	9/20 (45%)	0,062	6,11	1,06 – 35,35	0,05
	GG	0/12 (0%)	5/20 (25%)	0,13	--	--	0,05
	TG	2/12 (16,7%)	6/20 (30%)	0,676	0,47	0,08 – 2,81	0,05
5	CC	10/12 (83,3%)	19/20 (95%)	0,54	0,26	0,02 – 3,27	0,05

	TT	2/12 (16,7%)	1/20 (5%)		3,8	0,04 – 47,21	0,05
6	CC	9/12 (75%)	10/20 (50%)	0,267	3	0,62 – 14,47	0,05
	GG	1/12 (8,3%)	3/20 (15%)	1,0	0,52	0,05 – 5,61	0,05
	CG	2/12 (16,7%)	7/20 (35%)	0,433	0,37	0,06 – 2,19	0,05
7	AA	10/12 (83,3%)	9/20 (45%)	0,062	6,11	1,06 – 35,35	0,05
	GG	0/12 (0%)	3/20 (15%)	0,274	--	--	0,05
	AG	2/12 (16,7%)	8/20 (40%)	0,248	0,3	0,0 – 1,75	0,05
8	GG	5/12 (41,7%)	16/20 (80%)	0,053	0,18	0,04 – 0,87	0,05
	GT	7/12 (58,3%)	4/20 (20%)		5,6	1,15 – 27,37	0,05
9	GG	10/12 (83,3%)	20/20 (100%)	0,133	--	--	0,05
	GT	2/12 (16,7%)	0/20 (0%)		--	--	

Tab. 34: p-Werte der im DLA-79B Bereich lokalisierten Polymorphismen zur Prüfung der Nullhypothese mit nur an IHA erkrankten Probanden; „--“ = alle Hunde wiesen dasselbe Allel auf; Berechnung von Odds Ratio nicht möglich.

Rassespezifität

DLA-79B zeigte außer den Polymorphismen DLA-79B₁, DLA-79B₂ und DLA-79B₈ sowohl im Intron- als auch im Exonbereich eine deutliche Assoziation aller Polymorphismen mit der Rasse. Aufgrund dessen war eine Berechnung für diese DLA-79B-Polymorphismen innerhalb der einzelnen Rassen notwendig. Dabei wurden zwischen den kranken und gesunden Hunden innerhalb einer Rasse keine signifikanten Unterschiede gefunden. Für alle Polymorphismen musste die vermutete Assoziation verworfen werden ($\alpha = 0,05$).

2.2.3.2. Haplotyp-Status DLA-79D

Der sequenzierte Bereich von insgesamt 764bp umfasste Teile von Exon 3 und war über den gesamten Abschnitt monomorph.

Untersuchte Sequenz 5'-3':

TGAGCGAGGACCTGCGCTCCTGGATCGTGGAGGACCCGGTGGCTCAGATCACTCGGCGCAA
GTGGGATGCGGCCACTGTAGCTGAGAACCGTAAGAAGTTCCTGGAGGGCAGGTGCTTGGAG
TGGCTCCGCAGACACCTGGAGAATGGGAGGGAGACGCTGCAGCGCGCAGGTACCAGGGGCCT
CCCCATCTTCACTCTGCTGGGGCTGGCTTCCCCAAGGAAGGGAGGGTGGACTCAGTGTGAGAATA
CTGCCCCCTCCACAGGTGGGAAGAAAGAGATCCATCTCAACATTCATATTCCTACTACAGAGTAA
TTCTTCAAAGAGCTGCTTCTCTAGAGGACAAGTGGAGGAATCCAGTCTCCCTGGAGGCAGGTGG
AGACCATCCCTGAAATAACTCATCAGAGTTCTCTCCATCCTGGAACACCTTGTGAACCATGGC
TTTCTTCTCAAGGCCTTGTCTCCATCGGAGAACATTTTTGGAGGTCTGACTCCAGGTTTTCTGAG
TCACTGACCCTCTGCTGCAGTCCAGACCGTTAGTGTGTTCCCCACTCTAGACCTGCACCTCTCCTGTC
CTGGGATCTTCCGTGATTCTAAAATGTTATTCAGACAACCAAGTCTAGGCTGTGTCAGGGTTTTG
TGCTTTTCTTCTTAAACCAATTGCCTCTCCATCCTCAGCATGGTCACAAGTGTGCTTTAATGACC
CATGAAGT

2.2.3.3. Haplotyp-Status DLA-79F

In diesem untersuchten Bereich von 300bp wurde ein Polymorphismus definiert, der sich im Exon 4 befand: DLA-79F₁ (heterozygot: M).

Untersuchte Sequenz 5'-3':

GCCGTCCATCTCTGAGCATGAGGTCACCCTGAAGTGCTGGGCTCTGGGCTTCTACCCTGCGG
AGATCACCTTGACCTGGCAGCGTGATGGGAGGACCAGACCCAGGACACAGAGCTTGTGGA
GACCAGGCCTGGAGGAGATGGGACCTTCCAGAAGTGGGCAGCTGTGGTGGTGCCTTCTGGA
GAGGAGCAGAGATACACATGCCATATTCTGCACAAGAGCCTGCA/CCAAGCCCATCACCTTG
AGATGGG

Es wurde eine Berechnung für das Allel DLA-79F₁ durchgeführt. Eine vermutete Assoziation der Variablen „DLA-79F₁“ und „Erkrankung“ wurde durch den Test auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ abgelehnt (p-Werte s. Tab. 35).

<i>Polymor phismus</i>	<i>SNP</i>	<i>Kranke Hunde</i>	<i>Gesunde Hunde</i>	<i>p-Wert (Fisher's exact Test)</i>	<i>Odds ratio</i>	<i>95% Konfidenzintervall</i>	<i>Niveau</i>
1	CC	8/14 (57,1%)	12/18 (66,7%)	0,718	0,67	0,16 – 2,82	0,05
	AA	1/14 (7,2%)	1/18 (5,6%)	1,0	1,31	0,07 – 22,93	0,05
	AC	5/14 (35,7%)	5/18 (27,8%)	0,712	1,44	0,32 – 6,49	0,05

Tab. 35: p-Werte der im DLA-79F Bereich lokalisierten Polymorphismen zur Prüfung der Nullhypothese.

Zusätzlich erfolgte eine Berechnung der DLA-79F-Polymorphismen für die nur an IHA erkrankten Hunde. Auch hier wurde eine vermutete Assoziation der Variablen auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ abgelehnt (p-Werte s. Tab. 36).

<i>Polymor phismus</i>	<i>SNP</i>	<i>Kranke Hunde</i>	<i>Gesunde Hunde</i>	<i>p-Wert (Fisher's exact Test)</i>	<i>Odds ratio</i>	<i>95% Konfidenzintervall</i>	<i>Niveau</i>
1	CC	7/12 (58,3%)	13/20 (65%)	0,724	0,75	0,17 – 3,28	0,05
	AA	1/12 (8,3%)	1/20 (5%)	1,0	1,73	0,1 – 10,45	0,05
	AC	4/12 (33,3%)	6/20 (30%)	1,0	1,17	0,25 – 5,41	0,05

Tab. 36: p-Werte der im DLA-79F Bereich lokalisierten Polymorphismen zur Prüfung der Nullhypothese mit nur an IHA erkrankten Probanden.

Rassespezifität

DLA-79F zeigte eine deutliche Assoziation des vorliegenden Polymorphismus mit der Rasse. Aufgrund dessen war eine Berechnung für diesen Polymorphismus innerhalb der einzelnen Rassen notwendig. Dabei wurde zwischen den kranken und gesunden Hunden innerhalb einer Rasse keine signifikanten Unterschiede gefunden ($\alpha = 0,05$).

2.2.3.4. Haplotyp-Status DLA-79G

Der untersuchte Sequenzabschnitt (752 bp) umfasste Exon 5 und war über die ganze Länge hinweg monomorph.

Untersuchte Sequenz 5'-3':

CTTCAGACTCAAGCCTGAGGTCTGGGCCCTCGCCTTCCCTTCCCTTCCAGAACCCACTCCTCAG
TCCACCATCCCATAGTGAGCATATTGCTGGCCTGGTTCTCCTTGTGATCACTGGAGCTATG
CTGGTTGGAGTTGTGATATGGAGGAAGAAGCACTCAGGTAGGGAAGGGAGTGGGGGAATCTG
AGTTTTCTGTCTACTGGGAGGTTTCAAGCCCAAAGTAGAAGTTTGTCTGTCTTGTTAATAAGAA
GTGCCATCTGGAGTAGCTGGGTGACTCAGTGGTTGAGCATCTGCCTTTGGCACAGGTCACGATCCC
GGAGTCCTGGGATCAAGTCCTACATCAGGCTCCCTGCTCAGCACAGAGCCTGCTTCTCTCTGCAT
ATGTCTCTGCCTCTCTGTATGTCTTTCATGAATAACATAAAATAAAATCTTTTAAAAAGAGACAGAA
AAANAGGTACCATCCACATACATGNGCTAGCCAGCTGCTAACATTCACTCCTTAGTAAAGACTTGT
GCAAATGAAGGACAGATTTTTACCTTTCTATTCTGGCATTGGGGACCTGAGCCCTAGCAGCTGAA
GGTAGGGGAATTCCCTGATACAGACAGACCTCCCGGAAGACAGTTGGCCCAGTGCCCCTACAT
ATACTTTCTCTGNGGTCTCCGATACAG

2.2.3.5. Haplotyp-Status DLA-79H

Zur Analyse dieses Teilbereiches wurde ein 933bp großes Fragment überprüft und umfasste die codierenden Bereiche Exon 7 und Exon 8. Der Locus war ebenfalls über den gesamten Verlauf monomorph.

Untersuchte Sequenz 5'-3':

ATGGAGGGAGTGATCCTTGAGACCCTGGGATAGTATAGATAGGACCCCATGGGGGAAGTCAAGCA
CCCTATATAGCTCCTCCTTTAGTCTCATCTTTGTGGGTTGTCTACCGTAGGCAGTGCTCAGGAC
TCTCAGATGTCTGTATGGCTCCTAATGGTGAGACCCTGGAGGGCTGAAGCCAAGGGGAGTGG
TTGGGGCAGAGGGGACATGACTGGGTTATGAGGATTCTTTGAGTGGAACATTATAAGCATGTGGA
GATGTCAGCACTTAACATGATTGACCTGAATTTGTTTCATGACTATTTTCTTTACAGAGCAAGCCA
GCTGCCTTGTGGGACTCTGAGTGATGCAAGATTTGTTTCACACTCCACTTTTTGACTTCAAGAG

CCCCGGATATCTCCATCTGCTAATGGNGTCTGAAAGTGNCTCTGTTCTTATTAGCATAAATGTGAGCA
GGTGGGGAAATTGGCCNCCTCTACTCCATCATGTCCCTTCCCCCAACTGNCCTGTGTTCTTTCCCT
AATCTGCTTTCTCTTCCAGCAGAGATGGGNCTGGGTCATTACCNTCCTTGTCTTTACTTCATATTTG
GCTGGGAAGTAATATTTAACTTGTCTTATTCTGTATGTTAGTAAATTGAACCCCAATAAAAAAAT
AAATTAATAAAAAAAGTTAAAAAAGAAAATCTGGATATGACTTTGTTTTTCTATTCTTGTCAT
TATAAAATTGGCATGGTAATAAA

2.2.4. MHC-I: DLA-88

DLA-88 befindet sich wie DLA-64 und DLA-12 auf dem Chromosom 12. Es ist nachgewiesen, dass es sich beim DLA-88 um ein sehr polymorphes Gen innerhalb des MHC-I handelt (Graumann et al. 1998). Leider gelang es in vorliegender Studie nicht, DLA-88 vollständig zu sequenzieren. Es wurden wiederholt die Reaktionsbedingungen der PCR optimiert und mehrere Primerdesigns durchgeführt, dennoch konnten keine auswertbaren Ergebnisse erzeugt werden.

3. MHC-II-Untersuchung

3.1. Probanden

Für die Untersuchung von MHC-II-Allelen wurden für die Loci DLA-DRA und DLA-DRB (Exon 1), DLA-DQA (Exon 1) und DLA-DQB (Exon 1) insgesamt 32 Hunde ausgewählt. Es handelte sich dabei um dieselben Probanden, die für die Untersuchung des MHC-I bestimmt wurden (Tab. 12).

Für die Untersuchung der Loci DLA-DRB (Exon 2), DLA-DQA (Exon 2) und DLA-DQB (Exon 2) wurden 52 Probanden festgelegt (Tab. 37). Dabei handelte es sich um 17 weibliche (davon 5 kastriert) und 14 männliche (davon 1 kastriert) Cocker Spaniel (n = 31) und 11 weibliche und 10 männliche Irish Red Setter (n = 21). Alle Cocker Spaniel waren bis auf ein Hund miteinander verwandt, alle Irish Setter entstammten demselben Pedigree (Abb. 1-4). Von den Probanden waren 5 am Evans' Syndrom, 6 an IHA und 4 an ITP erkrankt (n = 15). Alle untersuchten Probanden sind mit Alter (Erkrankungs- bzw. Untersuchungsalter), Geschlecht und Krankheitsstatus in Tab. 37 aufgelistet. Das mittlere Alter aller untersuchten Probanden lag bei 7,4 Jahren, der Altersmedian bei 7 Jahren. Das mittlere Alter aller kranken Probanden lag bei 6,5 Jahren und der Altersmedian bei 6 Jahren.

<i>No.</i>	<i>Nummer im Pedigree</i>	<i>Rasse</i>	<i>Sex</i>	<i>Coombs' Test</i>	<i>Test auf Tc-geb. AK</i>	<i>Erkrankung</i>	<i>Alter erkrankt / getestet (J)</i>
1	66	Cocker Spaniel	wk	ja	ja	Evans' Syndrom	8
2	136	Cocker Spaniel	m	ja	ja	Evans' Syndrom	10
3	155	Cocker Spaniel	w	ja	ja	Evans' Syndrom	6
4	178	Cocker Spaniel	w	ja	ja	Evans' Syndrom	5
5	106	Cocker Spaniel	w	ja	nein	IHA	6
6	118	Cocker Spaniel	w	ja	ja	ITP	10
7	81	Cocker Spaniel	wk	ja	ja	ITP	14
8	--	Cocker Spaniel	wk	ja	Ja	IHA	4
9	168	Cocker Spaniel	m	ja	ja	gesund	5
10	67	Cocker Spaniel	wk	ja	nein	gesund	17
11	126	Cocker Spaniel	w	nein	nein	gesund	14
12	135	Cocker Spaniel	m	nein	nein	gesund	12
13	149	Cocker Spaniel	w	ja	ja	gesund	10
14	154	Cocker Spaniel	w	ja	ja	gesund	7
15	55	Cocker Spaniel	mk	nein	nein	gesund	15
16	64	Cocker Spaniel	w	nein	nein	gesund	8
17	70	Cocker Spaniel	m	nein	nein	gesund	15

18	73	Cocker Spaniel	m	nein	ja	gesund	16
19	74	Cocker Spaniel	m	nein	nein	gesund	15
20	130	Cocker Spaniel	m	ja	ja	gesund	12
21	132	Cocker Spaniel	w	nein	nein	gesund	13
22	140	Cocker Spaniel	w	ja	ja	gesund	9
23	146	Cocker Spaniel	m	ja	nein	gesund	7
24	156	Cocker Spaniel	wk	nein	nein	gesund	10
25	160	Cocker Spaniel	m	nein	nein	gesund	3
26	161	Cocker Spaniel	m	nein	nein	gesund	3
27	162	Cocker Spaniel	w	nein	nein	gesund	3
28	163	Cocker Spaniel	w	nein	nein	gesund	3
29	164	Cocker Spaniel	m	nein	nein	gesund	3
30	165	Cocker Spaniel	m	nein	nein	gesund	3
31	166	Cocker Spaniel	m	ja	nein	gesund	4
32	127	Irish Setter	w	ja	ja	Evans' Syndrom	4
33	10	Irish Setter	m	ja	ja	IHA	5
34	21	Irish Setter	m	ja	ja	IHA	0,5
35	49	Irish Setter	w	ja	ja	IHA	5
36	118	Irish Setter	w	ja	ja	IHA	3,5
37	39	Irish Setter	m	ja	ja	ITP	9
38	26	Irish Setter	m	ja	ja	gesund	4
39	43	Irish Setter	m	ja	ja	gesund	9
40	44	Irish Setter	w	ja	ja	gesund	13
41	54	Irish Setter	m	ja	ja	gesund	8
42	41	Irish Setter	w	ja	ja	gesund	10
43	48	Irish Setter	w	ja	ja	gesund	8
44	57	Irish Setter	w	ja	ja	gesund	8
45	58	Irish Setter	w	ja	ja	gesund	6
46	61	Irish Setter	m	ja	ja	gesund	2
47	69	Irish Setter	w	ja	ja	gesund	2
48	103	Irish Setter	m	ja	ja	gesund	3
49	104	Irish Setter	m	ja	ja	gesund	3
50	109	Irish Setter	m	ja	ja	gesund	3
51	115	Irish Setter	w	ja	ja	gesund	3
52	116	Irish Setter	w	ja	ja	ITP	5

Tab. 37: Probandenpool mit Angabe von Rasse, Geschlecht, Art der Erkrankung und Erkrankungs- bzw. Untersuchungsalter in Jahren (J) für die Sequenzierung des MHC-II: DLA-DRB (Exon 2), DLA-DQA (Exon 2) und DLA-DQB (Exon 2). Die angegebenen Nummern im Pedigree beziehen sich für die Cocker Spaniel auf die Abb. 1-2, für die Irish Setter auf die Abb. 3-4. Mit „--“ wurden die Hunde bezeichnete, die nicht verwandt sind und daher nicht im Pedigree auftauchen.

3.2. MHC-II-Kandidatengenscreen

In Tab. 38 sind die untersuchten MCH-II-Kandidatengene zusammengefasst. Sie beinhaltet Detailinformationen zu den sequenzierten Bereichen und den entschlüsselten Mutationen.

<i>Kandidatengen</i>	<i>PCR-Produkte</i>	<i>Größe (bp)</i>	<i>Status</i>	<i>Heterozygote Position</i>	<i>untersuchte Exone</i>
DLA-DRA	DRA1A	551	1 Polymorphismus	Homozygot	Exon 1
	DRA1B	241	3 Polymorphismen	R, M	Exon 2
	DRA1C	756	2 Polymorphismen	Y, R	Exon 3
	DRA1D	214	monomorph	Homozygot	Exon 4

DLA-DRB	DRB1	545	1 Polymorphismus	R	Exon 1
	DRB1b	270	13 Polymorphismen	Y, K	Exon 2
DLA-DQA	DQA1	581	2 Polymorphismen	W, Y	Exon 1
	DQA1b	246	5 Polymorphismen 1 Deletion	Y, M	Exon 2
DLA-DQB	DQB1	1018	5 Polymorphismen 1 Insertion	Y, M, R	Exon 1
	DQB1b	267	27 Polymorphismen	K, R, S, W, M	Exon 2

Tabelle 38: Untersuchte Loci des MHC-II mit Anzahl der Polymorphismen, Art der heterozygoten Stellen und untersuchten Exonen.

3.2.1. MHC-II: DLA-DRA

DLA-DRA befindet sich beim Hund auf dem Chromosom 12 des Genoms (Wagner et al. 1995). Für diese Studie wurden insgesamt 4 Primerpaare entwickelt, die alle codierenden Bereiche abdeckten. Eine graphische Darstellung und Zuordnung der Loci zu den Exonen s. Abb. 9.

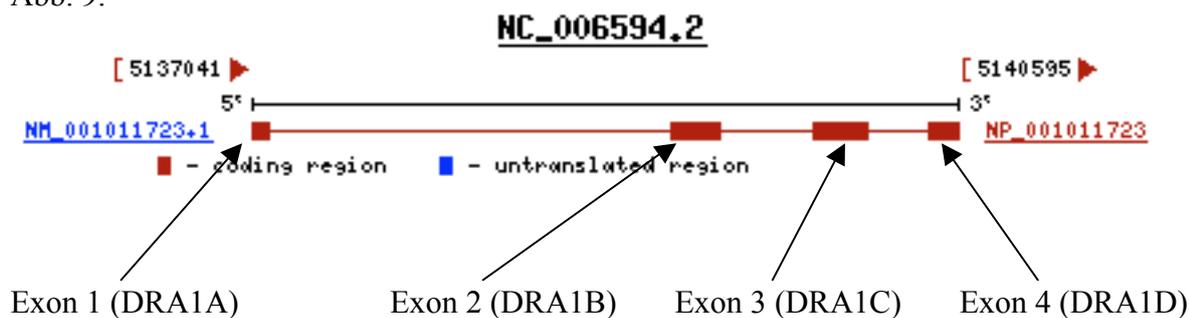


Abb. 9: DLA-DRA mit Exonbereiche und korrespondierenden Loci. Benennung der Loci s. Tab. 38.

3.2.1.1. Haplotyp-Status DLA-DRA1A

Im untersuchten 551bp großem Fragment konnte ein C/T-Polymorphismus dargestellt werden, der bei zwei Hunden heterozygot war (Y).

Untersuchte Sequenz: 5'-3'

ATTCTGTTTCNGTGTGTCAGGGAGAAGGACTAGCCCAAGCAGGGAAGGCTAATTTCTGTCCTGTGTCC
CT,CAGTACCTCCAGAGGTGACTGTGCTCTCAAACACCCCTGTGGAAGTGGGAGAGCCCAACA
 TCCTCATCTGTTTCATCGACAAGTCTCCCCACCAGTGATCAATGTCACGTGGCTTCGAAATG
 GAAACCCTGTCACCACAGGAGTGTGTCAGAGACAATCTTTTTGCCAGAGAAGACCACCTTTC
 CGCAAATTCACATCTCCCCTTCCTGCCCTCAGCC

Eine vermutete Assoziation der Variablen „DLA-DRA1A₁“ und „Erkrankung“ wurde durch den Test auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ abgelehnt (p-Werte s. Tab. 39).

Polymor- phismus	SNP	Kranke Hunde	Gesunde Hunde	p-Wert (Fisher's exact Test)	Odds ratio	95% Konfidenzintervall	Niveau
1	CC	5/14 (35,7%)	7/18 (38,9%)	1,0	0,873	0,205 – 3,71	0,05
	TT	7/14 (50%)	11/18 (61,1%)	0,721	0,636	0,155 – 2,614	0,05
	TC	2/14 (14,3%)	0/18 (0%)	0,183	--	--	0,05

Tab. 39: p-Werte des im DLA-DRA1A Bereich lokalisierten Polymorphismus zur Prüfung der Nullhypothese; „--“ = alle Hunde wiesen dasselbe Allel auf: Berechnung von Odds Ratio nicht möglich.

Zusätzlich wurde eine Berechnung des DLA-DRA1A-Polymorphismus für die nur an IHA erkrankten Hunde durchgeführt. Auch hier wurde eine vermutete Assoziation der Variablen auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ abgelehnt (Tab. 40).

<i>Polymorphismus</i>		<i>Kranke Hunde</i>	<i>Gesunde Hunde</i>	<i>p-Wert (Fisher's exact Test)</i>	<i>Odds ratio</i>	<i>95% Konfidenzintervall</i>	<i>Niveau</i>
1	CC	4/12 (33,3%)	8/20 (40%)	1,0	0,75	0,168 – 3,351	0,05
	TT	6/12 (50%)	12/20 (60%)	0,718	0,67	0,158 – 2,821	0,05
	TC	2/12 (16,7%)	0/20 (0%)	0,133	--	--	0,05

Tab. 40: p-Werte des im DLA-DRA1A Bereich lokalisierten Polymorphismus zur Prüfung der Nullhypothese mit nur an IHA erkrankten Probanden; „--“ = alle Hunde wiesen dasselbe Allel auf: Berechnung von Odds Ratio nicht möglich.

Rassespezifität

DLA-DRA1A zeigte eine deutliche Assoziation des vorliegenden Polymorphismus mit der Rasse. Daher war eine Berechnung für diesen Polymorphismus innerhalb der einzelnen Rassen notwendig. Dabei wurden zwischen den kranken und gesunden Hunden innerhalb einer Rasse keine signifikanten Unterschiede gefunden, da $p\text{-Wert} > \alpha$ ($\alpha = 0,05$).

3.2.1.2. Haplotyp-Status DLA-DRA1B

Hier konnten insgesamt 3 Polymorphismen in einem 241bp umfassenden Bereich dargestellt werden. Sie waren alle im codierenden Bereich lokalisiert und heterozygot vertreten: DLA-DRA1B₁ (R), DLA-DRA1B₂ (R), DLA-DRA1B₃ (M).

Untersuchte Sequenz 5'-3':

**GTTTTATTTTCCCCAGAAGTTTGAACCACCAACCCCCCTCCCAGAGACAACAGAGAATGTGGT
GTGTGCCCTGGGCCTGATCGTGGGTCTGGTGGGCATCATTACTGGGACCATTTTCATCATCA
AGGGCATGCGCAAGGTCAAAGCTGGT *G/A*, AACGCCGAGG *G/A*, *C/A*, CTCTTTGAGGCACTTTCA
GGTGGGTTTGATGTAGAGGAAGGCA**

Es wurde eine Berechnung für alle Polymorphismen durchgeführt. Eine vermutete Assoziation der Variablen „DLA-DRA1B₁“, „DLA-DRA1B₂“ sowie „DLA-DRA1B₃“ und „Erkrankung“ wurde durch den Test auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ abgelehnt (Tab. 41).

<i>Polymorphismus</i>	<i>SNP</i>	<i>Kranke Hunde</i>	<i>Gesunde Hunde</i>	<i>p-Wert (Fisher's exact Test)</i>	<i>Odds ratio</i>	<i>95% Konfidenzintervall</i>	<i>Niveau</i>
1	GG	14/14 (100%)	16/18 (88,9%)	0,492	--	--	0,05
	GA	0/14 (0%)	2/18 (11,1%)		--	--	
2	GG	11/14 (78,6%)	15/18 (83,3%)	1,0	0,733	0,124 – 4,346	0,05
	GA	3/14 (21,4%)	3/18 (16,7%)		1,36	0,23 – 8,08	
3	CC	14/14 (100%)	16/18 (88,9%)	0,492	--	--	0,05
	CA	0/14 (0%)	2/18 (11,1%)		--	--	

Tab. 41: p-Werte der im DLA-DRA1B Bereich lokalisierten Polymorphismen zur Prüfung der Nullhypothese; „--“ = alle Hunde wiesen dasselbe Allel auf: Berechnung von Odds Ratio nicht möglich.

Zusätzlich wurde eine Berechnung der DLA-DRA1B-Polymorphismen für die nur an IHA erkrankten Hunde durchgeführt. Auch hier wurde eine vermutete Assoziation der Variablen auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ abgelehnt (Tab. 42).

<i>Polymorphismus</i>	<i>SNP</i>	<i>Kranke Hunde</i>	<i>Gesunde Hunde</i>	<i>p-Wert (Fisher's exact Test)</i>	<i>Odds ratio</i>	<i>95% Konfidenzintervall</i>	<i>Niveau</i>
1	GG	12/12 (100%)	18/20 (90%)	0,516	--	--	0,05
	GA	0/12 (0%)	2/20 (10%)		--	--	
2	GG	9/12 (75%)	17/20 (85%)	0,647	0,53	0,089 – 3,18	0,05
	GA	3/12 (25%)	3/20 (15%)		1,89	0,315 – 11,344	
3	CC	11/11 (100%)	18/20 (90%)	0,527	--	--	0,05
	CA	0/11 (0%)	2/20 (10%)		--	--	

Tab. 42: p-Werte der im DLA-DRA1B Bereich lokalisierten Polymorphismen zur Prüfung der Nullhypothese mit nur an IHA erkrankten Probanden; „--“ = alle Hunde wiesen dasselbe Allel auf; Berechnung von Odds Ratio nicht möglich.

Rassespezifität

DLA-DRA1B zeigte keine deutliche Assoziation der Polymorphismen mit der Rasse. Aufgrund dessen war eine Berechnung für diesen Polymorphismus innerhalb der einzelnen Rassen nicht notwendig.

3.2.1.3. Haplotyp-Status DLA-DRA1C

In diesem Sequenzabschnitt (756bp) wurden 2 Polymorphismen detektiert, die sich alle im nicht-codierenden Bereich befanden. Beide Polymorphismen waren heterozygot: DLA-DRA1C₁ (Y) und DLA-DRA1C₂ (R).

TCAACATGGATGTCCTGCACCTGAGCCTCATCTTCCAGCTCATTTCTGCTCTC7/CATCATTCTCCA
TTCC4/G2CATGGCCAATCCCTTCCACTGCCACACCCACATGTTTGTCTCACATCTGGGTTCTACTT
CTTCTCCTGCTCCTGGTTTCCACCCTAACTCTCTTCCCTGCCTTTTTCAGAGGAGCACGTAATCATCC
AGGCTGAGTTCTATCTGACCCCTGACCCATCAGGCGAGTTCATGTTTGACTTCGATGGTGAT
GAGATTTTCCACGTGGATATGGAAAAGAAGGAGACGGTGTGGCGCCTTGAAGAATTTGGACG
TTTTGCCAGCTTTGAGGCCAGGGTGCCTTGGCCAACATAGCTGTGGACAAAGCTAACCTTG
ACACAATGATAAAGCGCTCCAACCACACCCCGAACCAATGGT

Es wurde eine Berechnung für alle Probanden durchgeführt. Eine vermutete Assoziation der Variablen „DLA-DRA1C₁“ sowie „DLA-DRA1C₂“ und „Erkrankung“ wurde durch den Test auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ abgelehnt (p-Werte s. Tab. 43). Beide Allele konnten nur für 28 Hunde berechnet werden, da bei 4 Hunden die Sequenziererergebnisse fehlerhaft waren und nicht ausgewertet werden konnten.

<i>Polymorphismus</i>	<i>SNP</i>	<i>Kranke Hunde</i>	<i>Gesunde Hunde</i>	<i>p-Wert (Fisher's exact Test)</i>	<i>Odds ratio</i>	<i>95% Konfidenzintervall</i>	<i>Niveau</i>
1	TT	4/12 (33,3%)	7/16 (43,8%)	0,705	0,643	0,136 – 3,042	0,05
	CC	5/12 (41,7%)	3/16 (18,8%)	0,231	3,096	0,565 – 16,959	0,05
	TC	3/12 (25%)	6/16 (37,5%)	0,687	0,556	0,106 – 2,9	0,05
2	AA	11/12 (91,7%)	9/16 (56,3%)	0,089	8,556	0,88 – 83,06	0,05
	GG	0/12 (0%)	1/16 (6,2%)	1,0	--	--	0,05
	AG	1/12 (8,3%)	6/16 (37,5%)	0,184	0,15	0,016 – 1,487	0,05

Tab. 43: p-Werte der im DLA-DRA1C Bereich lokalisierten Polymorphismen zur Prüfung der Nullhypothese; „--“ = alle Hunde wiesen dasselbe Allel auf; Berechnung von Odds Ratio nicht möglich.

Zusätzlich wurde eine Berechnung der DLA-DRA1C-Polymorphismen für die nur an IHA erkrankten Hunde durchgeführt. Auch hier wurde eine vermutete Assoziation der Variablen auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ abgelehnt (p-Werte s. Tab. 44).

<i>Polymorphismus</i>	<i>SNP</i>	<i>Kranke Hunde</i>	<i>Gesunde Hunde</i>	<i>p-Wert (Fisher's exact Test)</i>	<i>Odds ratio</i>	<i>95% Konfidenzintervall</i>	<i>Niveau</i>
1	TT	3/10 (30%)	8/18 (44,4%)	0,689	0,536	0,104 – 2,765	0,05
	CC	4/10 (40%)	4/18 (22,2%)	0,4	2,33	0,433 – 12,568	0,05
	TC	3/10 (30%)	6/18 (33,3%)	1,0	0,857	0,161 – 4,554	0,05
2	AA	9/10 (90%)	11/18 (61,1%)	0,194	5,727	0,59 – 55,602	0,05
	GG	0/10 (0%)	1/18 (5,6%)	1,0	--	--	0,05
	AG	1/10 (10%)	6/18 (33,3%)	0,364	0,22	0,02 – 2,187	0,05

Tab. 44: p-Werte der im DLA-DRA1C Bereich lokalisierten Polymorphismen zur Prüfung der Nullhypothese mit nur an IHA erkrankten Probanden; „--“ = alle Hunde wiesen dasselbe Allel auf: Berechnung von Odds Ratio nicht möglich.

Rassespezifität

DLA-DRA1C₁ zeigte eine deutliche Assoziation des vorliegenden Polymorphismus mit der Rasse, während DLA-DRA1C₂ keine Rassespezifität aufwies. Aufgrund dessen war eine Berechnung für DLA-DRA1C₁ innerhalb der einzelnen Rassen notwendig. Dabei wurden zwischen den kranken und gesunden Hunden innerhalb einer Rasse keine signifikanten Unterschiede gefunden ($\alpha = 0,05$).

3.2.1.4. Haplotyp-Status DLA-DRA1D

Der Bereich von 214bp umfasste Teile von Exon 4 und war über die ganze untersuchte Länge hinweg monomorph und homozygot.

Untersuchte Sequenz 5'-3':

TCATCATGGCTTTCCTGATGGGTCCTCAGGAATCATGGGCTGTCAAAGGTAAGTGCTGAGAGA
AACAAAACCTGGGATAGAAATTCTGAGAGCATTGGAGAGATAAATTGTAATATTTGCAAGACTG
TCTTTGAAGTGAAGGAAAAGTG

3.2.2. MHC-II: DLA-DRB

DLA-DRB befindet sich ebenfalls auf dem Chromosom 12 des caninen Genoms (Mellersh et al. 2000) und ist unmittelbar hinter DLA-DRA lokalisiert. In dieser Studie wurden die Exone 1 und 2 näher untersucht, da sie gemäß früheren Studien die wesentlichen Genvariationen beinhalten (Angles et al. 2005). Eine graphische Darstellung und Zuordnung der Loci siehe Abb. 10.

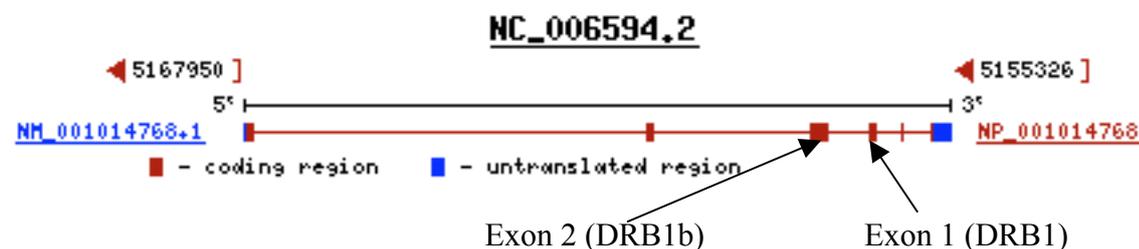


Abb. 10: DLA-DRB mit codierenden Bereichen und korrespondierenden Loci. Benennung der Loci s. Tab. 38.

3.2.2.1. Haplotyp-Status DLA-DRB1

Das Sequenzierprodukt von 545bp umfasste einen Polymorphismus im nicht-codierenden Bereich, der sich bei zwei Hunden heterozygot verhielt: DLA-DRB1₁ (R).

Untersuchte Sequenz (3'-5')

TCACCATGCTGGAAAACAGAAAGGACAGGGTGCAGGGGAGCAGTCAGGTGTCACCTCAGTGAAGAC
TGGGACCCTACTTTGGCCACATCCTAAATAACACTAACCAGAAAGAAATTCATTTTCATTGTCCTGGATT
GGGAA/TAATCTTGGTGATAAGAACCAATCAGCAACAGCAATATATTGCATCATCAGTTGCTGGTCA
GAGATTCAGTATGAAGAGCCTCTTCTGAAACTTTGATTTTGTTCATTGAAAGGATTGTTTAACTTA
ATACTTTAAAGATTTGATCCAGGTGTATATGAAACATTTTATTGGACCCCTATTGTGAGCCAGTTCT

GTGCTGGGCAGTGATGTGCACGAAAGTTTCGAGCCTTCTAAGAGTATTCATGTCTCTCTTGAAGACA
GAATTGTTTTGATCCATGTAATGTGTTTTTAGGAGCTGAGGACATGGAGAGTGATTGCAAGTCAAG
AACCTTTGCTCTGGGACCTTGCTAA

Es wurde eine Berechnung für das Allel durchgeführt. Eine vermutete Assoziation der Variablen „DLA-DRB1₁“ und „Erkrankung“ wurde durch den Test auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ abgelehnt (p-Werte s. Tab. 45).

Polymorphismus	SNP	Kranke Hunde	Gesunde Hunde	p-Wert (Fisher's exact Test)	Odds ratio	95% Konfidenzintervall	Niveau
1	GG	10/13 (76,9%)	16/16 (100%)	0,078	--	--	0,05
	AA	1/13 (7,7%)	0/16 (0%)	0,448	--	--	0,05
	GA	2/13 (15,4%)	0/16 (0%)	0,192	--	--	0,05

Tab. 45: p-Werte des im DLA-DRB1 Bereich lokalisierten Polymorphismus zur Prüfung der Nullhypothese; „--“ = alle Hunde wiesen dasselbe Allel auf: Berechnung von Odds Ratio nicht möglich.

Zusätzlich wurde eine Berechnung von DLA-DRB1₁ für die nur an IHA erkrankten Hunde durchgeführt. Auch hier wurde eine vermutete Assoziation der Variablen auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ abgelehnt (p-Werte s. Tab. 46).

Polymorphismus	SNP	Kranke Hunde	Gesunde Hunde	p-Wert (Fisher's exact Test)	Odds ratio	95% Konfidenzintervall	Niveau
1	GG	9/12 (75%)	17/17 (100%)	0,06	--	--	0,05
	AA	1/12 (8,3%)	0/17 (0%)	0,414	--	--	0,05
	GA	2/12 (16,7%)	0/17 (0%)	0,163	--	--	0,05

Tab. 46: p-Werte des im DLA-DRB1 Bereich lokalisierten Polymorphismus zur Prüfung der Nullhypothese mit nur an IHA erkrankten Probanden; „--“ = alle Hunde wiesen dasselbe Allel auf: Berechnung von Odds Ratio nicht möglich.

Rassespezifität

DLA-DRB1₁ zeigte eine deutliche Assoziation des vorliegenden Polymorphismus mit der Rasse. Aufgrund dessen war eine Berechnung für den DLA-DRB1₁-Polymorphismus innerhalb der einzelnen Rassen notwendig. Dabei wurde zwischen den kranken und gesunden Hunden innerhalb einer Rasse keine unterschiedlichen Polymorphismen gefunden, da der Polymorphismus innerhalb einer Rasse konstant war.

3.2.2.2. Haplotyp-Status DLA-DRB1b

Die Primerpaare für diesen Bereich entstammten den Untersuchungen von Angles et al. (2005). Das Produkt umfasste eine Länge von 270bp und wies 13 Polymorphismen im codierenden Bereich auf. Heterozygote Stellen waren bei DLA-DRB1b₁ (Y), DLA-DRB1b₂ (Y), DLA-DRB1b₆ (K) und DLA-DRB1b₇ (Y) vorhanden.

Untersuchte Sequenz 3'-5':

GATCCCCCGTCCCCACAGCACATTTCTTGGAGATGTTAAAGTCCGAGTGCT/C₁ATTTACCAA
CGGGACGGAGCGGGTTCGGTTCGTGGAAAGATACATC/C₂ATAACCGGGAGGAG/A₃A/T₄CG
TGCGCTTCGACAGCGACGTGGGGGAGTACCGGGCGGTACGGAGCTCGGGCGG/C₅CCG/T₆A
/T₇C₈CGCTGAGT/A₉C₈CTGGAAC/C₉G₁₀GCAG/C₁₁AAGGAG/C₁₂TCTTG/A₁₃AGCGGGCGCGG
GCCGCGGTGGACACCTACTGCAGACACAACCTACGGGGTGGGCGAGAGCTTCACGGTGCAGC
GGCGAGGTGAGCGCAGCGGGCGCCTGGTGTGCTGAGGTGTGTGACACA

Nach Zuordnung des DLA-DRB (Exon 2) zur bestehenden Nomenklatur ergaben sich für die Cocker Spaniel die DLA-DRB-Allele DRB1b*00601 oder DRB1b*00901 und für die Irish Setter die Allele DRB1b*00103 oder DRB1b*00101. 3 Cocker Spaniel zeigten am DRB1b

eine Heterozygotie (DRB1b*00601/DRB1b*00901), alle anderen Hunde waren homozygot. Es wurde eine Berechnung für alle Allele durchgeführt. Eine vermutete Assoziation der Variablen „DLA-DRB1b*00601“, „DLA-DRB1b*00901“, „DLA-DRB1b*00103“ sowie „DLA-DRB1b*00101“ und „Erkrankung“ wurde durch den Test auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ abgelehnt (p-Werte s. Tab. 47).

<i>Allel</i>	<i>SNP</i>	<i>Kranke Hunde</i>	<i>Gesunde Hunde</i>	<i>p-Wert (Fisher's exact Test)</i>	<i>Odds ratio</i>	<i>95% Konfidenzintervall</i>	<i>Niveau</i>
00601	ja	8/15 (53,3%)	23/37 (62,2%)	0,756	0,7	0,21 – 2,34	0,05
	nein	7/15 (46,7%)	14/37 (37,8%)		1,44	0,43 – 4,83	
00901	ja	1/15 (6,7%)	2/37 (5,4%)	1,0	1,25	0,11 – 14,92	0,05
	nein	14/15 (93,3%)	35/37 (94,6%)		0,8	0,07 – 9,55	
00103	ja	7/15 (46,7%)	13/37 (35,1%)	0,534	1,62	0,48 – 5,46	0,05
	nein	8/15 (53,3%)	24/37 (64,9%)		0,62	0,18 – 2,09	
00101	ja	1/15 (6,7%)	9/37 (24,3%)	0,247	0,22	0,03 – 1,93	0,05
	nein	14/15 (93,3%)	28/37 (75,7%)		4,5	0,52 – 39,15	

Tab. 47: p-Werte der DLA-DRB1b–Allele zur Prüfung der Nullhypothese.

Eine weitere Berechnung wurde durchgeführt, um eine mögliche Assoziation zwischen DRB-Allelen und der caninen IHA zu erkennen. Sie wurde ebenfalls mit einem exakten Test nach Fisher durchgeführt, unter Annahme der Nullhypothese: „Es besteht keine Assoziation zwischen dem DRB1b-Allel X und dem Auftreten der IHA in der Probandengruppe“. Die Nullhypothese wurde auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ angenommen (Tab. 48).

<i>Allel</i>		<i>Kranke Hunde</i>	<i>Gesunde Hunde</i>	<i>p-Wert (Fisher's exact Test)</i>	<i>Odds ratio</i>	<i>95% Konfidenzintervall</i>	<i>Niveau</i>
00601	ja	6/11 (54,5%)	25/41 (61%)	0,739	0,77	0,2 – 2,94	0,05
	nein	5/11 (45,5%)	16/41 (39%)		1,3	0,34 – 4,99	
00901	ja	1/11 (9,1%)	2/41 (4,9%)	0,518	1,95	0,16 – 23,73	0,05
	nein	10/11 (90,9%)	39/41 (95,1%)		0,51	0,04 – 6,24	
00103	ja	5/11 (45,5%)	15/41 (36,6%)	0,73	1,44	0,38 – 5,55	0,05
	nein	6/11 (54,5%)	26/41 (63,4%)		0,69	0,18 – 2,66	
00101	ja	1/11 (9,1%)	9/41 (22%)	0,668	0,36	0,04 – 3,16	0,05
	nein	10/11 (90,9%)	32/41 (78%)		2,81	0,32 – 25	

Tab. 48: p-Werte der DLA-DRB1b–Allele zur Prüfung der Nullhypothese in der Gruppe „IHA-krank“.

Rassespezifität

DLA-DRB1b zeigte eine deutliche Assoziation der Polymorphismen mit der Rasse. Aufgrund dessen war eine Berechnung für DLA-DRB1b innerhalb der einzelnen Rassen notwendig. Für alle DRB1b-Allele konnte keine Assoziation mit der Erkrankung festgestellt werden. DRB1b*00601 war eine Konstante und nur beim Cocker Spaniel zu finden, so dass eine Berechnung nicht durchgeführt werden konnte. Tab. 49 zeigt alle berechneten p-Werte und die Verteilung der Allele unter den Rassen, getrennt nach kranken und gesunden Hunden.

<i>Allel</i>		<i>Rasse</i>	<i>Kranke Hunde</i>	<i>Gesunde Hunde</i>	<i>p-Wert (Fisher's exact Test)</i>	<i>Odds ratio</i>	<i>95% Konfidenzintervall</i>	<i>Niveau</i>
00601	ja	Cocker	8/8 (100%)	23/23 (100%)	--	--	--	--
	nein	Spaniel	0/8 (0%)	0/23 (0%)	--	--	--	--
	ja	Irish	0/7 (0%)	0/14 (0%)	--	--	--	--
	nein	Setter	7/7 (100%)	14/14 (100%)	--	--	--	--
00901	ja	Cocker	1/8 (12,5%)	2/23 (8,7%)	1,0	1,5	0,12 – 19,18	0,05
	nein	Spaniel	7/8 (87,5%)	21/23 (91,3%)	--	0,67	0,05 – 8,52	0,05
	ja	Irish	0/7 (0%)	0/14 (0%)	--	--	--	--
	nein	Setter	7/7 (100%)	14/14 (100%)	--	--	--	--
00103	ja	Cocker	0/8 (0%)	0/23 (0%)	--	--	--	--
	nein	Spaniel	8/8 (100%)	23/23 (100%)	--	--	--	--
	ja	Irish	7/7 (100%)	13/14 (92,9%)	1,0	--	--	--
	nein	Setter	0/7 (0%)	1/14 (7,1%)	--	--	--	--
00101	ja	Cocker	0/8 (0%)	0/23 (0%)	--	--	--	--
	nein	Spaniel	8/8 (100%)	23/23 (100%)	--	--	--	--
	ja	Irish	1/7 (14,3%)	9/14 (64,3%)	0,063	0,093	0,01 – 1,0	0,05
	nein	Setter	6/7 (85,7%)	5/14 (35,7%)	--	10,8	1,0 – 117	0,05

Tab. 49: p-Werte und Odds Ratio für eine mögliche Assoziation von Allelen und Erkrankung nach Rasse getrennt; „--“ = alle Hunde wiesen dasselbe Allel auf: Berechnung von Odds Ratio und bestimmter p-Werte nicht möglich.

3.2.3. MHC-II: DLA-DQA

DLA-DQA ist wie alle anderen MHC-II Gene auf dem Chromosom 12 des caninen Genoms lokalisiert (Mellersh et al. 2000), in unmittelbarer Nachbarschaft zu DLA-DQB und DLA-DRB. Insgesamt wurden mehr als 800bp von DLA-DQA analysiert, von den codierenden Bereichen wurden die Exone 1 und 2 als die hoch polymorphen Stellen sequenziert. Der Aufbau des Gens und die untersuchten Areale sind in Abb. 11 dargestellt.

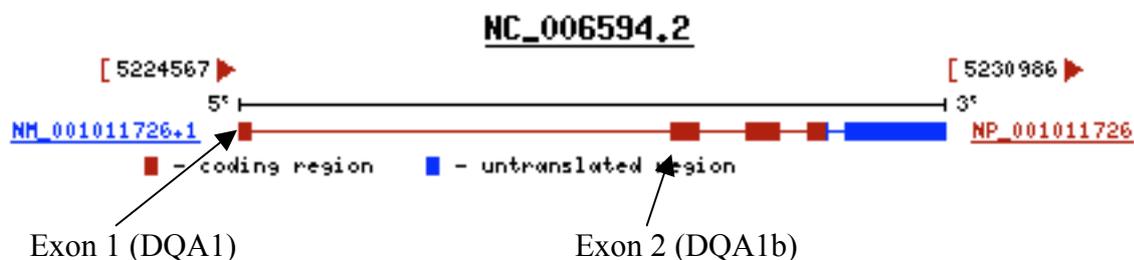


Abb. 11: DLA-DQA mit codierenden Bereichen und entsprechenden Loci. Benennung der Loci s. Tab. 38.

3.2.3.1. Haplotyp-Status DLA-DQA1

Insgesamt wurden 2 Polymorphismen in einem Bereich von 581bp bestimmt, davon befand sich einer im codierenden Bereich des Exon 1 und einer im flankierenden Intronbereich. Beide Polymorphismen waren heterozygot: DLA-DQA1₁ (W) und DLA-DQA1₂ (Y).

Untersuchter Bereich 5'-3':

TTGGG *T/A*,GTCTTTAGATTCCCCTTTCTGTTGGGTCCTCACCTAGTTCTACAATTCAGAACAGCAAG
TGTGGAGACCGCACGGAGAAGAGGATGATCCTAAACAGAGTTCTGATTCTGGGGACCCTCAT *C/*
T,CTGACTATTATGATGAGCCCCTCTGGAGGTGAAGAGATTGTGGGTGAGTGACACCTGAGGG
ATATGGGGACTAGACTAGG

Es wurde eine Berechnung für beide Allele durchgeführt. Eine vermutete Assoziation der Variablen „DLA-DQA1₁“ sowie „DLA-DQA1₂“ und „Erkrankung“ wurde durch den Test auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ abgelehnt (p-Werte s. Tab. 50).

<i>Polymorphismus</i>	<i>SNP</i>	<i>Kranke Hunde</i>	<i>Gesunde Hunde</i>	<i>p-Wert (Fisher's exact test)</i>	<i>Odds ratio</i>	<i>95% Konfidenzintervall</i>	<i>Niveau</i>
1	TT	13/14 (92,9%)	16/18 (88,9%)	1,0	1,63	0,13 – 19,99	0,05
	AA	1/14 (7,1%)	0/18 (0%)	0,438	--	--	0,05
	TA	0/14 (0%)	2/18 (11,1%)	0,492	--	--	0,05
2	CC	13/14 (92,9%)	18/18 (100%)	0,437	--	--	0,05
	TC	1/14 (7,1%)	0/18 (0%)	--	--	--	--

Tab. 50: p-Werte der im DLA-DQA1 Bereich lokalisierten Polymorphismen zur Prüfung der Nullhypothese; „--“ = alle Hunde wiesen dasselbe Allel auf: Berechnung von Odds Ratio nicht möglich.

Eine weitere Berechnung wurde durchgeführt, um eine mögliche Assoziation zwischen DQA1-Allelen und der canine IHA zu erkennen. Sie wurde ebenfalls mit einem exakten Test nach Fisher durchgeführt unter Annahme der Nullhypothese: „Es besteht keine Assoziation zwischen dem DQA-Allel X und dem Auftreten der IHA in der Probandengruppe“. Die Nullhypothese wurde auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ angenommen (Tab. 51).

<i>Polymorphismus</i>	<i>SNP</i>	<i>Kranke Hunde</i>	<i>Gesunde Hunde</i>	<i>p-Wert (Fisher's exact test)</i>	<i>Odds ratio</i>	<i>95% Konfidenzintervall</i>	<i>Niveau</i>
1	TT	11/12 (91,7%)	18/20 (90%)	1,0	1,22	0,1 – 15,11	0,05
	AA	1/12 (8,3%)	0/20 (0%)	0,375	--	--	0,05
	TA	0/12 (25%)	2/20 (10%)	0,516	--	--	0,05
2	CC	11/12 (91,7%)	20/20 (100%)	0,375	--	--	0,05
	TC	1/12 (8,3%)	0/20 (0%)	--	--	--	--

Tab. 51: p-Werte der DLA-DQA1–Allele zur Prüfung der Nullhypothese in der Gruppe "IHA-krank"; „--“ = alle Hunde wiesen dasselbe Allel auf: Berechnung von Odds Ratio nicht möglich.

Rassespezifität

DLA-DQA1₁ und DLA-DQA1₂ zeigten eine deutliche Assoziation mit der Rasse auf. Aufgrund dessen war eine Berechnung für diese Polymorphismen innerhalb der einzelnen Rassen notwendig. Dabei wurden zwischen den kranken und gesunden Hunden innerhalb einer Rasse keine signifikanten Unterschiede gefunden. DLA-DQA1₂ war eine Konstante innerhalb der Rassen und wurde daher nicht berechnet.

3.2.3.2. Haplotyp-Status DLA-DQA1b

Das Primerpaar entstammte den Untersuchungen von Angles et al. (2005). Das PCR-Produkt mit der Länge von 246bp umfasste 5 Polymorphismen im codierenden Bereich und eine Deletion bei 13 Hunden. Eine Heterozygotie der Polymorphismen wurde an DLA-DQA1b₄ (Y) und DLA-DQA1b₅ (M) gefunden.

Untersuchter Bereich 5'-3':

```
AGAGACCCAACCCACTGTCTTTGCTCCCTGATTTGTTGCCACAGTTTGTTCTGTCACCTGGTTGA
ATAAGTTCTTTTCTCCCTCTGTTTCTGCTTCTGCTCCTCACCCTGCTGCTCAGCTGACCATGTT
GCCA/T1ACTACGGCATAAATGTCTACCAGTCTTACGGTCCCTCTGGCCAGT2A/T2CACCCATGA
ATTTGATGGCGATGAGGAGTTCTACGTGGACCTGGAGAAGAAGGAAACTGTCTGGCGGCTGC
CTGTGTTTAGCACATTTA3G/C3AAGTTTTGACCCACAGGGTGCACCTGAGAAACTGGCTATAA4T/
C4AAAAACAAACTTGAACATCATGACTAAAAGGTCCAAC5C/A5AAACTGCTGCTACCAATGG6G6T
ATGTGTCTACCATTTCTG
```

Nach Zuordnung des DLA-DQA (Exon 2) zur bestehenden Nomenklatur ergeben sich für die Cocker Spaniel die Allele DQA1b*005011 oder DQA1b*00101 und für die Irish Setter das Allel DQA1b*00101. 3 Cocker Spaniel zeigten eine Heterozygotie (DQA1b*005011 / DQA1b*00101), alle anderen Hunde waren homozygot.

Es wurde eine Berechnung für alle Allele durchgeführt. Eine vermutete Assoziation der Variablen „DLA-DQA1b*005011“ sowie „DLA-DQA1b*00101“ und „Erkrankung“ wurde durch den Test auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ abgelehnt (p-Werte s. Tab. 52).

<i>Allel</i>		<i>Kranke Hunde</i>	<i>Gesunde Hunde</i>	<i>p-Wert (chi²)</i>	<i>Odds ratio</i>	<i>95% Konfidenzintervall</i>	<i>Niveau</i>
005011	ja	8/15 (53,3%)	23/37 (62,2%)	0,557	0,7	0,21 – 2,34	0,05
	nein	7/15 (46,7%)	14/37 (37,8%)		1,44	0,43 – 4,83	
00101	ja	8/15 (53,3%)	16/37 (43,2%)	0,508	1,5	0,45 – 5,01	0,05
	nein	7/15 (46,7%)	21/37 (56,8%)		0,67	0,2 – 2,23	

Tab. 52: p-Werte der DLA-DQA1b-Allele zur Prüfung der Nullhypothese.

Eine weitere Berechnung wurde durchgeführt, um eine mögliche Assoziation zwischen DQA-Allellen und der canine IHA zu erkennen. Sie wurde ebenfalls mit einem χ^2 -Test durchgeführt unter Annahme der Nullhypothese: „Es besteht keine Assoziation zwischen dem DQA1b-Allel X und dem Auftreten der IHA in der Probandengruppe“. Die Nullhypothese wurde auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ angenommen (Tab. 53).

<i>Allel</i>		<i>Kranke Hunde</i>	<i>Gesunde Hunde</i>	<i>p-Wert (chi²)</i>	<i>Odds ratio</i>	<i>95% Konfidenzintervall</i>	<i>Niveau</i>
005011	ja	6/11 (54,5%)	25/41 (61%)	0,7	0,77	0,2 – 2,94	0,05
	nein	5/11 (45,5%)	16/41 (39%)		1,3	0,34 – 4,985	
00101	ja	6/11 (54,5%)	18/41 (43,9%)	0,53	1,53	0,403 – 5,842	0,05
	nein	5/11 (45,5%)	23/41 (56,1%)		0,65	0,171 – 2,485	

Tab. 53: p-Werte der DLA-DQA1b-Allele zur Prüfung der Nullhypothese in der Gruppe „IHA-krank“.

Rassespezifität

DLA-DQA1b zeigte eine deutliche Assoziation der vorliegenden Polymorphismen mit der Rasse. Aufgrund dessen war eine Berechnung für DLA-DQA1b innerhalb der einzelnen Rassen notwendig. Für beide Allele konnte keine Assoziation mit der Erkrankung festgestellt werden. DQA1b*005011 konnte nicht berechnet werden, da sie innerhalb der Cocker Spaniel konstant war und bei den Irish Settern nicht vorkam. Für DQA1b*00101 musste die Nullhypothese angenommen werden.

3.2.4. MHC-II: DLA-DQB

DLA-DQB ist wie alle anderen MHC-II Gene auf dem Chromosom 12 des caninen Genoms lokalisiert (Mellersh et al. 2000), die codierende Bereiche sind in Abb. 12 veranschaulicht. Es wurden die Exone 1 und 2 als die hoch polymorphen codierenden Bereiche untersucht, und insgesamt 2 Primerpaare für die Darstellung von ca. 1000 bp dieses Kandidatengens verwendet.

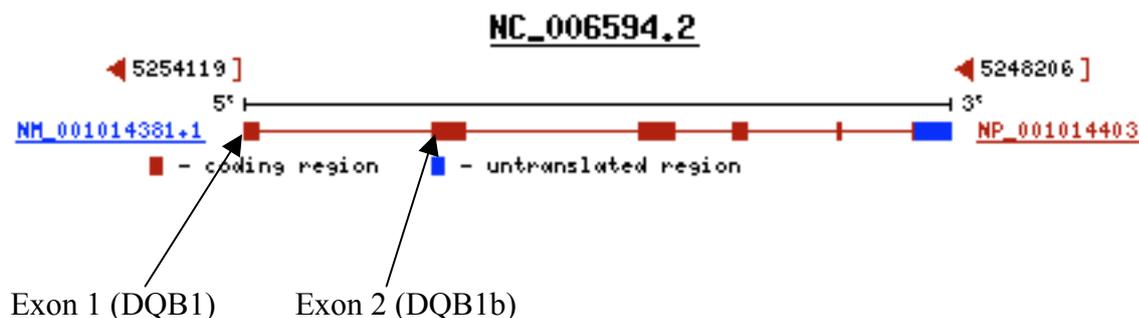


Abb 12: Codierende Bereiche des DLA-DQB mit entsprechenden Loci. Benennung der Loci s. Tab. 38.

3.2.4.1. Haplotyp-Status DLA-DQB1

Es wurden insgesamt 5 Polymorphismen im untersuchten 1018bp-Fragment entdeckt, die sich alle im nicht-codierenden Bereich befanden. Sämtliche Polymorphismen waren heterozygot: DLA-DQB1₁ (Y), DLA-DQB1₂ (M), DLA-DQB1₄ (M), DLA-DQB1₅ (R) und DLA-DQB1₆ (R). Drei Rhodesian Ridgebacks wiesen zusätzlich eine Insertion von 4 bp auf (DLA-DQB1₃).

Untersuchter Bereich 3'-5':

```
GTGGACATGAGAATGTCACAGAGCTCTTCCCCNAAGAGAGGAACTGTGATAAAAGTCTATATT
CTGAGATCATAGAACCTTCCACACTCCCACAAAAGGT~CCTTCAGAGCCTGTCCCCAGAGCAGT
GGCCCTGGGGAGCAGGTGTCTGCACTTACGTGGAGAGTCTCTGCCCTCAGCCACTGGGATGCT
CAGCACCACCAGGATCATCATCACAGCTGCTGTCCAGAAGCCTCGGGGGATGCACAGAGTCA
TCTTCCCAGACATAACTGAGAACAAAAGGAAAAAGTTGGTAGTCAACACAGCTCCTACCTGGTGGC
TCTGAAGTACTCACTTCAAAGAATAAAAATCTGTAAAAGCTTCCATCCATAGTAGGATTGGAGAGT
TCCTAGGGAGGGAACCAATCAGCACCCGGAGCTGAAGTACCTCACCTGTCTC/T,GGGCAGACATTC
GTTATGAAGGTTTCTCAGTCCAGTGCCTGGCGCTGTGTCTTATCAGATTACACTAGATGAACACTTG
AGGTGAC/A2GATTTTCTCCTA/GTTA3TAGAAGACCTAAAGATTGAATGCCTTAGGGGTTTAAGAAAC
TGAACAAAAAATGACTCGAGAGTAGACATCTTTGTGCAATTTTGGATTATTTAGTCTTATACCTTT
GGTTTTTAGTAAATAAGTGGGATCTATTTCAGGGAAGAGAAAATT/A/C4TTGTCACAGAGTTGTTCA
CTTCTATTGTCTTAGACACTCTGAGGAGCCTTCAGTCACGCTGGGAAGAGCATAGTTCTTAGGAGG
AAATGGTTTTGAATTGCA/A/G5TTTTACCACTAATAGGCTTTATGAGAGCAAATTACTGAGCCTCTTT
TTGCCTCAGGCTTCTCTTGGTAAAATGTGGATCACGTTGCCTGCATTGTATATCCAGG/A6TCATTAT
ATATACGAACTAAGA
```

Es wurde eine Berechnung für alle Polymorphismen durchgeführt. Eine vermutete Assoziation der Polymorphismen des DLA-DQB1 und „Erkrankung“ wurde durch den Test auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ abgelehnt (Tab. 54). Aufgrund teilweise fehlerhafter Sequenzierungsergebnisse konnten die Daten für einige Hunde nicht ausgewertet werden. Wie viele Hunde mit in die Berechnung aufgenommen wurden, ist jeweils in Tab. 54 angegeben.

Polymorphismus	SNP	Kranke Hunde	Gesunde Hunde	p-Wert (Fisher's exact Test)	Odds ratio	95% Konfidenzintervall	Niveau
1	TT	4/12 (33,3%)	5/18 (27,8%)	1,0	1,3	0,27 – 6,33	0,05
	CC	6/12 (50%)	11/18 (61,1%)	0,711	0,64	0,15 – 2,78	0,05
	TC	2/12 (16,7%)	2/18 (11,1%)	1,0	1,6	0,19 – 13,24	0,05
2	AA	4/12 (33,3%)	5/17 (29,4%)	1,0	1,2	0,25 – 5,89	0,05
	CC	7/12 (58,3%)	9/17 (52,9%)	1,0	1,24	0,28 – 5,53	0,05
	AC	1/12 (8,3)	3/17 (17,7%)	0,622	0,42	0,04 – 4,66	0,05
4	AA	10/13 (76,9%)	18/18 (100%)	0,064	--	--	0,05
	CC	1/13 (7,7%)	0/18 (0%)	0,419	--	--	0,05
	AC	2/13 (15,4%)	0/18 (0%)	0,168	--	--	0,05
5	GG	8/13 (61,5%)	5/18 (27,8%)	0,079	4,16	0,91 – 19,03	0,05
	AA	4/13 (30,8%)	12/18 (66,7%)	0,073	0,22	0,05 – 1,03	0,05
	GA	1/13 (7,7%)	1/18 (5,6%)	1,0	1,42	0,08 – 24,95	0,05
6	AA	6/13 (46,2%)	4/15 (26,7%)	0,433	2,36	0,49 – 11,45	0,05
	GG	6/13 (46,2%)	8/15 (53,3%)	1,0	0,75	0,17 – 3,33	0,05
	GA	1/13 (7,7%)	3/15 (20%)	0,6	0,33	0,03 – 3,68	0,05

Tab. 54: p-Werte der in DLA-DQB1 lokalisierten Polymorphismen zur Prüfung der Nullhypothese; „--“ = alle Hunde wiesen dasselbe Allel auf: Berechnung von Odds Ratio nicht möglich.

Eine weitere Berechnung wurde durchgeführt, um eine mögliche Assoziation zwischen DQB1-Allelen und der caninen IHA zu erkennen. Sie wurde mit einem exakten Test nach Fisher durchgeführt unter Annahme der Nullhypothese: „Es besteht keine Assoziation zwischen dem DQB-Allel X und dem Auftreten der IHA in der Probandengruppe“. Für die Variablen „DLA-DQB4“ und „Erkrankung“ sowie „DLA-DQB5“ und „Erkrankung“ wurde

die vermutete Assoziation durch den Test auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ bestätigt. Beim Polymorphismus „DLA-DQB₄“ war deutlich, dass bei den nicht erkrankten Hunden nur das Allel AA vorkam, während bei den an IHA erkrankten Hunden auch die Allele CC und AC gefunden worden sind. Beim Polymorphismus „DLA-DQB₅“ zeigte sich, dass Hunde, die das Allel GG trugen, eine 8-mal höhere Chance hatten, an der IHA zu erkranken, als Hunde, die nicht das Allel GG trugen. Für alle anderen Polymorphismen wurde die Nullhypothese auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ angenommen (p-Werte s. Tab. 55).

Polymorphismus	SNP	Kranke Hunde	Gesunde Hunde	p-Wert (Fisher's exact Test)	Odds ratio	95% Konfidenzintervall	Niveau
1	TT	4/10 (40%)	5/20 (25%)	0,431	2	0,396 – 10,108	0,05
	CC	5/10 (50%)	12/20 (60%)	0,705	0,667	0,145 – 3,075	0,05
	TC	1/10 (10%)	3/20 (15%)	1,0	0,63	0,057 – 6,96	0,05
2	AA	4/10 (40%)	5/19 (26,3%)	0,675	1,867	0,367 – 9,488	0,05
	CC	6/10 (60%)	10/19 (52,6%)	1,0	1,35	0,286 – 6,38	0,05
	AC	0/10 (0%)	4/19 (21,1%)	0,268	--	--	0,05
4	AA	8/11 (72,7%)	20/20 (100%)	0,037	--	--	0,05
	CC	1/11 (9%)	0/20 (0%)	0,355	--	--	0,05
	AC	2/11 (18,2%)	0/20 (0%)	0,118	--	--	0,05
5	GG	8/11 (72,7%)	5/20 (25%)	0,021	8	1,508 – 42,45	0,05
	AA	3/11 (27,3%)	13/20 (65%)	0,066	0,02	0,04 – 1,014	0,05
	GA	0/11 (0%)	2/20 (10%)	0,527	--	--	0,05
6	AA	5/11 (45,5%)	5/17 (29,4%)	0,444	2	0,412 – 9,712	0,05
	GG	5/11 (45,5%)	9/17 (52,9%)	1,0	0,74	0,162 – 3,393	0,05
	GA	1/11 (9%)	3/17 (17,7%)	1,0	0,467	0,042 – 5,166	0,05

Tab. 55: p-Werte der DLA-DQB1–Allele zur Prüfung der Nullhypothese in der Gruppe "IHA-krank"; „--“ = alle Hunde wiesen dasselbe Allel auf; Berechnung von Odds Ratio nicht möglich.

Rassespezifität

Alle DLA-DQB1-Polymorphismen zeigten eine deutliche Assoziation mit der Rasse. Aufgrund dessen war eine Berechnung für alle Polymorphismen innerhalb der einzelnen Rassen notwendig. Dabei wurden zwischen den kranken und gesunden Hunden innerhalb einer Rasse keine unterschiedliche Polymorphismen gefunden, da für die Allele DLA-DQB1_{1,2,5,6} alle p-Wert $> \alpha$ waren und somit die Nullhypothese bestätigt wurde. DLA-DQB1₃₊₄ waren konstant innerhalb der Rassen und wurden daher nicht berechnet.

Bei den an IHA erkrankten Hunden wurde die Berechnung innerhalb der Rasse zur Prüfung der signifikanten Polymorphismen durchgeführt, um rassenspezifische Allele auszuschließen. Es stellte sich heraus, dass die vermutete Assoziation der Polymorphismen „DLA-DQB₄“ sowie „DLA-DQB₅“ und „IHA“ verworfen werden musste, wenn die Berechnung innerhalb der jeweiligen Rasse erfolgte.

3.2.4.2. Haplotyp-Status DLA-DQB1b

Das Primerpaar entstammte den Untersuchungen von Angles et al. (2005). Das PCR-Produkt mit der Länge von 267bp umfasste 32 Polymorphismen im codierenden Bereich. Heterozygote Stellen waren an DQB1b₄ (K), DQB1b₅ (R), DQB1b₆ (K), DQB1b₇ (R), DQB1b₈ (K), DQB1b₉ (R), DQB1b₁₂ (W), DQB1b₁₃ (S), DQB1b₁₄ (W), DQB1b₁₅ (S), DQB1b₁₆ (R), DQB1b₁₇ (S), DQB1b₁₈ (S, M), DQB1b₁₉ (W), DQB1b₂₀ (S), DQB1b₂₁ (W), DQB1b₂₂ (S), DQB1b₂₃ (R), DQB1b₂₄ (R), DQB1b₂₅ (K, R), DQB1b₂₆ (R), DQB1b₂₇ (M), DQB1b₂₉ (W), DQB1b₃₀ (K), DQB1b₃₁ (W), DQB1b₃₂ (M) vorzufinden.

TCACTGGCCCGGCTGTCTCCCCGCAGAGGATTCGTGT**A/T**₁CCAGT**T/A**₂TAAG**G/T**₃**G/C/T**₄CGAGT
GCTATTTACCAACGGGACGGAGCGGGTGC**G/C**₅TCTCTG**A/G**₆**C/G/T**₇**A/G/A**₈**T/G**₉**A/G**₉CATCTAT

AACCGGGAGGAG/C/T₁₀A/T₁₁CGTGCGCTTCGACAGCGACGTGGGGGAGT/A/T₁₂CCGGGCGGTCA
 CGGAGCTCGGGCGGCCG/C₁₃G/A/T₁₄CGCTGAGTACTGGAACG/C₁₅GG/A₁₆CAGAAGGAG/C₁₇C/G/A
 18T/A₁₉C/G₂₀T/A₂₁TGGAG/C₂₂CG/A₂₃G/A/G₂₄G/T/A₂₅G/A₂₆CGGGCCG/A/C₂₇GG/C₂₈TGGACACGGTGTGC
 AGACACAACACTACGGG/A/T₂₉G/T₃₀GGAAGAGCTC/A/T₃₁C/A₃₂CACGTTGCAGCGGGCAGGTGAGCG
 CACCCTCCTCGCCCCCGGGGCTCCCCACCCAGGTCCCC

Die Polymorphismen wurden nach der Nomenklatur des ISAG DLA Nomenclature Committees benannt. Bei den Cocker Spaniern wurden die Haplotypen DQB1b*00701, DQB1b*008011, DQB1b*00201 und DQB1b*01201 vorgefunden. Beim Setter war nur der Haplotyp DQB1b*00201 vertreten. Bei 4 Cocker Spaniern war der Haplotyp heterozygot (3 mit DQB1b*00701/ DQB1b*008011 und 1 mit DQB1b*00701/ DQB1b*02001), bei allen anderen homozygot vorzufinden.

Es wurde eine Berechnung für alle Allele durchgeführt. Eine vermutete Assoziation aller DLA-DQB-Allele und „Erkrankung“ wurde durch den Test auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ abgelehnt (p-Werte s. Tab. 56). Für diese Berechnung wurde bei den Gruppen ein χ^2 -Test verwendet, in denen die Probandenmenge immer mehr als 5 betrug. Bei allen anderen Gruppen wurde ein exakter Test nach Fisher eingesetzt.

<i>Allel</i>		<i>Kranke Hunde</i>	<i>Gesunde Hunde</i>	<i>p-Wert (Fisher's exact Test)</i>	<i>Odds ratio</i>	<i>95% Konfidenzintervall</i>	<i>Niveau</i>
00701	ja	6/15 (40%)	23/37 (62,2%)	0,145 (χ^2 -Test)	0,4	0,12 – 1,39	0,05
	nein	9/15 (60%)	14/37 (37,8%)		2,5	0,72 – 8,42	
00201	ja	7/15 (46,7%)	14/37 (37,8%)	0,557 (χ^2 -Test)	1,4	0,43 – 4,83	0,05
	nein	8/15 (53,3%)	23/37 (62,2%)		0,7	0,21 – 2,34	
01201	ja	2/15 (13,3%)	0/37 (0%)	0,079	--	--	0,05
	nein	13/15 (86,7%)	37/37 (100%)		--	--	
008011	ja	1/15 (6,7%)	2/37 (5,4%)	1,0	1,25	0,1 – 14,9	0,05
	nein	14/15 (93,3%)	35/37 (94,6%)		0,8	0,1 – 9,5	
02001	Ja	0/15 (0%)	1/37 (2,7%)	1,0	--	--	0,05
	nein	15/15 (100%)	36/37 (97,3%)		--	--	

Tab. 56: p-Werte der DLA-DQA1b-Allele zur Prüfung der Nullhypothese; „--“ = alle Hunde wiesen dasselbe Allel auf: Berechnung von Odds Ratio nicht möglich.

Eine weitere Berechnung wurde durchgeführt, um eine mögliche Assoziation zwischen DQB1b-Allelen und der caninen IHA zu erkennen. Sie wurde ebenfalls mit einem exakten Test nach Fisher durchgeführt unter Annahme der Nullhypothese: „Es besteht keine Assoziation zwischen dem DQB1b-Allel X und dem Auftreten der IHA in der Probandengruppe“. Die Nullhypothese wurde für „DLA-DQB1b*00701“, „DLA-DQB1b*008011“, „DLA-DQB1b*02001“, sowie „DLA-DQB1b*00201“ auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ angenommen (p-Werte s. Tab. 57). Nur für DLA-DQB1b*01201 wurde die Nullhypothese aufgrund $p = 0,041$ verworfen und ein Zusammenhang mit der Erkrankung bestätigt. In der IHA-Gruppe wurde das Allel DQB1b*01201 nur bei kranken Hunden vorgefunden.

<i>Allel</i>		<i>Kranke Hunde</i>	<i>Gesunde Hunde</i>	<i>p-Wert (Fisher's exact Test)</i>	<i>Odds ratio</i>	<i>95% Konfidenzintervall</i>	<i>Niveau</i>
00701	ja	4/11 (36,4%)	25/41 (61%)	0,182	0,4	0,1 – 1,45	0,05
	nein	7/11 (63,6%)	16/41 (39%)		2,73	0,69 – 10,86	
00201	ja	5/11 (45,5%)	16/41 (39%)	0,739	1,3	0,34 – 4,99	0,05
	nein	6/11 (54,5%)	25/41 (61%)		0,77	0,2 – 2,94	
01201	ja	2/11 (18,2%)	0/41 (0%)	0,041	--	--	0,05

	nein	9/11 (81,8%)	41/41 (100%)		--	--	
008011	ja	1/11 (9,1%)	2/41 (4,9%)	0,518	1,95	0,16 – 23,72	0,05
	nein	10/11 (90,9%)	39/41 (95,1%)				
02001	ja	0/11 (0%)	1/41 (2,4%)	1,0	--	--	0,05
	nein	11/11 (100%)	40/41 (97,6%)				

Tab. 57: p-Werte der DLA-DQA1b–Allele zur Prüfung der Nullhypothese in der Gruppe „IHA-krank“; „--“ = alle Hunde wiesen dasselbe Allel auf: Berechnung von Odds Ratio nicht möglich.

Rassespezifität

DLA-DQB1b zeigte eine deutliche Assoziation der vorliegenden Polymorphismen mit der Rasse. Aufgrund dessen war eine Berechnung für DLA-DQB1b innerhalb der einzelnen Rassen notwendig. Dabei wurde für das Allel DQB*01201 bei den Cocker Spaniern die vermutete Assoziation mit der Variablen „Erkrankung“ durch den Test auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ verworfen ($p = 0,06$). Auch für die übrigen DQB-Allelen konnte keine Assoziation mit der Erkrankung festgestellt werden. Alle Irish Setter wiesen nur das Allel DQB*00201 auf. Dadurch war es eine Konstante und konnte nicht berechnet werden. Tab. 58 zeigt die Zuordnung der Allele zu den erkrankten Hunden, nach Rassen getrennt.

<i>Allel</i>		<i>Rasse</i>	<i>Kranke Hunde</i>	<i>Gesunde Hunde</i>	<i>p-Wert (Fisher's exact Test)</i>	<i>Odds ratio</i>	<i>95% Konfidenzintervall</i>	<i>Niveau</i>
00701	ja	Cocker Spaniel	6/8 (75%)	23/23 (100%)	0,06	--	--	0,05
	nein		2/8 (25%)	0/23 (0%)				
	ja	Irish Setter	0/7 (0%)	0/14 (0%)	--	--	--	--
	nein		7/7 (100%)	14/14 (100%)				
00201	ja	Cocker Spaniel	0/8 (0%)	0/23 (0%)	--	--	--	--
	nein		8/8 (100%)	23/23 (100%)				
	ja	Irish Setter	7/7 (100%)	14/14 (100%)	--	--	--	--
	nein		0/7 (0%)	0/14 (0%)				
01201	ja	Cocker Spaniel	2/8 (25%)	0/23 (0%)	0,06	--	--	0,05
	nein		6/8 (75%)	23/23 (100%)				
	ja	Irish Setter	0/7 (0%)	0/14 (0%)	--	--	--	--
	nein		7/7 (100%)	14/14 (100%)				
008011	ja	Cocker Spaniel	1/8 (12,5%)	2/23 (8,7%)	1,0	1,5	0,12 – 19,18	0,05
	nein		7/8 (87,5%)	21/23 (91,3%)				
	ja	Irish Setter	0/7 (0%)	0/14 (0%)	--	--	--	--
	nein		7/7 (100%)	14/14 (100%)				
02001	ja	Cocker Spaniel	0/8	1/23	1,0	--	--	0,05
	nein		8/8	22/23				
	ja	Irish Setter	0/7	0/14	--	--	--	--
	nein		7/7	14/14				

Tab. 58: p-Werte und Odds Ratio für eine mögliche Assoziation von DLA-DQB1b-Allele und Erkrankung nach Rasse getrennt; „--“ = alle Hunde wiesen dasselbe Allel auf: Berechnung von Odds Ratio nicht möglich.

4. Segregationsanalyse

4.1. Pedigrees

Für die Segregationsanalyse wurden mit Hilfe des Sampling Frames 3 Irish Setter Pedigrees (n=66, 24m, 42w) und 5 Cocker Spaniel Pedigrees (n=105, 49m, 56w) aus dem Gesamtpedigree herausgefiltert. Von den Cocker Spaniern waren 8 Hunde an IHA (1m, 7w), 4 an ITP (4w) und 4 am Evans' Syndrom (1m, 3w) erkrankt. Der Irish Setter Pedigree

umfasste 7 an IHA (2m, 5w), 2 an ITP (1m, 1w) und 1 am Evans' Syndrom (w) erkrankte Hunde. Die absolute Prozentzahl der an IHA und/oder ITP erkrankten Hunde betrug in der Cocker Spaniel-Familie 15% und in der Irish Setter-Familie ebenfalls 15%. Geschlechtsspezifische Prädispositionen wurden in der Cocker Spaniel-Familie gefunden: Weibliche Hunde erkrankten häufiger an IHA und/oder ITP als männliche Hunde (13% weibliche [14 w/105 gesamt] vs. 1,9% männliche [2 m/105 gesamt], $p=0,002$ zum Signifikanzniveau von 0,05). Bei den Irish Settern waren zwar auch vermehrt weibliche Hunde erkrankt, es konnte jedoch statistisch keine geschlechtsspezifische Prädisposition bewiesen werden (10% w [7 w/66 gesamt] vs. 5% [3 m/66 gesamt] m, $p=0,258$). Diese Tatsache wurde bei der Segregationsanalyse berücksichtigt.

Die Gruppen wurden danach unterteilt, wie „kranke“ Hunde definiert wurden. Im ersten Ansatz wurden alle an IHA, ITP und Evans' Syndrom erkrankten Hunde als „krank“ definiert, um einen möglichen Vererbungsmodus für alle Erkrankungen zu ermitteln. Im zweiten Durchlauf wurden in der jeweiligen Gruppe 1 nur die an IHA erkrankten Hunde als „krank“ definiert, da nicht bewiesen ist, dass IHA, ITP und Evans' Syndrom eine gemeinsame Ätiologie besitzen. Eine Untersuchung der nur an ITP und Evans' Syndrom erkrankten Hunde war aufgrund der sehr niedrigen Fallzahl nicht möglich.

4.2. Analyse Irish Setter (jPAP)

4.2.1. Gruppe 1: an IHA erkrankte Hunde

In der Gruppe 1 wurde ein möglicher Vererbungsmodus für die an IHA erkrankten Hunde der Irish Red Setter-Familie bewertet. Da in der Irish Setter-Familie kein Zusammenhang zwischen Krankheit und Geschlecht nachgewiesen werden konnte, wurde das einfache, nicht geschlechtsabhängige Modell zugrunde gelegt. Für den heterozygoten Genotyp wurde in allen Modellen eine Penetranz von mindestens 0,01% angenommen, da jPAP sonst nicht in der Lage war, die Likelihood-Funktion zu maximieren. Tests zur Segregationsanalyse wurden nicht durchgeführt, da sie bei diesem geringen Stichprobenumfang das Niveau nicht einhalten würden.

Die Parameter für das nicht geschlechtsabhängige Modell wurden wie folgt definiert:

1 = Frequenz des krankmachenden Allels

2 = Frequenz des anderen Allels

3 = Penetranz beim Probanden, wenn er das krankmachende Allel nicht besitzt
(AA, homozygot)

4 = Penetranz beim Probanden, wenn er das krankmachende Allel einmal besitzt
(Aa, heterozygot)

5 = Penetranz beim Probanden, wenn er das krankmachende Allel zweimal besitzt
(aa, homozygot)

Für das allgemeine Modell wurde die Likelihood-Funktion bezüglich aller Parameter maximiert. Es wurde vom jPAP berechnet, welche Parameterwerte der Beobachtungen am wahrscheinlichsten sind. Alle Parameter waren sowohl beim allgemeinen als auch beim Mendel'schen Modell frei. Für das dominante Modell wurden die Parameter 4 und 5 gleichgesetzt, da nach Mendel definitionsgemäß bei einem dominanten Modell auch heterozygote Tiere, die nur ein krankmachendes Allel tragen, krank werden. Für das dominante Modell wurde ebenfalls der Parameter 3 = 0 gesetzt, da Hunde, die das krankmachende Allel nicht besitzen, auch nicht krank werden. Für das rezessive Modell wurde neben dem Parameter 3 auch der Parameter 4 = 0 gesetzt, da die Wahrscheinlichkeit, dass heterozygote Tiere bei einer rezessiven Vererbung krank werden, ebenfalls gleich null ist. Für das Umweltmodell wurden alle Parameter gleich gesetzt, da die Penetranzen bei einem reinen Umweltmodell unabhängig vom Genotyp gleich sind.

Da das Modell mit dem niedrigsten AIC-Wert die Umstände am besten beschreibt, erkennt man in Tab. 59, dass bei den an IHA erkrankten Irish Settern ein rezessiver Erbgang mit einer Penetranz von 53% für reinerbige Träger des krankmachenden Allels die Beobachtungen am besten erklärt (AIC-Wert = 21,3). Ebenso sind in Tab. 59 alle verwendeten Startwerte und die berechneten Schätzungen angegeben.

	<i>Parameter</i>	<i>allgemein</i>	<i>Mendel'sches Modell</i>	<i>rezessiv</i>	<i>dominant</i>	<i>Umwelt</i>
STARTWERTE	1	0,8	0,8	0,8	0,8	0,5
	2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,5
	3	0,1	0,1	0	0	0,5
	4	0,1	0,3	0,01	0,3	0,5
	5	0,1	0,3	0,5	0,3	0,5
SCHÄTZUNGEN	1	1	0,644	0,69	0,9999996	0,5
	2	0	0,356	0,3	0,0000004	0,5
	3	0	0	0	0	0,094
	4	0,0009	0,000008	0,01	0,195	0,094
	5	0,45	0,54	0,53	0,195	0,094
	- 2 LN LIKELIHOOD	31,16	20	17,3	29,6	33,12
	Anzahl Parameter	4	4	2	2	1
	AIC	39,16	28	21,3	33,6	35,12

Tab. 59: Startwerte zur Berechnung der Modelle „allgemein“, „Mendel“, „dominant“, „rezessiv“ und „Umwelt“ für den Irish Red Setter-Pedigree zur Beschreibung der an IHA erkrankten Hunde.

4.2.2. Gruppe 2: an IHA, ITP und Evans' Syndrom erkrankte Hunde

Die Gruppe 2 umfasste alle kranken Irish Setter, unabhängig ob an IHA, ITP oder Evans' Syndrom erkrankt. Die Berechnung wurde durchgeführt, da nicht ausgeschlossen werden kann, dass alle drei Erkrankungen eine gleiche genetische Ätiologie besitzen. Für diese Gruppe wurde dasselbe Modell wie für die Gruppe 1 verwendet, da auch hier kein Zusammenhang zwischen Krankheit und Geschlecht nachgewiesen werden konnte. Für den heterozygoten Genotyp wurde in allen Modellen ebenfalls eine Penetranz von mindestens 0,01 angenommen, da das Programm sonst nicht in der Lage war, die Likelihood-Funktion zu maximieren. Tests zur Segregationsanalyse wurden nicht durchgeführt, da die Tests bei diesem geringen Stichprobenumfang das Niveau nicht einhalten würden. Die Parameter wurden genauso gewählt wie bei der Gruppe 1 (Tab. 60).

Am AIC-Wert von 19,7 erkennt man, dass ebenfalls ein rezessiver Erbgang mit einer Penetranz von 63,7% für reinerbige Träger des krankmachenden Allels die Beobachtungen am besten erklärt (Tab. 60).

	<i>Parameter</i>	<i>allgemein</i>	<i>Mendel'sches Modell</i>	<i>rezessiv</i>	<i>dominant</i>	<i>Umwelt</i>
STARTWERTE	1	0,8	0,8	0,8	0,8	0,5
	2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,5
	3	0,1	0,1	0	0	0,5
	4	0,1	0,3	0,01	0,3	0,5
	5	0,1	0,3	0,5	0,3	0,5
SCHÄTZUNGEN	1	1,0	0,723	0,723	0,9999996	0,107
	2	0	0,276	0,276	0,0000004	0,892
	3	0	0	0	0	0,107
	4	0	0,01	0,01	0,216	0,107
	5	0,47	0,637	0,637	0,216	0,107
- 2 LN LIKELIHOOD		36,95	15,7	15,7	33,5	38,1
Anzahl Parameter		4	4	2	2	1
AIC		44,95	23,7	19,7	37,5	40,1

Tab. 60: Startwerte zur Berechnung der Modelle „allgemein“, „Mendel“, „dominant“, „rezessiv“ und „Umwelt“ für den Irish Red Setter-Pedigree zur Beschreibung der an IHA, ITP und Evans' Syndrom erkrankten Hunde.

4.3. Analyse Cocker Spaniel (jPAP)

4.3.1. Gruppe 1: an IHA erkrankte Hunde

Die Gruppe 1 der Cocker Spaniel umfasste als „kranke“ Hunde nur die, bei denen eine IHA diagnostiziert wurde. Da in der Cocker Spaniel-Familie ein Zusammenhang zwischen der IHA und dem Geschlecht nachgewiesen wurde, lag daher der Auswertung das Ein-Lokus-Modell für eine Population im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht mit Mendel'schen Transmissionswahrscheinlichkeiten und geschlechtsspezifischen Penetranzen zugrunde.

Als Parameter für das geschlechtsspezifische Modell wurden gewählt:

1 = Frequenz des krankmachenden Allels

2 = Frequenz des anderen Alleles

3 = Penetranz beim weiblichen Hund, wenn sie das krankmachende Allel nicht besitzt (AA, homozygot)

4 = Penetranz beim weiblichen Hund, wenn sie das krankmachende Allel einmal besitzt (Aa, heterozygot)

5 = Penetranz beim weiblichen Hund, wenn sie das krankmachende Allele zweimal besitzt (aa, homozygot)

6 = Penetranz beim männlichen Hund, wenn er das krankmachende Allel nicht besitzt (AA, homozygot)

7 = Penetranz beim männlichen Hund, wenn er das krankmachende Allel einmal besitzt (Aa, heterozygot)

8 = Penetranz beim männlichen Hund, wenn er das krankmachende Allel zweimal besitzt (aa, homozygot)

Für das allgemeine Modell wurde die Likelihood-Funktion bezüglich aller Parameter maximiert. Sowohl beim allgemeinen als auch beim Mendel'schen Modell wurden die Parameter frei gewählt. Es wurde von jPAP berechnet, für welche Parameterwerte die Beobachtungen am wahrscheinlichsten sind. Für das dominante Modell wurden die Parameter 4/5 und 7/8 gleichgesetzt, da nach Mendel definitionsgemäß bei einem dominanten Modell auch heterozygote Tiere, die nur ein krankmachendes Allel tragen, krank werden. Ebenfalls für das dominante Modell wurden die Parameter 3 und 6 = 0 gesetzt, da Hunde, die das krankmachende Allel nicht besitzen, auch nicht krank werden. Für das rezessive Modell wurden neben den Parametern 3 und 6 auch die Parameter 4 und 7 = 0 gesetzt, da die Wahrscheinlichkeit, dass heterozygote Tiere bei einer rezessiven Vererbung krank werden,

ebenfalls gleich null ist. Für das Umweltmodell wurden alle Parameter gleich gesetzt, da die Penetranzen bei einem reinen Umweltmodell, unabhängig vom Genotyp, alle gleich sind (Tab. 61).

Da wiederum der niedrigste AIC-Wert die Beobachtungen innerhalb des Cocker Spaniel-Pedigrees am besten beschreibt, erkennt man im vorliegenden Fall, dass sich die Beobachtungen innerhalb der IHA-Gruppe am ehesten durch einen Umwelteinfluss erklären lassen (AIC-Wert = 24) (Tab. 61).

	<i>Parameter</i>	<i>allgemein</i>	<i>Mendel'sches Modell</i>	<i>rezessiv</i>	<i>dominant</i>	<i>Umwelt</i>
STARTWERTE	1	0,8	0,8	0,9	0,8	0,5
	2	0,2	0,2	0,1	0,2	0,5
	3	0,2	0,01	0	0	0,5
	4	0,2	0,2	0	0,2	0,5
	5	0,2	0,2	0,25	0,2	0,5
	6	0,1	0,01	0	0	0,05
	7	0,1	0,05	0	0,05	0,05
	8	0,1	0,05	0,25	0,05	0,05
SCHÄTZUNGEN	1	0,41	0,85	0	0,316	0,5
	2	0,59	0,14	1	0,6838	0,5
	3	0,08	0	0	0	0,121
	4	0,13	0,398	0	0,1396	0,121
	5	0,14	0	0,14	0,1396	0,121
	6	0	0	0	0	0,0000016
	7	0	0	0	0,0000008	0,0000016
	8	0	0	0,02	0,0000008	0,0000016
- 2 LN LIKELIHOOD		20	20	20	20	20
Anzahl Parameter		7	7	3	3	2
AIC		34	34	26	26	24

Tab. 61: Startwerte zur Berechnung der Modelle „allgemein“, „Mendel“, „dominant“, „rezessiv“ und „Umwelt“ für den English Cocker Spaniel-Pedigree zur Beschreibung der an IHA erkrankten Hunde.

4.3.2. Gruppe 2: an IHA, ITP und Evans' Syndrom erkrankte Hunde

Die Gruppe 2 der Cocker Spaniel umfasste als „kranke“ Hunde sowohl die an IHA, ITP als auch am Evans' Syndrom erkrankten Hunde, da auch bei den Cocker Spanieln eine gemeinsame genetische Ätiologie der drei Erkrankungen nicht sicher ausgeschlossen werden kann. Da in dieser Gruppe ebenfalls ein Zusammenhang zwischen Krankheit und Geschlecht nachgewiesen wurde, lag der Auswertung daher neben dem allgemeinen Modell auch das Ein-Lokus-Modell für eine Population im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht mit Mendel'schen Transmissionswahrscheinlichkeiten sowie geschlechtsspezifischen Penetranzen zugrunde.

Als Parameter wurden dieselben gewählt wie bei der Gruppe 1 der Cocker Spaniel.

Da auch hier der niedrigste AIC-Wert die Beobachtungen innerhalb des Cocker Spaniel Pedigrees am besten beschreibt, erkennt man im vorliegenden Fall, dass sich die Beobachtungen innerhalb der IHA/ITP/Evans' Syndrom-Gruppe am ehesten durch einen Umwelteinfluss erklären lassen (AIC-Wert = 54,43). Startwerte und Penetranzen s. Tab. 62.

	<i>Parameter</i>	<i>allgemein</i>	<i>Mendel'sche Modell</i>	<i>rezessiv</i>	<i>dominant</i>	<i>Umwelt</i>
STARTWERTE	1	0,8	0,8	0,9	0,8	0,5
	2	0,2	0,2	0,1	0,2	0,5
	3	0,2	0,01	0	0	0,5
	4	0,2	0,2	0	0,2	0,5
	5	0,2	0,2	0,25	0,2	0,5
	6	0,1	0,01	0	0	0,05
	7	0,1	0,05	0	0,05	0,05
	8	0,1	0,05	0,05	0,05	0,05
SCHÄTZUNGEN	1	0,99996	0,91	0	0,911	0,5
	2	0,00003	0,089	1	0,088	0,5
	3	0,167	0	0	0	0,137
	4	0,09	0,29	0	0,28	0,137
	5	0,17	0,23	0,14	0,28	0,137
	6	0	0	0	0	0,022
	7	0	0,05	0	0,05	0,022
	8	0,12	0	0,02	0,05	0,022
	- 2 LN LIKELIHOOD	49,64	49,94	50,43	50,02	50,43
	Anzahl Parameter	7	7	3	3	2
	AIC	63,64	63,94	56,43	56,02	54,43

Tab. 62: Startwerte zur Berechnung der Modelle „allgemein“, „Mendel“, „dominant“, „rezessiv“ und „Umwelt“ für den English Cocker Spaniel-Pedigree zur Beschreibung der an IHA, ITP und Evans' Syndrom erkrankten Hunde.

Eine Analyse der nur an ITP bzw. nur an Evans' Syndrom erkrankten Hunde konnte aufgrund einer zu geringen Fallzahl nicht durchgeführt werden. Weitere Tests wurden auch bei den Cocker Spaniern nicht durchgeführt, da das Umweltmodell die gesammelten Beobachtungen am besten beschreibt und daher eine Segregationsanalyse nichtig wäre.

V. Diskussion

1. Klinische Untersuchung

1.1 Signalement

1.1.1 Rassenprädispositionen

In der Literatur bestehen bereits seit Jahren verschiedene Angaben zu Rassenprädispositionen für die IHA und ITP: Bei der IHA zählt insbesondere der Cocker Spaniel zu den prädisponierten Rassen (Dodds 1977; Klag et al. 1993; Kellerman et al. 1995; Day 1996b; Reimer et al. 1999; Burgess et al. 2000; Scott-Moncrieff et al. 2001; Carr et al. 2002; Engelbrecht et al. 2002; Miller et al. 2004; Weinkle et al. 2005). Auch bei der ITP wurden Rassenprädispositionen für den Cocker Spaniel von verschiedenen Autoren beschrieben (Williams und Maggio-Price 1984; Jans et al. 1990; Kohn et al. 2000b; Putsche und Kohn 2008). Für das Evans' Syndrom wurde in der Arbeit von Putsche und Kohn (2008) ebenfalls eine Prädisposition des Cocker Spaniels vermutet (4 an Evans' Syndrom erkrankte Cocker Spaniel von insgesamt 14 Probanden). Daher war der Cocker Spaniel für die vorliegende Studie ein geeigneter Vertreter einer prädisponierten Rasse.

Eine Prädisposition des Irish Red Setters für die IHA wurde bisher nur einmal von Dodds beschrieben (Dodds 1977). In der Klinik für kleine Haustiere der FU Berlin wurden in den vergangenen Jahren zunehmend Fälle von IHA und/oder ITP beim Irish Red Setter beobachtet (Kohn, unveröffentlicht). In vorliegender Studie wurden insgesamt 7 an IHA, 2 an ITP und 1 am Evans' Syndrom erkrankte Irish Setter innerhalb eines Pedigrees diagnostiziert und in den Probenpool aufgenommen.

Gleichzeitig wurden auch Hunde anderer Rassen, die an IHA erkrankt waren, untersucht, um eventuelle rassebedingte Variationen im Genom auszuschließen. Diese umfassten je einen Staffordshire Terrier, Shih Tzu, Dobermann und einen Dogo Canario. Eine Schwäche dieser Studie ist, dass jeweils nur ein Kandidat der jeweiligen Rasse untersucht wurde. Dadurch verliert das Ergebnis an statistischer Signifikanz. Auch dadurch, dass keine gesunden Hunde der jeweiligen Rassen Staffordshire Terrier, Shih Tzu, Dobermann und Dogo Canario molekulargenetisch untersucht worden sind, konnten keine rassenübergreifenden Vergleiche der Polymorphismen innerhalb des MHC angestellt werden.

1.1.2 Alter

In der Literatur wurde das Erkrankungsalter für die ITP zwischen 6 Monaten und 10 Jahren (Mittel 6,1 J.) (Engelbrecht 2001) und zwischen 3 Monaten und 10 J. (Mittel 4 J.) (Putsche und Kohn 2008) beschrieben. Andere Autoren berichteten von einem Erkrankungsalter für die ITP zwischen 7 Monaten bis 15 J. (Mittel 5,5 – 6,4) (Wilkins et al. 1973; Williams und Maggio-Price 1984; Lewis et al. 1995b). Grundsätzlich können Hunde jedes Alters an der ITP erkranken. Auch an der IHA können Hunde jeden Alters erkranken. Für die pIHA wurden Erkrankungsalter von 1 bis 10 J. (Mittel 5,3 J.) (Engelbrecht et al. 2002) angegeben. Andere Studien berichteten von einem Erkrankungsalter zwischen 5 Monaten und 13 J. (Mittel 7 J.) (Griebsch 2009).

Die Daten der vorliegenden Studie decken sich mit den Angaben der Literatur: In der Gruppe der Cocker Spaniel erkrankten die Hunde zwischen 4 und 14 J. mit einem Mittel von 7,3 J. an der IHA, ITP oder am Evans' Syndrom, in der Gruppe der Irish Red Setter zwischen 0,5 und 10 J. (Mittel 5,1 J.). Für den gesamten Probandenpool galt, dass die Probanden zwischen 0,5 und 10 J. (im Mittel 5,8 J.) an der IHA, zwischen 5 und 14 J. (im Mittel 8,6 J.) an der ITP und zwischen 4 und 10 J. (im Mittel 6,6 J.) am Evans' Syndrom erkrankten.

Die Tatsache, dass Hunde jeden Alters erkranken können, machte eine Einteilung der untersuchten Hunde in „krank“ oder „gesund“ sehr schwierig. Es besteht das Risiko, dass die als „gesund“ klassifizierten Probanden in einigen Jahren ebenfalls an einer IHA oder ITP erkranken könnten. Dies würde unmittelbar zu einer abweichenden statistischen Auswertung sowohl des Probandenpools als auch der molekularbiologischen Ergebnisse führen. Um dies so weit wie möglich auszuschließen, wurden die „gesunden“ Probanden nicht nur nach dem Verwandtschaftsgrad, sondern auch nach Alter ausgewählt. Je älter diese waren, und bisher keine Krankheitsanzeichen einer IHA oder ITP gezeigt haben, desto sicherer war die Definition dieser Probanden als „gesund“.

1.1.3. Geschlechterprädisposition

In der Literatur wurde oft eine Prädisposition von weiblichen Hunden für die IHA angegeben (Scott-Moncrieff et al. 2001; Carr et al. 2002), andererseits wurde auch von gleichen Verteilungen zwischen weiblich und männlich berichtet (Klag et al. 1993). Bei der ITP wurden ebenfalls sowohl eine Prädisposition weiblicher Hunde (Engelbrecht 2001; Putsche und Kohn 2008) als auch eine Ausgeglichenheit beider Geschlechter (Jans et al. 1990) beschrieben. In vorliegender Studie konnte eine signifikante Prädisposition von weiblichen Cocker Spaniern für die IHA und/oder ITP gezeigt werden ($p=0,007$). Damit korrelierten vorliegende Ergebnisse mit den Angaben der Literatur: Überwiegend ist eine Prädisposition von weiblichen Hunden zu finden, allerdings ließ sich diese nicht auf alle Probandengruppen – wie z.B. den Irish Red Settern – übertragen. Obwohl in der Gruppe der Irish Setter mehr weibliche Tiere erkrankt waren, konnte dieses Ergebnis nicht statistisch belegt werden. Die sehr geringe Stichprobe führt allerdings zu einer begrenzten Aussagekraft der Ergebnisse.

2. Molekularbiologische Untersuchungen

2.1. MHC-I-Kandidatengenscreen

Bis dato wurden noch keine Studien veröffentlicht, die einen Zusammenhang zwischen der caninen IHA, ITP oder des Evans' Syndroms mit dem caninen MHC-I untersucht haben. In der Humanmedizin hingegen wurden bereits mehrere Publikationen veröffentlicht, die eine mögliche Assoziation zwischen der humanen IHA oder ITP und dem MHC-I beschreiben. Dabei wurden MHC-I-Loci gefunden, die gehäuft sowohl bei an IHA als auch bei an ITP erkrankten Patienten auftraten (u.a. HLA-B8) (Goebel et al. 1977; Abdel-Khalik et al. 1980; Karpatkin et al. 1981). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass möglicherweise die IHA und die ITP einen gemeinsamen genetischen Hintergrund besitzen. Daher wurden in vorliegender Studie nicht nur die an IHA und ITP erkrankten Hunde einzeln untersucht, sondern auch alle kranken Hunde unter „erkrankte Hunde“ zusammengefasst und auf mögliche gemeinsame prädisponierende Mutationen getestet. Da die MHC-I-Loci zwischen Mensch und Hund sehr stark variieren, konnten Locusbezeichnungen nicht – wie im MHC-II – übertragen werden. Daher war es in vorliegender Studie notwendig, jede einzelne DNA-Veränderung auf eine mögliche Assoziation mit den an IHA, ITP oder Evans' Syndrom erkrankten Hunden zu untersuchen.

Insgesamt konnte kein Polymorphismus im caninen MHC-I definiert werden, der eine Prädisposition für die Erkrankung IHA, ITP oder Evans' Syndrom darstellte. Einerseits wurden statistisch auffällig häufig bei den kranken bzw. gesunden Hunden vorkommende Mutationen durch eine erweiterte Stichprobe wieder verworfen. Andererseits handelte es sich bei statistisch signifikanten Polymorphismen oft um rassebedingte Unterschiede. Daher wurden sowohl Punktmutationen als auch Deletionen sowie Insertionen nicht nur einzeln auf einen möglichen Zusammenhang mit den Erkrankungen untersucht, sondern auch innerhalb der Rassen Cocker Spaniel und Irish Red Setter bewertet, damit rassespezifische Polymorphismen nicht die Ergebnisse veränderten. Besonders deutlich war eine

rassespezifische Ausprägung der MHC-I-Allele zu sehen, nicht nur für die Cocker Spaniel und Irish Setter, sondern auch für die Rassen, die als Kontrollgruppe zugelassen waren. Bei insgesamt 59 Mutationen waren 49 Polymorphismen rassespezifisch, so dass generell eine getrennte Betrachtung der Allele, abhängig von der Rasse, sinnvoll erschien. Bekannt ist, dass verschiedene Rassen rassetypische Genausprägungen besitzen, allerdings wurden rassespezifische MHC-Haplotypen bisher nur für den caninen MHC-II veröffentlicht (Kennedy et al. 2002; Angles et al. 2005). Ein direkter Vergleich der vorliegenden Daten mit Angaben der Literatur war somit nicht möglich. Andererseits war eine getrennte Betrachtung der Rassen insofern notwendig, als verschiedene Rassen unterschiedliche Prädispositionen für dieselbe Krankheit aufweisen können. So ist z.B. für die Multiple Sklerose in der Humanmedizin bekannt, dass Menschen verschiedener ethnologischer Abstammungen andere genetische Prädispositionen zeigen können (Spurkland et al. 1991; Kelly et al. 1995a; Kelly et al. 1995b).

2.1.1. DLA-12

Einige Single Nucleotid Polymorphisms (SNP's) im DLA-12 Bereich waren signifikant häufiger bei kranken bzw. gesunden Hunden vorzufinden.

Ein Polymorphismus im Intron-Bereich, DLA-12K₅, wies eine signifikante Assoziation mit den Erkrankungen IHA/ITP/Evans' Syndrom auf ($p=0,024$): Das Allel TT war nur bei gesunden Hunden vorhanden, während die Allele CC und CT gleichmäßig zwischen kranken und gesunden Hunden verteilt waren. Betrachtete man nur die an IHA erkrankten Hunde, so stellte sich heraus, dass an der Stelle des DLA-12K₅ nach wie vor nur gesunde Hunde das Allel TT trugen, diese Tatsache aber nicht als statistisch signifikant zu werten war. Das Allel wurde nicht nach Rassen getrennt berechnet, da für die Mutationen des DLA-12K₅ keine Assoziation mit der jeweiligen Rasse bestätigt werden konnte. Ein anderer auffälliger Polymorphismus in der Gruppe der an IHA erkrankten Hunde war DLA-12K₁: Nur an IHA erkrankte Hunde trugen das Allel TT, während die Allele CC und TC gleichmäßig zwischen kranken und gesunden Hunden verteilt waren. Dies war mit $p=0,044$ statistisch signifikant. Dieses Allel wurde auch nach Rassen getrennt betrachtet, hierbei ergaben sich aber keine signifikanten Ergebnisse. DLA-12K₄ hingegen zeigte beim rassenabhängigen Vergleich, dass das Allel CC nur bei kranken Irish Settern vorkam ($p=0,01$). Für alle anderen Rassen konnte das Ergebnis nicht beurteilt werden, da es keine gesunden Kontrollhunde gab. Insgesamt ergibt sich aus den gewonnenen Daten für DLA-12K, dass die Ergebnisse sehr inhomogen sind, was durch die geringe Stichprobenanzahl bedingt sein könnte. Die Polymorphismen, die in der Studie auffällig waren, sollten daher bei weiteren Probanden derselben Rasse getestet werden.

Bei allen Punktmutationen, die innerhalb des DLA-12K eine Prädisposition aufgezeigt haben, handelte es sich um Polymorphismen im Intron-Bereich. Da nach wie vor unbekannt ist, welche Funktion die Introns innerhalb des genetischen Codes genau übernehmen, sind entsprechende polymorphe Stellen – wie bei DLA-12 – durchaus mit Vorsicht zu bewerten.

2.1.2. DLA-79

In DLA-79B wurden 2 Polymorphismen lokalisiert, die eine statistisch signifikante Assoziation mit an IHA/ITP kranken Hunden aufwiesen. Dabei handelte es sich um die Polymorphismen DLA-79B₄ und DLA-79B₇. Bei DLA-79B₄ zeigten deutlich mehr kranke Hunde das Allel TT ($p=0,012$), während bei den gesunden Hunden die Allele TT, GG und TG in gleichen Maßen verteilt waren. Die Chance, dass ein TT-tragender Hund an IHA und/oder ITP erkrankte, war 9,4 mal höher als wenn der Hund ein anderes Allel trug. DLA-79B₇ zeigte signifikant ($p=0,012$), dass kranke Hunde an dieser Stelle eher das Allel AA trugen als die Allele GG und AG. AA-tragende Hunde hatten ebenfalls eine 9,4 mal höhere Chance, an IHA und/oder ITP zu erkranken als nicht-AA-tragende Hunde. Dieses Ergebnis konnte jedoch

nicht für die nur an IHA erkrankten Hunde reproduziert werden. Beide Polymorphismen wurden anhand der Kontrollgruppe (Tab. 2, Ergebnisteil) untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die vermuteten Signifikanzen aufgrund $p=0,232$ (DLA-79B₄) und $p=0,155$ (DLA-79B₇) abgelehnt werden mussten. Daher ist es für beide Allele möglich, dass es sich bei der ersten Berechnung aufgrund einer zu geringen Probandenzahl um falsch-positive Ergebnisse handelte. Betrachtete man die Allele DLA-79B₄ und DLA-79B₇ nach Rassen getrennt, so konnten ebenfalls keine Zusammenhänge zwischen den Allelen und den kranken Hunden hergestellt werden, was eine Vermutung eines falsch-positiven Ergebnisses bestätigte.

2.1.3. Andere untersuchte Loci

Für alle anderen SNP's im caninen MHC-I Bereich konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen kranken und gesunden Hunden gefunden werden.

DLA-88 wurde nicht bewertet, da die Sequenzierung fehlgeschlagen war. Bisher finden sich in der Literatur keine Angaben über eine Beteiligung von DLA-88 an genetisch bedingten Erkrankungen. In Anbetracht, dass es sich um ein besonders polymorphes Gen handelt (Kennedy et al. 2001), welches als einziger Locus im MHC-I Bereich mit all seinen Mutationen offiziell benannt wurde, sollte DLA-88 in weiteren Studien dennoch kritisch betrachtet werden

2.2. MHC-II-Kandidatenscreen

Über einen möglichen Zusammenhang zwischen der humanen IHA und ITP mit dem MHC-II wurden bisher deutlich mehr Untersuchungen durchgeführt als über den MHC-I. Für die IHA wurde beim Menschen für das Allel HLA-DQ6 eine negative Korrelation mit der Erkrankung postuliert, es codiert möglicherweise sogar ein Resistenzantigen für Erythrozyten-Antikörper (Wang-Rodriguez und Rearden 1996; Nomura et al. 1998). Die einzige bisher vorhandene Studie über einen Zusammenhang zwischen der caninen IHA und MHC-Allelen wurde ebenfalls im Bereich des MHC-II untersucht (Kennedy et al. 2006b). Die Haplotypen DLA-DRB*00601/DQA*005011/DQB*00701 und DLA-DRB*01501/DQA*00601/DQB*00301 wurden als potentielle Risiko-Haplotypen für eine Erkrankung an pIHA bestimmt. Ähnlich wie bei der Studie von Wang-Rodrigues und Rearden (1996) wurden auch in dieser Untersuchung von Kennedy et al. (2006b) zwei Haplotypen festgestellt, die eine negative Korrelation zum Auftreten der IHA zeigten: DLA-DRB*001/DQA*00101/DQB*00201 und DLA-DRB*015/DQA*00601/DQB*02301.

Insgesamt konnte in vorliegender Studie weder ein Risikohaplotyp noch ein protektiver Haplotyp für die IHA, der ITP oder das Evans' Syndrom definiert werden (Kap. 2.2.1, 2.2.2 und 2.2.3). Es waren jedoch – vergleichbar mit den Ergebnissen des MHC I – deutliche Unterschiede der SNP's zwischen den verschiedenen Rassen zu finden.

In der Veröffentlichung von Kennedy et al. (2006b) wurden die MHC-II-Allele auch innerhalb der beprobten Rassen auf einen möglichen Zusammenhang mit der IHA untersucht. Dabei zeigte sich für den Cocker Spaniel, dass 16 von 17 geprüften kranken Hunden den Haplotyp DLA-DRB*00601/DQA*005011/DQB*00701 trugen. Parallel dazu trugen aber auch 26 von 28 gesunden Cocker Spaniern das Allel DRB*00601, 20 der gesunden Hunde das Allel DQB*00701 und 12 gesunde Hunde das Allel DQB*02001.

Eine Untersuchung innerhalb der einzelnen Rassen ist auch insofern wichtig, da für die IHA und die ITP nachweislich eine Rassenprädisposition existiert (Engelbrecht et al. 2002; Miller et al. 2004; Weinkle et al. 2005; Putsche und Kohn 2008). Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass gleiche Krankheiten innerhalb verschiedener Rassen unterschiedliche genetische Prädispositionen besitzen, was eine Untersuchung von möglichen Risiko-Haplotypen nach Rassen getrennt sinnvoll erscheinen lässt.

2.2.1. DLA-DRB

Der DLA-DRB wurde in vorliegender Studie sowohl im Bereich des Exon 1 als auch im Bereich des Exon 2 auf mögliche Veränderungen bei den erkrankten Hunden untersucht. Dabei entstanden Ergebnisse, die unterschiedlich bewertet wurden. Während für das Exon 2 bereits eine internationale Nomenklatur besteht, gibt es keine Zuordnungen für die Polymorphismen des Exon 1. Daher konnten für das Exon 1 nur die definierten SNP's einzeln zwischen den kranken und gesunden Hunden verglichen werden. Da weder signifikante Mutationen entdeckt werden konnten, noch Literaturquellen für Vergleiche existieren, wird das DLA-DRB (Exon 1) an dieser Stelle nicht weiter diskutiert. Haplotypen für das Exon 2 des DLA-DRB konnten hingegen benannt werden und mit den Ergebnissen der Studie von Kennedy et al. (2006b) verglichen werden:

2.2.1.1. DLA-DRB Exon 2

In vorliegender Studie wurden für den DLA-DRB Bereich insgesamt 4 Allele definiert: DRB*00601, DRB*00901, DRB*00103 und DRB*00101. Für kein Allel konnte eine positive oder negative Assoziation mit einer Erkrankung an IHA und/oder ITP festgestellt werden. Da die Studie von Kennedy et al. (2006b) nur auf an IHA erkrankten Hunden basierte, wurden auch in vorliegender Studie die IHA-Hunde herausgefiltert, um eine optimale Vergleichsbasis zu gewährleisten. Doch auch in der Gruppe der nur an IHA erkrankten Hunde konnte keine statistisch signifikante Korrelation definiert werden. DRB*00601 ist das Allel, welches in in der Studie von Kennedy et al. (2006b) als ein Risikohaplotyp beschrieben wurde. Dies konnte für die vorliegende Probanden statistisch nicht bestätigt werden.

2.2.1.2. DLA-DRB und Rassenprädisposition

Die Untersuchung von DLA-DRB innerhalb der beiden Rassen Cocker Spaniel und Irish Setter zeigte, dass das Allel DRB*00101 zwar zum Signifikanzniveau $\alpha=0,05$ keine statistische Signifikanz zu der Erkrankung an IHA und/oder ITP aufwies, aber zum Signifikanzniveau von $\alpha=0,1$ für den Irish Red Setter signifikant war ($p=0,063$). Überwiegend gesunde Irish Setter trugen das Allel DRB*00101 (64,3%), während die kranken Hunde alle das Allel DRB*00103 aufwiesen. Dieses Ergebnis korreliert mit den Ergebnissen von Kennedy et al. (2006b): Hier wird das Allel DRB*00101 als protektives Allel dargestellt. Da kein Cocker Spaniel das Allel trug, konnte dieses mit Sicherheit als rassespezifisch für den Irish Setter bewertet werden.

2.2.2. DLA-DQA

DLA-DQA wurde – wie auch DLA-DRB – in vorliegender Studie sowohl im Bereich des Exon 1 als auch im Bereich des Exon 2 auf mögliche Veränderungen bei den erkrankten Hunden untersucht. Genauso wie bei DLA-DRB werden die unspezifischen Ergebnisse für das Exon 1 aufgrund nicht existenter Literaturquellen nicht weiter besprochen. Für das Exon 2 von DLA-DQA hingegen existiert bereits eine internationale Nomenklatur und kann mit bestehenden Studien (Kennedy et al. 2006b) verglichen werden:

2.2.2.1. DLA-DQA Exon 2

Für den Locus DLA-DQA zeigten 8 kranke (IHA und/oder ITP) Hunde DQA*005011 und 7 kranke (IHA und/oder ITP) Hunde DQA*00101. Im Gegensatz dazu wiesen 23 gesunde Hunde das Allel DQA*005011 und 14 gesunde Hunde das Allel DQA*00101 auf. Insgesamt konnten mit Hilfe des Exakten Tests nach Fisher keine Zusammenhänge zwischen einem DQA-Allel und der Erkrankung festgestellt werden. Wie beim DLA-DRB wurden die an IHA erkrankten Hunde separat betrachtet. Dabei stellte sich heraus, dass 6 an IHA erkrankte Hunde das Allel DQA*005011 und 6 weitere erkrankte Hunde das Allel DQA*00101 trugen. 25 der gesunden Hunde besaßen ebenfalls das Allel DQA*005011, während das Allel

DQA*00101 bei 18 gesunden Hunden vorkam. Auch hier musste die Nullhypothese, dass kein Zusammenhang zwischen einem DQA-Allel und der IHA bestand, bestätigt werden. Dieses Ergebnis stimmt nicht mit den Daten von Kennedy et al. (2006b) überein, da dort das Allel DQA*005011 als ein prädisponierendes Allel beschrieben wurde.

2.2.2.2. DLA-DQA und Rassenprädispositionen

Die Untersuchung der DLA-DQA Haplotypen innerhalb der einzelnen Rassen änderte nichts an den allgemeinen Ergebnissen. DQA*005011 war nur bei den Cocker Spaniern vorhanden, und konnte daher nicht berechnet werden. Für das Allel DQA*00101 musste die Nullhypothese „es besteht keine Assoziation zwischen DQA*00101 und dem Auftreten von IHA und/oder ITP“ angenommen werden. Die in der Literatur beschriebene Prädisposition des DQA*005011 (Kennedy et al. 2006b) konnte für kranke Hunde innerhalb der Probandengruppe (Cocker Spaniel) in dieser Studie demnach nicht bestätigt werden.

2.2.3. DLA-DQB

DLA-DQB ist das dritte Kandidatengen im MHC-II-Bereich, für den im Exon 2 bereits eine internationale Nomenklatur existiert und daher mit bestehenden Studien (Kennedy et al. 2006b) verglichen werden kann:

2.2.3.1. DLA-DQB Exon 2

Für DLA-DQB wurden in vorliegender Studie insgesamt 5 Allele herausgefiltert: DQB*00701, DQB*00201, DQB*01201, DQB*008011 und DQB*02001. Einzig das Allel DQB*01201 zeigte eine statistische Signifikanz bei der Betrachtung einer möglichen Assoziation zu den an IHA und/oder ITP erkrankten Hunden ($p=0,024$) und auch bei der Gruppe der nur an IHA erkrankten Hunden ($p=0,005$). In beiden Gruppen trugen nur die kranken Hunde das Allel DQB*01201. Da innerhalb der Stichprobe nur zwei Hunde das Allel trugen, handelte es sich hierbei nicht um eine statistisch gesicherte Menge. So sollte dieses Ergebnis mit weiteren Probanden überprüft werden. Für alle anderen Allele wurde die Nullhypothese „es besteht kein Zusammenhang zwischen dem Allel und der Erkrankung an IHA und/oder ITP“ auf einem Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ angenommen. Bei der Studie von Kennedy et al. (2006b) wurde DQB*00701 als prädisponierendes Allel beschrieben, welches in vorliegender Studie weder in der Gruppe „IHA und/oder ITP-krank“ ($p=0,145$) noch in der Gruppe „IHA-krank“ ($p=0,144$) gezeigt werden konnte. Das Allel DQB*00201 wurde in der Literatur als ein protektives Allel beschrieben (Kennedy et al. 2006b), welches ebenfalls nicht bestätigt werden konnte ($p=0,557$ in der Gruppe IHA und/oder ITP und $p=0,7$ in der Gruppe IHA).

2.2.3.2 DLA-DQB und Rassenprädisposition

Für DLA-DQB stellte sich heraus, dass das Allel DQB*00701 zum Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ keine signifikante Assoziation mit der Erkrankung an IHA und/oder ITP aufwies ($p=0,06$), aber zu einem Signifikanzniveau von $\alpha=0,1$. In vorliegender Studie wurde deutlich, dass – im Gegensatz zur Studie von Kennedy et al. (2006b), in der das Allel DQB*00701 als ein Risiko-Allel bezeichnet wurde – alle gesunden Cocker Spaniel das Allel DQB*00701 trugen (100%), und die kranken Hunde nur teilweise (75%). Die Odds Ratio konnte nicht berechnet werden, da in der 2x2 Tabelle eine der beiden konditionalen Odds aufgrund einer Häufigkeit von 0 nicht definiert war. Diese Untersuchungen sollten aufgrund der relativ kleinen Stichprobe mit mehr Probanden durchgeführt werden, um auch einen haltbaren Vergleich mit den Angaben in der Literatur durchführen zu können.

2.2.3.3. DLA-DQB Exon 1

Bei der Untersuchung des Exon 1 von DLA-DQB wurde für die Polymorphismen DQB1₄ und DQB1₅ ein signifikanter Zusammenhang mit den an IHA erkrankten Hunden gefunden ($p=0,037$ für DQB1₄ und $p=0,021$ für DQB1₅). Dabei wurde für DQB1₄ das Allel CC nur bei einem kranken Staffordshire Terrier und das Allel AC nur bei dem kranken Dogo Canario und dem kranken Shih Tzu vorgefunden, weswegen die Vermutung bestand, dass die Base C nur bei kranken Hunden auftritt. Die Odds Ratio konnte wiederum nicht berechnet werden, da eine der beiden konditionalen Odds aufgrund der Häufigkeit von 0 nicht definiert war. Für DQB1₅ wurde ein Zusammenhang des Allels GG mit den an IHA erkrankten Hunden vermutet. Hunde, die das GG-Allel tragen, hatten eine 8 mal höhere Chance, an der IHA zu erkranken als Hunde, die dieses Allel nicht aufweisen. Dieser Zusammenhang wurde bei der Betrachtung der Polymorphismen für die einzelnen Rassen wieder verworfen, so dass davon ausgegangen werden kann, dass es sich um rassebedingte Polymorphismen handelte. Alle anderen Polymorphismen zeigten keine signifikanten Zusammenhänge mit den Probanden.

2.3. MHC-II und ITP

Es bestehen keine Untersuchungen in der Literatur bezüglich einer genetischen Prädisposition von an ITP erkrankten Hunden. Allerdings sprechen eindeutige Rasseprädispositionen (Jans et al. 1990; Kohn et al. 2000b; Putsche und Kohn 2008) dafür, dass es sich sowohl um eine genetische, als auch um eine nicht-rassenübergreifende Prädisposition handeln könnte. In der Humanmedizin wurden bereits einige Ansätze einer möglichen MHC-Prädisposition von ITP-Patienten gefunden (Kuwana et al. 2000). Ebenfalls ließen sich in der selben Studie Zusammenhänge zwischen dem MHC-Haplotypen DRB1*0803/DQB1*0601 und Antikörpern, die gegen GPIIb/IIIa gerichtet sind und dem MHC-Haplotypen DRB1*0405/DQB1*0401 und Antikörpern, die gegen GPIb/IX gerichtet sind, darstellen. Ein möglicher Zusammenhang zwischen MHC-Haplotypen und den beteiligten Glykoproteinen der Thrombozyten wurde in vorliegender Studie nicht bewertet. Da aber viele der bei der ITP und IHA beteiligten Glykoproteine teilweise bekannt sind (Lewis und Meyers 1996b; Day 1999), wäre es sinnvoll, eine mögliche Assoziation in diese Richtung beim Hund zu untersuchen. In vorliegender Studie waren zu wenig Probanden vorhanden, die ausschließlich an ITP erkrankt waren, sodass eine statistische Berechnung nicht möglich war. Infolgedessen wurden die ITP-Patienten zusammen mit den an IHA und am Evans' Syndrom erkrankten Patienten unter „kranke Probanden“ gefasst. Eine erneute Auswertung der Daten dürfte in jedem Fall sinnvoll sein, wenn mehr Probanden, die an ITP erkrankt sind, am MHC untersucht werden.

3. Fazit

Insgesamt kann man zusammenfassen, dass in vorliegender Studie keine SNP's bzw. Haplotypen – weder im caninen MHC-I noch im MHC-II – gefunden werden konnten, die eine Prädisposition für die Erkrankung IHA, ITP oder Evans' Syndrom innerhalb einer Cocker Spaniel und einer Irish Red Setter Familie darstellen. Zwar konnte für DRB*00101 in der Gruppe der Irish Setter eine Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Kennedy et al. (2006b) gefunden werden, aber nicht für die übrigen SNP's.

Eine Vererbung von bestimmten Haplotypen innerhalb eines Pedigrees konnte beobachtet, jedoch nicht mit dem Auftreten der IHA, ITP oder Evans' Syndrom in Zusammenhang gebracht werden. Daher konnte mit Hilfe dieser Daten auch keine Risikobewertung von betroffenen Zuchtlinien vorgenommen werden.

Nichtsdestotrotz kann eine genetische Beteiligung von DLA-Genen an der Ätiologie der IHA bzw. ITP nicht ausgeschlossen werden. Dies konnte einerseits durch bereits veröffentlichte Daten bestätigt werden, andererseits handelte es sich in vorliegender Studie um eine kleine Stichprobe, die durch weitere Probanden ergänzt werden sollte. Zudem wurden nur Mitglieder

der vorliegenden Pedigrees untersucht, was bedeuten kann, dass zwar bei einigen untersuchten Hunden eine genetische Prädisposition besteht, diese jedoch keine phänotypischen Merkmale zeigen. Dies kann dazu führen, dass diese genetischen Prädispositionen nicht herausgefiltert werden konnten, weil die Probanden aufgrund fehlender phänotypischer IHA/ITP-Merkmale als „gesund“ definiert wurden.

Des Weiteren stehen für die molekularbiologischen Untersuchungen andere Kandidatengene zur Überprüfung an, die sich bereits in der Humanmedizin als prädisponierend oder protektiv erwiesen haben. Dazu zählen insbesondere die Genloci, die für die Fc-Rezeptoren codieren. Zudem ist aus der Humanmedizin bekannt, dass es sich bei der humanen IHA und ITP nicht um eine monokausale Ätiologie handelt. Diese Tatsache darf auch für den Hund nicht vernachlässigt werden.

3. Segregationsanalyse

Die Auswertung der Stammbäume zeigte, dass im Cocker Spaniel-Pedigree 14 Hunde an IHA/ITP/Evans' Syndrom und im Irish Setter-Pedigree insgesamt 10 Hunde an IHA/ITP/Evans' Syndrom erkrankt waren. In der Literatur gibt es nur zwei vergleichbare Veröffentlichungen: In der einen wurde von 6 verwandten Probanden einer Vizsla-Familie mit einem positiven Coombs-Test berichtet (Dodds 1983), die zweite beschrieb einen Scottish Terrier-Pedigree mit insgesamt 8 Hunden mit einem positiven Coombs-Test (Dodds 1983). Allerdings wurde in beiden Fällen nicht eindeutig die Diagnose „primäre IHA“ gestellt und auch keine Segregationsanalyse durchgeführt. In vorliegender Studie wurde eine Segregationsanalyse durchgeführt, um innerhalb der Pedigrees aufgrund der vorliegenden Phänotypen „pIHA“, „pITP“ oder „Evans' Syndrom“ einen möglichen Vererbungsmodus zu bestimmen. Die analytische Strategie beruhte auf dem Anpassen von verschiedenen genetischen und nicht-genetischen Modellen und der Selektion desjenigen Modells, das die Daten am besten erklärt. In der Humanmedizin wurden bisher einige Studien veröffentlicht, die eine mögliche Vererbung der IHA bzw. ITP aufzeigten. Dazu gehörten Untersuchungen, die sich nur mit familiärer IHA beschäftigten (Pirofsky 1968; Pirofsky 1969; Toolis et al. 1977). Andere Studien zeigten ein gehäuftes familiäres Vorkommen von ITP (Stuart et al. 1978; Conley 1981; Sanchez Fayos et al. 1994; Rischewski et al. 2006), während sich weitere mit dem familiären Auftreten von Autoimmunerkrankungen im Allgemeinen beschäftigten. Dabei wurde insbesondere das Vorkommen von IHA, ITP, Evans' Syndrom sowie SLE innerhalb von Familien beobachtet (Lippman et al. 1982; Rischewski et al. 2006).

Für die vorliegende Studie wurden zwei Pedigrees auf einen möglichen Vererbungsmodus hin untersucht. Dabei wurden beide Pedigrees je in zwei Gruppen aufgeteilt: Gruppe 1 umfasste nur die an IHA erkrankten Hunde und bewertete eine mögliche Vererbung dieser Erkrankung, die Gruppe 2 hingegen umfasste alle an IHA, ITP und am Evans' Syndrom erkrankten Hunde. Einerseits sollten die an IHA erkrankten Hunde separat untersucht werden, damit Vergleiche mit der Humanmedizin möglich sind. Andererseits besteht sowohl klinisch als auch ätiologisch die Möglichkeit, dass IHA und ITP eine gleiche genetische Prädispositionen besitzen. Patienten in der Humanmedizin, die an einer IHA oder ITP leiden, haben ein Leben lang ein höheres Risiko, auch eine andere immunbedingte Erkrankung zu entwickeln (Conley 1981). Lippmann et al. (1982) untersuchte zwei Familien eingehend, und stellte dabei fest, dass Verwandte der Probanden u.a. an ulzerativer Colitis, Asthma, Hyperthyreose oder akuter Leukämie litten. Dodds beschrieb 1983 in der bereits erwähnten Scottish Terrier-Familie, dass von 7 Coombs-positiven Patienten auch 5 positiv auf Thrombozyten-gebundene Antikörper getestet wurden. Ebenfalls zeigten in der Vizsla-Familie von 9 Coombs-positiven Patienten 6 einen positiven Test auf Thrombozyten-gebundene Antikörper. Da sich beide Erkrankungen in der Pathophysiologie ähneln, ist eine gemeinsame Ätiologie nicht auszuschließen und wurde daher in der vorliegende Segregationsanalyse berücksichtigt.

Für nur an ITP oder am Evans' Syndrom erkrankte Hunde konnte die Segregationsanalyse aufgrund einer zu geringen Fallzahl nicht separat durchgeführt werden.

3.1. Cocker Spaniel-Pedigree

Die Familienmitglieder des Cocker Spaniel-Pedigrees sind mit Kennzeichnung der erkrankten Hunde in Abb. 1 und Abb. 2 (Ergebnisteil) aufgeführt. Man erkennt, dass die meisten der an IHA und/oder ITP erkrankten Hunde von dem Ahnenpaar 174 x 53 und 174 x 50 abstammten. Bezeichnend dazu war, dass die Hündin 174 selber an IHA erkrankt war. Eines ihrer Nachkommen (w) erkrankte an IHA (60), eine andere am Evans' Syndrom (66), zudem 4 weitere Nachkommen der F2-Generation (2 x Evans' Syndrom [136 und 155], 1 x IHA [127], 1 x ITP [172]). In der dritten Generation erkrankten zusätzlich auch noch je eine Hündin an der ITP (118) und am Evans' Syndrom (178).

Eine weitere Rolle spielte die Verpaarung 77 x 177, wobei die Hündin 177 ebenfalls an IHA erkrankt war. Zwei ihrer Nachkommen (3. und 4. Generation) litten an der IHA (99 und 106), während eine Hündin der F2-Generation (81) am Evans' Syndrom erkrankte und bei einem weiteren Nachkommen (189) die ITP diagnostiziert wurde. Diese beiden Familien 77 x 177 und 174 x 53 waren durch die Verpaarung von 120 (Schwester von 106) mit 146 miteinander verbunden. Aus dieser Verpaarung entstand die an ITP erkrankte Hündin 172. Nach Ausschluß von möglichen Triggerfaktoren für eine sIHA oder sITP ist ein familiärer Charakter der IHA und ITP im Cocker Spaniel-Pedigree deutlich zu erkennen.

Signifikant war in der Cocker Spaniel-Familie auch die Prädisposition weiblicher Hunde, sowohl in der Gruppe der nur an IHA erkrankten Hunde, als auch in der Gruppe „IHA/ITP/Evans' Syndrom“. Diese Tatsache wurde der Berechnung eines möglichen Vererbungsmodells zugrunde gelegt. Das Ergebnis war, dass sich die Beobachtungen der erkrankten Hunde innerhalb des Cocker Spaniel-Pedigrees am besten durch Umwelteinflüsse erklären lassen. Unter der Annahme jedoch, dass die Krankheit rasseabhängig ist (Klag et al. 1993; Engelbrecht 2001; Miller et al. 2004), kann dieses Modell aus biologischen Gründen ausgeschlossen werden. Die Beobachtungen in der Gruppe „IHA-krank“ lassen sich dann unter diesen Voraussetzungen besser durch einen dominanten Erbgang (AIC=56,02) erklären als durch einen rezessiven (AIC=56,43). Die Penetranzen werden bei Hündinnen bei einem dominanten Erbgang auf 28%, beim Rüden auf 5% geschätzt. Um einen rezessiven Erbgang ausschließen zu können, sollten jedoch Probeanpaarungen zwischen erkrankten Cocker Spanieln und Hunden einer anderen Rasse durchgeführt werden, bei der die IHA nicht vorkommt. Insgesamt wäre ein derartiger Anpaarungsversuch jedoch sehr schwierig durchzuführen, da

1. nicht definitiv bestimmt werden kann, bei welcher Rasse die IHA nicht vorkommt,
2. die Krankheit in jedem Alter auftreten kann und
3. die Umwelteinflüsse auf die aus der Anpaarung entstandenen Versuchshunde nahezu identisch sein müssen.

Für die Gruppe der „an IHA, ITP, Evans' Syndrom erkrankten Hunde“ wurden die Beobachtungen in erster Linie ebenfalls am besten durch ein Umweltmodell erklärt. Würde man das Umweltmodell aufgrund einer Rasseprädisposition (Kohn et al. 2000b; Putsche und Kohn 2008), und damit aus biologischen Gründen ausschließen, so erklären sowohl ein dominanter Erbgang (AIC=26) mit einer 14%igen Penetranz für Hündinnen und einer 0,0008%igen Penetranz für Rüden als auch ein rezessiver Erbgang (AIC=26) mit einer 14%igen Penetranz für Hündinnen und einer 2%igen Penetranz für Rüden die Beobachtungen gleichermaßen. Auch hier sollte durch Probeanpaarungen entweder das dominante oder rezessive Modell ausgeschlossen werden, um eine definitive Aussage treffen zu können.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass es sich beim vorliegendem Pool um eine zu geringe Anzahl von Probanden handelt. Andere Segregationsanalysen berichten z.B. von insgesamt 1057 Hunden mit 211 am Osteosarkom erkrankten Probanden (Phillips et al. 2007).

Demgegenüber handelte es sich in vorliegender Studie mit insgesamt 105 Hunden und 16 erkrankten Probanden um eine sehr geringe Stichprobenanzahl, die Verfälschungen in den Berechnungen herbeiführen könnte.

3.2. Irish Red Setter-Pedigree

Bei den Irish Red Settern fällt bei der alleinigen Betrachtung der Pedigrees eine außergewöhnliche Ansammlung von an IHA und/oder ITP erkrankten Hunden innerhalb der Familie auf (Abb. 3 und Abb. 4, Ergebnisse). Wie bei den Cocker Spaniern erkennt man, dass fast alle erkrankten Hunde von demselben Urahn (31) abstammten. Die Paarung mit 142 führte zu einer IHA-Erkrankung (147), während die Paarung mit 32 zu 3 IHA-Fällen (49, 118, 121), zwei ITP-Erkrankungen (39, 116) und einem Evans' Syndrom-Patienten (127) führte. Die direkten Nachkommen von 49 zeigten sowohl einen negativen Coombs' Test als auch einen negativen Test auf Thrombozyten-gebundene Antikörper. Auch der zweite Teil des Irish Setter-Pedigrees zeigte eine familiäre Ansammlung von IHA-Fällen: Bei der Verpaarung von 1 x 2 entstand ein an IHA erkrankter Rüde (10). Von den Nachkommen seiner Schwester (11), die mit einem Halbbruder (12) verpaart wurde, erkrankten 2 von 10 Nachkommen an der IHA (21 und 24). Ein familiäres Auftreten der IHA/ITP lässt sich in Anbetracht dieser Pedigrees vermuten. Da beim Irish Red Setter keine signifikante Geschlechtsprädisposition dargestellt werden konnte, wurde das einfache, nicht geschlechtsabhängige Modell für die Segregationsanalyse verwendet.

Die Analyse ergab, dass für den Irish Red Setter-Pedigree eine autosomal-rezessive Vererbung (AIC=21,3) am besten die Beobachtungen für die Gruppe der an IHA erkrankten Irish Red Setter erklärt. Die Allelfrequenz des krankmachenden Allels liegt bei 0,69, die Penetranz beträgt unter diesen Voraussetzungen 53%. Betrachtet man die Gruppe der an IHA, ITP und Evans' Syndrom erkrankten Hunde, so lassen sich die Beobachtungen hier ebenfalls am besten durch ein autosomal-rezessives Modell erklären (AIC=19,7). Die Allelfrequenz des krankmachenden Allels wurde auf 0,28, die Penetranz auf 63% geschätzt. Weitere Tests zur Segregationsanalyse wurden nicht durchgeführt, da die Tests bei diesem geringen Stichprobenumfang das Niveau nicht einhalten würden.

Dieses sehr eindeutige Ergebnis steht in Kontrast zu den Ergebnissen des Cocker Spaniel Pedigrees. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass die Erkrankungen unter den verschiedenen Rassen unterschiedliche Vererbungsmodi besitzen. Diese Überlegung lässt sich mit den Ergebnissen der molekularbiologischen Untersuchung vereinbaren. Hier wurde bereits festgestellt, dass eine nach Rassen getrennte Untersuchung der Allele sinnvoll ist, da verschiedene Rassen unterschiedliche MHC-Haplotypen aufweisen. Aufgrunddessen wären unterschiedliche Vererbungsmodi und unterschiedliche prädisponierende Faktoren für ein und dieselbe Krankheit unter verschiedenen Rassen durchaus möglich.

4. Fazit

Die unterschiedlichen Beobachtungen im Vererbungsmodus könnten unter anderem auch dadurch zu erklären sein, dass die Ätiologie der IHA und/oder ITP bei den verschiedenen Rassen durch Imprinting und/oder multifaktorielle Vererbungen (Murken et al. 2006) beeinflusst wird.

Bei der multifaktoriellen Vererbung werden viele Merkmale nicht nur von einem Gen bestimmt, sondern von vielen Genorten mit ihren unterschiedlichen Allelen. Sind viele verschiedene Genorte an der Ausprägung eines Merkmals beteiligt, hat das einzelne Gen selbst nur eine sehr geringe Wirkung. Die Genwirkungen können additiv, dominant oder epistatisch sein (Murken et al. 2006). Oft sind auch Umweltfaktoren an der phänotypischen Ausprägung dieses Merkmals beteiligt. Um das Auftreten von Krankheiten durch umweltfaktorielle Modelle zu erklären, wurde von Falconer das Schwellenwertmodell eingeführt. Erst wenn eine bestimmte Anzahl von Genwirkungen vorliegt, kommt es zur

Ausprägung der Krankheit. Reicht die Zahl der Gene und ihrer Wirkungen nicht aus, tritt die Krankheit nicht auf (Falconer und Mackay 1996). Dies kann bei den Cocker Spaniern der Fall sein, denn ein familiäres Vorkommen lässt sich bei Analyse der Pedigrees vermuten. Der Verdacht liegt nahe, dass bei einigen Hunden der Schwellenwert aufgrund einzelner fehlender Genprädispositionen nicht überschritten wurde, und es daher nicht zum Ausbruch der Krankheit kam, jedoch bei den anderen Hunden, die zusätzliche Prädispositionen besaßen. Dies erklärt die widersprüchlichen Aussagen der Segregationsanalyse am besten. Diese Vermutung könnte jedoch tatsächlich am ehesten durch Probenanpaarungen bestätigt oder verworfen werden.

Dass auch im molekulargenetischen Teil dieser Arbeit kein eindeutiger Haplotyp im DLA-Bereich identifiziert werden konnte, der eine Prädisposition für die IHA und/oder ITP darstellt, unterstreicht die These einer multifaktoriellen Vererbung: Die Beteiligung von MHC-Genen an der IHA ist nicht auszuschließen (Kennedy et al. 2006b), nichtsdestotrotz scheint es nicht der einzige Auslöser einer IHA zu sein, da die Ergebnisse von Kennedy in vorliegender Arbeit nicht reproduziert werden konnten. Vom Datenmaterial her waren die Proben der vorliegenden Studie eine sehr spezifische Sammlung, da fast ausschließlich verwandte Hunde erfasst wurden. Somit konnten rassen- und familienspezifische Haplotypen weitgehend ausgeschlossen werden. Eine genormte Versuchsanordnung zur Überprüfung der Ergebnisse ist in diesem Fall jedoch schwierig zu erzeugen, da alle verwandten, gesunden und kranken Hunde in einer nahezu identischen Umwelt aufwachsen müssten, um Umwelteinflüsse, die bei einer multifaktoriellen Vererbung unter Umständen eine Rolle spielen, auszuschließen. Nur unter Ausschluß von Umwelteinflüssen können genaue genetische Traits untersucht werden. Ein weiterer Faktor für eine mögliche Verfälschung der Ergebnisse besteht darin, dass in den nächsten Jahren weitere Erkrankungen innerhalb des vorliegenden Probandenpools auftreten könnten. Dadurch würden sich sowohl die Ergebnisse der Segregationsanalyse als auch der MHC-Sequenzierung verändern. Dieser Faktor wurde so gut wie möglich reduziert, da das Durchschnittsalter der in der Segregationsanalyse untersuchten gesunden Hunde im Mittel bei 12,1 Jahren (Cocker Spaniel) und 9,1 Jahren (Irish Red Setter) lag. Diese Tatsache führt zu einer hohen Erfassungswahrscheinlichkeit aller Kranken; besonders unter der Maßgabe dass das durchschnittliche Erkrankungsalter bei 5,3 Jahren (Kohn et al. 2000b; Engelbrecht et al. 2002) bzw. sogar nur 4 Jahren (Putsche und Kohn 2008) liegt.

Um die Ergebnisse abzusichern bzw. gegebenenfalls entsprechend neu zu berechnen, besteht also nur die Möglichkeit, die Nachkommen beider Familien in den nächsten Jahren genau zu beobachten, und regelmäßig auf IHA und ITP zu testen. Einerseits könnten dadurch die in vorliegender Studie als gesund klassifizierten Hunde bestätigt werden, andererseits könnten durch die Aufdeckung weiterer IHA- und/oder ITP-Fälle der Probandenpool erweitert werden. Durch zusätzliche Probanden könnten auch die MHC-Allele besser geprüft werden, eine komplexe Segregationsanalyse wäre aufgrund einer größeren Stichprobe ebenfalls möglich.

VI. Zusammenfassung

Die canine primäre immunhämolytische Anämie (pIHA) und die canine primäre immunbedingte Thrombozytopenie (pITP) sind Autoimmunerkrankungen mit ungeklärter Ätiologie. Eine Prädisposition bestimmter Rassen wie Cocker Spaniel und Irish Red Setter lässt vermuten, dass neben Umweltfaktoren genetische Komponenten eine Rolle bei der Entstehung spielen.

Ziele vorliegender Studie waren es:

1. Mit Hilfe einer molekularbiologischen Untersuchung herauszufinden, ob bestimmte canine MHC-Allele (DLA; dog leukocyte antigen) eine Prädisposition für die canine pIHA und pITP darstellen.
2. Über eine Segregationsanalyse einen möglichen Erbgang für die pIHA und pITP innerhalb eines Cocker Spaniel- und Irish Setter-Pedigrees zu definieren.

Voraussetzung für die Aufnahme in die Studie waren neben einer ausführlichen Krankengeschichte vollständige Pedigree-Unterlagen und die Diagnose pIHA, pITP oder Evans' Syndrom (pIHA und pITP). Die Diagnose wurde mit Hilfe eines positiven Coombs-Tests oder einer persistierenden Erythrozytenagglutination (pIHA) sowie aufgrund des positiven Nachweises Thrombozyten-gebundener Antikörper (pITP) und dem Ausschluss einer Grunderkrankung gestellt. Die Probanden entstammten zum größten Teil aus dem Cocker Spaniel-Pedigree mit 209 Mitgliedern und dem Irish Setter-Pedigree mit 147 Mitgliedern.

1. Molekularbiologische Untersuchungen

Hierzu wurde die DNA von an pIHA, pITP und Evans' Syndrom erkrankten sowie gesunden Hunden der Cocker Spaniel- und Irish Setter-Familien isoliert. Kandidatengene waren codierende und flankierende nicht-codierende Regionen des MHC-I (DLA-12, DLA-64, DLA-79 und DLA-88) und des MHC-II (DLA-DRA, DLA-DRB, DLA-DQA und DLA-DQB). Alle identifizierten Single nucleotid polymorphisms (SNP's) wurden auf eine Assoziation mit der Erkrankung pIHA bzw. pIHA/pITP/Evans' Syndrom geprüft. Von insgesamt 59 Punktmutationen waren 49 als rassespezifisch anzusehen, weshalb zusätzlich fast alle SNP's nach Rasse getrennt ausgewertet wurden.

Für den **MHC-I** wurden 5 an pIHA, 3 an Evans' Syndrom und 2 an pITP erkrankte Cocker Spaniel und Irish Setter untersucht. Zusätzlich gingen 4 an pIHA erkrankte Hunde anderer Rassen in die Studie ein. Als Vergleichsgruppe dienten je 7 gesunde Cocker Spaniel und Irish Setter sowie 4 gesunde Rhodesian Ridgebacks. Für das Kandidatengen DLA-12 wurden insgesamt 34 Polymorphismen gefunden. DLA-12K₅ (Allel: TT, p=0,024) kam nur bei gesunden Hunden vor. Die Allele DLA-12K₁ (Allel: TT, p=0,044) und DLA-12K₄ (Allel: CC, nur bei Irish Setter; p=0,01) wurden nur bei kranken Hunden definiert. Alle Hot Spots lagen im Intron-Bereich, daher konnten keine Aussagen über mögliche Aminosäureveränderungen getroffen werden. Das Kandidatengen DLA-64 wies insgesamt 16 Polymorphismen, 1 Insertion und 1 Deletion auf. Für keines der Allele konnte ein signifikanter Zusammenhang mit den Erkrankungen gefunden werden. DLA-79 hatte 9 Polymorphismen und 1 Deletion über den gesamten Verlauf. Dabei wurden 2 Allele lokalisiert (DLA-79B₄: Allel TT, p=0,012 und DLA-79B₇: Allel AA, p=0,012), die eine Assoziation mit IHA/ITP/Evans' Syndrom zeigten. Beide Hot Spots wurden bei weiteren Hunden (2 pIHA, 3 pITP, 2 Evans' Syndrom, 1 gesunder Hund) getestet, die Assoziation musste daraufhin verworfen werden. DLA-88 konnte nicht sequenziert und ausgewertet werden.

Für den **MHC-II** wurden zur Untersuchung des Exon 1 dieselben Probanden wie beim MHC-I verwendet. Für DLA-DRA wurden insgesamt 6 Polymorphismen definiert, für DLA-DRB 1 Polymorphismus, für DLA-DQA 2 Polymorphismen und für DLA-DQB 5 Polymorphismen

und 1 Insertion. Für alle SNP's im Bereich des Exon 1 konnte kein Zusammenhang mit der Erkrankung pIHA, pITP oder Evans' Syndrom festgestellt werden.

Für die Untersuchung des Exon 2 wurden insgesamt 5 an Evans' Syndrom, 6 an pIHA und 4 an pITP erkrankte Cocker Spaniel und Irish Setter ausgewählt. Die Vergleichsgruppe bestand aus 37 gesunden Probanden. Durch die bestehende Nomenklatur war eine Benennung nach Haplotypen möglich. Insgesamt zeigten 20 gesunde und 5 kranke Cocker Spaniel homozygot den Haplotyp DQA*005011/DQB*00701/DRB*00601 und 2 kranke Cocker Spaniel homozygot den Haplotyp DQA*005011/DQB*01201/DRB*00601. Vier Cocker Spaniel waren heterozygot: 2 gesunde und ein kranker Hund hatten den Haplotyp DQA*005011/DQB*00701/DRB*00601 und DQA*00101/DQB*008011/DRB*00901, und ein gesunder Hund den Haplotyp DQA*005011/DQB*00701/DRB*00601 und DQA*005011/DQB*02001/DRB*00601. Bei den Irish Red Settern hatten 5 kranke und 7 gesunde Hunde den Haplotyp DQA*00101/DQB*00201/DRB*00103. Ein Kontrollhund war homozygot mit dem Haplotyp DQA*00101/DQB*00201/DRB*00101. Insgesamt 6 gesunde und 1 an pIHA erkrankter Hund waren heterozygot mit dem Haplotyp DQA*00101/DQB*00201/DRB*00101 und DQA*00101/DQB*00201/DRB*00103. Die in der Literatur als prädisponierend beschriebenen Allele DLA-DRB*00601, DLA-DQA*005011, DLA-DQA*00101, DQB*00701 konnten in vorliegender Studie zwar alle bei den Probanden festgestellt, aber nicht als prädisponierend für pIHA, pITP oder Evans' Syndrom nachgewiesen werden. Das Allel DLA-DRB*00101 korrelierte in der Gruppe der Irish Setter zum Signifikanzniveau von $\alpha=0,1$ mit den gesunden Probanden. Dies deckte sich mit den Angaben in der Literatur, da das Allel bereits als protektives Allel definiert wurde. Allerdings kann aufgrund der niedrigen Fallzahl diesem Haplotyp keine ursächliche Rolle bei der Entstehung bzw. Prävention der caninen pIHA bzw. pITP zugesprochen werden.

Insgesamt wurde weder im MHC-I noch im MHC-II im Rahmen der untersuchten Stichprobe ein Polymorphismus aufgezeigt, der mit einer signifikanten Prädisposition für IHA, ITP oder Evans' Syndrom einherging. Im Umkehrschluss konnte eine protektive Wirkung bestimmter Haplotypen ebenfalls nicht gezeigt werden.

2. Segregationsanalyse

Für die Segregationsanalyse wurden 3 Irish Setter-Pedigrees mit an pIHA (n=7), pITP (n=2) und Evans' Syndrom (n=1) erkrankten Hunden und deren gesunden Verwandten (n=56) analysiert. Für den Cocker Spaniel wurden 5 Pedigrees ebenfalls mit an pIHA (n=8), pITP (n=4) sowie Evans' Syndrom (n=4) erkrankten Hunden sowie ihren gesunden Verwandten (n=89) erstellt. Die Pedigrees wurden hinsichtlich aller erkrankten Tiere (pIHA/pITP/Evans' Syndrom) sowie unter Berücksichtigung der nur an IHA erkrankten Hunde untersucht.

Die Auswertung der Irish Setter-Pedigrees erfolgte mit Hilfe des „Informationskriterium nach Akaike“ (AIC) und ergab für die an pIHA erkrankten Hunde Hinweise auf eine autosomal-rezessive Vererbung mit einer Penetranz von 53% für reinerbige Träger des krankmachenden Allels. Für die an pIHA/pITP/Evans' Syndrom erkrankten Irish Setter erklärte ebenfalls ein autosomal-rezessiver Erbgang mit einer Penetranz von 63,7% die Beobachtungen am besten. Bei den Cocker Spanieln wurden zusätzlich geschlechtsspezifische Prädispositionen für die Auswertung berücksichtigt. Hier ergab sowohl die Berechnung der an pIHA erkrankten Hunde als auch die der an pIHA/pITP/Evans' Syndrom erkrankten Hunde, dass sich die Beobachtungen am besten durch einen Umwelteinfluss erklären lassen.

VII. Summary

Primary immune-mediated haemolytic anemia and primary immune-mediated thrombocytopenia in the dog: genetic association with the major histocompatibility complex and segregation analysis

Primary immune-mediated haemolytic anaemia (pIMHA) and primary immune-mediated thrombocytopenia (pITP) are commonly diagnosed immune-mediated haematological disorders in the dog. The etiology is still unknown. Breed predispositions have been reported for different breeds, e.g. the English Cocker Spaniel and the Irish Red Setter. Therefore, research is both focused on genetic and environmental factors as potential causes.

The aim of this study was:

1. To evaluate potential associations between certain canine MHC haplotypes (DLA, dog leukocyte antigen system) and pIMHA or pITP using DLA genotyping.
2. To define the pattern of inheritance of pIMHA and pITP in a Cocker Spaniel and an Irish Setter pedigree.

Proband with the diagnosis pIMHA, pITP or Evans' syndrome (pIMHA and pITP) were included in the study if a complete medical record and pedigree data were available. Inclusion criteria for pIMHA were either a positive Coombs' test or persistent erythrocyte agglutination. Inclusion criteria for pITP were a positive platelet-bound antibody test result. Dogs were excluded if underlying diseases were identified. Almost all probands belonged to either the Cocker Spaniel pedigree (209 dogs total) or the Irish Setter pedigree (147 dogs total).

1. DLA genotyping

DNA was extracted from affected (pIMHA, pITP and Evans' syndrome) and healthy dogs of the Cocker Spaniel and Irish Setter pedigree. All coding regions of MHC class I (DLA-12, DLA-64, DLA-79 and DLA-88) and MHC class II (DLA-DRA, DLA-DRB, DLA-DQA and DLA-DQB) were analysed. The identified single nucleotide polymorphisms (SNP's) were tested for an association with pIMHA or pIMHA/pITP/Evans' syndrome. Of all 59 SNP's 49 turned out to be breed-specific, therefore the results were evaluated separately for the different breeds.

MHC class I: 10 Cocker Spaniel and Irish Setter patients (5 pIMHA, 3 Evans' syndrome and 2 pITP) and 4 dogs of different breeds (pIMHA) were genotyped for MHC class I. DNA samples from 18 control dogs (7 Cocker Spaniels, 7 Irish Setters, 4 Rhodesian Ridgebacks) were available for testing.

A total of 34 SNP's were identified for DLA-12. The allele TT in DLA-12K₅ was significantly increased in the control group ($p=0.024$). The SNP's DLA-12K₁ (allele TT, $p=0.044$) and DLA-12K₄ (allele CC, only in Irish Setters; $p=0.01$) were only detected in affected dogs. All hot spots were located in introns, therefore it was not possible to describe any differences in the amino acid sequence. Furthermore, 16 SNP's, 1 insertion and 1 deletion were identified for DLA-64. However, no association was detected between DLA-64 alleles and affected dogs. In DLA-79, 9 SNP's and 1 deletion were identified. DLA-79B₄ with the allele TT ($p=0.012$) and DLA-79B₇ with the allele AA ($p=0.012$) had a significant association with affected dogs (IMHA/ITP/Evans' syndrome). Both hot spots were tested with samples from other affected and healthy dogs (2 pIMHA, 3 pITP, 2 Evans' syndrome and 1 healthy dog) and had to be rejected since the association was not reproducible in this second test group. MHC genotyping for DLA-88 failed, therefore no haplotypes could be defined.

MHC class II: For the analysis of exon 1 of all MHC class II candidate genes the same samples were used as for MHC class I. 6 SNP's for DLA-DRA, 1 SNP for DLA-DRB, 2 SNP's DLA-DQA, 5 SNP's and 1 insertion for DLA-DQB were identified. All alleles were

compared between affected and control dogs and no significant association was found.

Samples for the examination of exon 2 were chosen from 5 dogs with Evans' syndrome, 6 with pIMHA and 4 with pITP. The control group consisted of 37 healthy probands. Three-locus DLA haplotypes were assigned to each case and control dog. Five affected dogs and 20 control dogs were homozygous at all 3 MHC loci: DQA*005011/DQB*00701/DRB*00601. Two affected Cocker Spaniels were homozygous at DQA*005011/DQB*01201/DRB*00601. Four Cocker Spaniels were heterozygous: 2 healthy dogs and 1 affected dog had the haplotype DQA*005011/DQB*00701/DRB*00601 and DQA*00101/DQB*008011/DRB*00901. One healthy dog had the haplotype DQA*005011/DQB*00701/DRB*00601 and DQA*005011/DQB*02001/DRB*00601. The analysis of the Irish Setter group revealed that 5 affected and 7 controls were homozygous at DQA*00101/DQB*00201/DRB*00103 and 1 control dog was homozygous with the haplotype DQA*00101/DQB*00201/DRB*00101. A total of 6 healthy and 1 pIMHA dog were heterozygous at one locus: DQA*00101/DQB*00201/DRB*00101 and DQA*00101/DQB*00201/DRB*00103.

Recent studies suggested that the alleles DLA-DRB*00601, DLA-DQA*005011, DLA-DQA*00101 and DQB*00701 might be potential risk haplotypes for pIMHA. These alleles were identified in this study. However, no association was detected neither for pIMHA nor for pITP or Evans' syndrome. An association of DLA-DRB*00101 with healthy dogs was found within the Irish Setter group, if compared to the level of significance at $\alpha=0.1$. This was in agreement with an earlier study where this allele was shown as a protective allele. However, given the small number of probands in the Irish Setter group, this result should be interpreted with caution.

In conclusion, no SNP was identified in this study which predisposed for the occurrence of pIMHA, pITP and/or Evans' syndrome. On the other hand, no protective haplotype was identified neither in the Cocker Spaniel nor in the Irish Setter group.

2. Segregation analysis

Three Irish Setter pedigrees were constructed to include 10 affected dogs (7 pIMHA, 2 pITP, 1 Evans' syndrome). These pedigrees contained the information of a total of 66 dogs (including the affected dogs). Similarly, 5 Cocker Spaniel pedigrees were constructed around 16 affected dogs (8 pIMHA, 4 pITP, 4 Evans' syndrome). In general, information on a total of 105 dogs were collected (including the affected dogs). Segregation analysis was performed for dogs with pIMHA and for all affected dogs suffering from pIMHA, pITP or Evans' syndrome).

Five transmission models were analysed by segregation analysis; based on Akaike's information criteria (AIC), the most parsimonious model in the Irish Setter group „pIMHA“ was the Mendelian model with an autosomal-recessive inheritance. The penetrance for homozygous carriers was estimated to be 53%. In the Irish Setter group „pIMHA/pITP/Evans' syndrome“, the most parsimonious model was also the Mendelian model with an autosomal-recessive inheritance with a penetrance for homozygous carriers estimated to be 63.7%.

In the Cocker Spaniel group gender-specific differences were present and had to be considered for the segregation analysis. Both in the Cocker Spaniel group „pIMHA“ and the Cocker Spaniel group „pIMHA/pITP/Evans' syndrome“ the environmental model proved to be the most parsimonious.

VIII. Literaturverzeichnis

Abdel-Khalik, A., L. Paton, A. G. White und S. J. Urbaniak (1980). „Human leucocyte antigens A, B, C, and DRW in idiopathic “warm” autoimmune haemolytic anaemia.” Br Med J **280**(6216): 760-1.

Akaike, H. (1974). „A new look at the statistical model identification.“ IEEE Trans. Autom. Control **19**: 716-23.

Alphey, L. (1998). „Oligonucleotidprimer.“ In Alphey, Luke (Hrsg.): DNA-Sequenzierung. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg; Berlin: 48-51.

Angles, J. M., L. J. Kennedy und N. C. Pedersen (2005). „Frequency and distribution of alleles of canine MHC-II DLA-DQB1, DLA-DQA1 and DLA-DRB1 in 25 representative American Kennel Club breeds.“ Tissue Antigens **66**(3): 173-84.

Anolik, J. und I. Sanz (2004). “B cells in human and murine systemic lupus erythematosus.” Curr Opin Rheumatol **16**(5): 505-12.

Aster, R. H. (1989). “The immunologic thrombocytopenias.” In Kunicki T.J. u. J.N. George (Hrsg.): Platelet Immunobiology. J.B. Lippincott, Philadelphia: 387-435.

Becker, K. G., K. C. Barnes, T. J. Bright und S. A. Wang (2004). “The genetic association database.” Nat Genet **36**(5): 431-2.

Benacerraf, B. (1981). “Role of MHC gene products in immune regulation.” Science **212**(4500): 1229-38.

Bennett, D., S. L. Finnett, A. S. Nash und D. Kirkham (1981). “Primary autoimmune haemolytic anaemia in the dog.” Vet Rec **109**(8): 150-3.

Bernard, N. F., F. Ertug und H. Margolese (1992). “High incidence of thyroiditis and anti-thyroid autoantibodies in NOD mice.” Diabetes **41**: 40-6.

Bexfield, N. H., E. J. Villiers und M. E. Herrtage (2005). “Immune-mediated haemolytic anaemia and thrombocytopenia associated with *Anaplasma phagocytophilum* in a dog.” J Small Anim Pract **46**(11): 543-8.

Boillot, D., R. Assan, M. Dardenne, M. Debray-Sachs und J. F. Bach (1986). “T-lymphopenia and T-cell imbalance in diaetic db/db mice.” Diabetes **35**: 198-203.

Bonney, G. (1984). „On the statistical determination of major gene mechanisms in continuous human traits: regressive models.“ Am J Med Genet **18**(4): 731-49.

Bonney, G. (1992). „Compound regressive models for family data.“ Hum Hered **42**(1): 28-41.

Breitschwerdt, E. B. (1988). „Infectious thrombocytopenia in dogs.“ Comp Small Animal **10**: 1177-86.

Brooks, M. B. und J. L. Catalfamo (2005). „Platelet Disorders and von Willebrand Disease.“ In Ettinger, W.J. u. E.C. Feldman (Hrsg.): Textbook of Veterinary Medicine, 6. Auflage, W.B. Saunders, Philadelphia: 1918-29.

Burgess, K., A. Moore, W. Rand und S. M. Cotter (2000). „Treatment of immune-mediated hemolytic anemia in dogs with cyclophosphamide.“ J Vet Intern Med **14**(4): 456-62.

Burnett, R. C. und D. E. Geraghty (1995a). „Structure and expression of a divergent canine class I gene.“ J Immunol **155**(9): 4278-85.

Burnett, R. C., L. V. Francisco, S. DeRose, R. Storb und E. A. Ostrander (1995b). „Identification and characterization of a highly polymorphic microsatellite marker within the canine MHC Class I region.“ Mamm Genome **6**: 684-5.

Cambon-Thomsen, A. und M. P. Roth (1994). „Genetics of autoimmune diseases.“ Rev Prat **44**(1): 43-52.

Carr, A. P., D. L. Panciera und L. Kidd (2002). „Prognostic factors for mortality and thromboembolism in canine immune-mediated hemolytic anemia: a retrospective study of 72 dogs.“ J Vet Intern Med **16**(5): 504-9.

Catchpole, B., J. M. Ristic, L. M. Fleeman und L. J. Davison (2005). „Canine diabetes mellitus: can old dogs teach us new tricks?“ Diabetologia **48**(10): 1948-56.

Christen, U. und M. G. von Herrath (2004). „Induction, acceleration or prevention of autoimmunity by molecular mimicry.“ Mol Immunol **40**(14-15): 1113-20.

Christopoulos, C.G., H.C. Kelsey und S.J. Machin (1993). „A Flow-Cytometric Approach to Quantitative Estimation of Platelet Surface Immunoglobulin G.“ Vox Sang **64**, 106-15

- Conley, C. L. (1981). „Immunologic precursors of autoimmune hematologic disorders: autoimmune hemolytic anemia and thrombocytopenic purpura.” Johns Hopkins Med J **149**: 101-9.
- Corato, A., C. R. Shen, G. Mazza, R. N. Barker und M. J. Day (1997). „Proliferative responses of peripheral blood mononuclear cells from normal dogs and dogs with autoimmune haemolytic anaemia to red blood cell antigens.” Vet Immunol Immunopathol **59**(3-4): 191-204.
- Cotter, S. M. (1992). „Autoimmune hemolytic anemia in dogs.” Comp Contin Educ Pract Vet **14**: 53-9.
- Court, W. S., J. M. Bozeman, S. J. Soong, M. N. Saleh, D. R. Shaw und A. F. LoBuglio (1987). „Platelet surface-bound IgG in patients with immune and nonimmune thrombocytopenia.” Blood **69**(1): 278-83.
- Day, M. (1996). „Serial monitoring of clinical, haematological and immunological parameters in canine autoimmune haemolytic anaemia.” J Small Anim Pract **37**(11): 523-34.
- Day, M. J. (1999). „Antigen specificity in canine autoimmune haemolytic anaemia.” Vet Immunol Immunopathol **69**(2-4): 215-24.
- Day, M. J. und A. J. Mackin (2008a). „Immune-mediated haematological disease.“ In Day, M.J. u. A.J. Mackin (Hrsg.): Clinical Immunology of the Dog and Cat, 2. Auflage, Manson Publishing Ltd.; London: 94-114.
- Day, M. J. und A. J. Mackin (2008b). „The Basis of Immune-Mediated Disease.“ In Day, M.J. u. A.J. Mackin (Hrsg.): Clinical Immunology of the Dog and Cat, 2. Auflage, Manson Publishing Ltd.; London: 75-93.
- Dipple, K. M. und E. R. McCabe (2000). „Phenotypes of patients with “simple” Mendelian disorders are complex traits: thresholds, modifiers, and systems dynamics.” Am J Hum Genet **66**(6): 1729-35.
- Dodds, W. J. (1977). „Autoimmune hemolytic disease and other causes of immune-mediated anaemia: an overview.” J Am Anim Hosp Assoc **13**: 437-41.
- Dodds, W. J. (1983). „Immune-Mediated Diseases of the Blood.” Adv Vet Sci Comp Med **27**: 163-98.

Donner, H., J. Braun, C. Seidl, H. Rau, R. Finke, M. Ventz, P. G. Walfish, K. H. Usadel und K. Badenhop (1997). „Codon 17 polymorphism of the cytotoxic T lymphocyte antigen 4 gene in Hashimoto's thyroiditis and Addison's disease.” J Clin Endocrinol Metab **82**(12): 4130-2.

Doxiadis, I., K. Krumbacher, J. J. Neefjes, H. L. Ploegh und H. Grosse-Wilde (1989). „Biochemical evidence that the DLA-B locus codes for a class II determinant expressed on all canine peripheral blood lymphocytes.” Exp Clin Immunogenet **6**(3): 219-24.

Duval, D. und U. Giger (1996). „Vaccine-associated immune-mediated hemolytic anemia in the dog.” J Vet Intern Med **10**(5): 290-5.

el-Khateeb, M. S., A. S. Awidi, M. S. Tarawneh und M. Abu-Khalaf (1986). „HLA antigens, blood groups and immunoglobulin levels in idiopathic thrombocytopenic purpura.” Acta Haematol **76**(2-3): 110-4.

Elson, C. J. und R. N. Barker (2000). „Helper T cells in antibody-mediated, organ-specific autoimmunity.” Curr Opin Immunol **12**(6): 664-9.

Encinas, J. A. (1999). „QTL influencing autoimmune diabetes and encephalomyelitis map to a 0.15-cM region containing Ii2.” Mature Genet **21**: 158-60.

Engelbrecht, R. (2001). „Immunhämolytische Anämie und immunbedingte Thrombozytopenie, eine prospektive Studie (1997-1999).” Vet Med Diss, FU Berlin.

Engelbrecht, R., B. Kohn, W. Leibold und U. Giger (2002). „Klinische Befunde, Diagnostik und Behandlungserfolge bei der primären und sekundären immunhämolytischen Anämie beim Hund.” Kleintierpraxis **47**(5): 265-78.

Engelfriet, C. P., M. A. Overbeeke und A. E. von dem Borne (1992). „Autoimmune hemolytic anemia.” Semin Hematol **29**(1): 3-12.

Evans, R. S., K. Takahashi, R. T. Duane, R. Payne und C. Liu (1951). „Primary thrombocytopenic purpura and acquired hemolytic anemia; evidence for a common etiology.” AMA Arch Intern Med **87**(1): 48-65.

Evers, K. G. (1979). „HLA frequencies and haplotypes in children with idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP).” Eur J Pediatr **131**(1): 81-3.

Falconer, D. S. und T. F. C. Mackay (1996). „Introduction to Quantitative Genetics.” In Falconer (Hrsg): Introduction to Quantitative Genetics. Eds. Longman, London: 299-311.

Filion, M. C., C. Proulx, A. J. Bradley, D. V. Devine, R. P. Sekaly, F. Decary und P. Chartrand (1996). „Presence in peripheral blood of healthy individuals of autoreactive T cells to a membrane antigen present on bone marrow-derived cells.” Blood **88**(6): 2144-50.

Firestein, G. S. (2004). „The T cell cometh: interplay between adaptive immunity and cytokine networks in rheumatoid arthritis.” J Clin Invest **114**(4): 471-4.

Fourneau, J. M., J. M. Bach, P. M. van Endert und J. F. Bach (2004). „The elusive case for a role of mimicry in autoimmune diseases.” Mol Immunol **40**(14-15): 1095-102.

Fournel, C., L. Chabanne, C. Caux, J. R. Faure, D. Rigal, J. P. Magnol und J. C. Monier (1992). „Canine systemic lupus erythematosus. I: A study of 75 cases.” Lupus **1**(3): 133-9.

Gaiger, A., A. Neumeister, H. Heinzl, I. Pabinger und S. Panzer (1994). „HLA class-I and -II antigens in chronic idiopathic autoimmune thrombocytopenia.” Ann Hematol **68**(6): 299-302.

Geraghty, D. E., X. H. Wei, H. T. Orr und B. H. Koller (1990). „Human leukocyte antigen F (HLA-F). An expressed HLA gene composed of a class I coding sequence linked to a novel transcribed repetitive element.” J Exp Med **171**(1): 1-18.

Giger, U. (2005). „Regenerative Anemias Caused by Blood Loss or Hemolysis.” In Ettinger, W.J. u. E.C. Feldman (Hrsg.): Textbook of Veterinary Medicine, 6. Auflage, W.B. Saunders, Philadelphia: 1886-907.

Girardin, S. E., J. P. Hugot und P. J. Sansonetti (2003). Lessons from Nod2 studies: towards a link between Crohn's disease and bacterial sensing.” Trends Immunol **24**(12): 652-8.

Goebel, K. M., E. Hahn und K. Havemann (1977). „HLA matching in autoimmune thrombocytopenic purpura.” Br J Haematol **35**(2): 341-2.

Gratama, J. W., J. D'Amato, J. de Koning und G. J. den Ottolander (1984). „The HLA-system in immune thrombocytopenic purpura: its relation to the outcome of therapy.” Br J Haematol **56**(2): 287-93.

Graumann, M. B., S. A. DeRose, E. A. Ostrander und R. Storb (1998). „Polymorphism analysis of four canine MHC class I genes.” Tissue Antigens **51**(4 Pt 1): 374-81.

Griebsch, C. (2009). „Untersuchung verschiedener prognostischer Marker einschließlich des C-reaktiven Proteins bei der caninen autoimmunhämolytischen Anämie.“ Vet Med Diss, FU Berlin

Grindem, C. B., E. B. Breitschwerdt, P. C. Perkins, L. D. Cullins, T. J. Thomas und B. C. Hegarty (1999). „Platelet-associated immunoglobulin (antiplatelet antibody) in canine Rocky Mountain spotted fever and ehrlichiosis.“ J Am Anim Hosp Assoc **35**(1): 56-61.

Gruel, Y., B. Boizard, F. Daffos, F. Forestier, J. Caen und J. L. Wautier (1986). „Determination of platelet antigens and glycoproteins in the human fetus.“ Blood **68**(2): 488-92.

Guillet, J. G., M. Z. Lai, T. J. Briner, S. Buus, A. Sette, H. M. Grey, J. A. Smith und M. L. Geftter (1987). „Immunological self, nonself discrimination.“ Science **235**(4791): 865-70.

Hagenström, H., P. Schlenke, H. Henning, H. Kirchner und H. Klüter (2000). „Quantification of Platelet-associated IgG for Differential Diagnosis of Patients with Thrombocytopenia.“ Thromb Haemost **84**, 779-83

Hall, F. C. und P. Bowness (1996). „HLA and disease: from molecular function to disease association?“ In Browning MJ, McMichael (Hrsg.): HLA and MHC: Genes, Molecules and Function, Oxford: BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford: 353-81

Halliwell, R. E. (1978). „Autoimmune disease in the dog.“ Adv Vet Sci Comp Med **22**: 221-63.

Hasstedt S.J. (2002). „In PAP: Pedigree analysis package.“ <http://hasstedt.genetics.utah.edu> Rev. 5.

Heise, E. R., D. J. Cook, B. S. Schepart, C. H. Manning, M. R. McMahan, M. Chedid und C. A. Keever (1987). „The major histocompatibility complex of primates.“ Genetica **73**(1-2): 53-68.

Helmerhorst, F. M., L. E. Nijenhuis, G. G. de Lange, P. M. van den Berg-Loonen, M. F. Jansen, A. E. von dem Borne und C. P. Engelfriet (1982). „HLA antigens in idiopathic thrombocytopenic purpura.“ Tissue Antigens **20**(5): 372-9.

Hoskins, J. D., E. B. Breitschwerdt, S. D. Gaunt, T. W. French und W. Burgdorfer (1988). „Antibodies to Ehrlichia canis, Ehrlichia platys, and spotted fever group rickettsiae in Louisiana dogs.“ J Vet Intern Med **2**(2): 55-9.

Hubert, B., M. Teichner, C. Fournel und J. C. Monier (1988). „Spontaneous familial systemic lupus erythematosus in a canine breeding colony.” J Comp Pathol **98**(1): 81-9.

Jackson, M. L. und S. A. Kruth (1985). „Immune-mediated hemolytic anaemia and thrombocytopenia in the dog: retrospective study of 55 cases diagnosed from 1969 through 1983 at the Western College of Veterinary Medicine.” Can Vet J **26**: 245-50.

Jaenisch, R. und A. Bird (2003). „Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals.” Nat Genet **33 Suppl**: 245-54.

Jain, N. C. und J. W. Switzer (1981). „Autoimmune thrombocytopenia in dogs and cats.” Vet Clin North Am Small Anim Pract **11**(2): 421-34.

Janning, W. und E. Knust (2004). „Regulation der Genaktivität.” In Janning, W. u. E. Knust (Hrsg.): Genetik, 1. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart: 234.

Jans, H., P. Armstrong und G. Price (1990). „Therapy of immune mediated thrombocytopenia. A retrospective study of 15 dogs.” J Vet Intern Med **4**(1): 4-7.

Jones, D. R., T. J. Gruffydd-Jones, C. R. Stokes und F. J. Bourne (1992). „Use of a direct enzyme-linked antiglobulin test for laboratory diagnosis of immune-mediated hemolytic anemia in dogs.” Am J Vet Res **53**(4): 457-65.

Joshi, B. C. und N. C. Jain (1976). „Detection of antiplatelet antibody in serum and on megakaryocytes of dogs with autoimmune thrombocytopenia.” Am J Vet Res **37**(6): 681-5.

Karandikar, N. J., C. L. Vanderlugt, T. L. Walunas, S. D. Miller und J. A. Bluestone (1996). „CTLA-4: a negative regulator of autoimmune disease.” J Exp Med **184**(2): 783-8.

Karpatkin, S. und G. W. Siskind (1969). „In Vitro Detection of Antiplatelet Antibody in Patients with Idiopathic Thrombocytopenic Purpura and Systemic Lupus Erythematosus.” Blood **33**: 795-811

Karpatkin, S., S. K. Garg und G. W. Siskind (1971). „Autoimmune thrombocytopenic purpura and the compensated thrombolytic state.” Am J Med **51**(1): 1-4.

Karpatkin, S., M. Fotino, A. Gibofsky und R. J. Winchester (1979). „Association of HLA-DRw2 with autoimmune thrombocytopenic purpura.” J Clin Invest **63**(5): 1085-8.

Karpatkin, S., M. Fotino und R. Winchester (1981). „Hereditary autoimmune thrombocytopenic purpura: an immunologic and genetic study.” Ann Intern Med **94**(6): 781-2.

Kellerman, D. L., D. C. Lewis und D. S. Bruyette (1995). „Canine immune-mediated anemia: A retrospective analysis of 37 cases.” J Vet Intern Med **9**: 189.

Kelly, M. A., K. H. Jacobs, M. A. Penny, C. H. Mijovic, S. Nightingale, A. H. Barnett und D. A. Francis (1995a). „An investigation of HLA-encoded genetic susceptibility to multiple sclerosis in subjects of Asian Indian and Afro-Caribbean ethnic origin.” Tissue Antigens **45**(3): 197-202.

Kelly, M. A., Y. Zhang, M. A. Penny, K. H. Jacobs, D. A. Cavan, C. H. Mijovic, K. Y. Chou, A. H. Barnett und D. A. Francis (1995b). „Genetic susceptibility to multiple sclerosis in a Shanghai Chinese population. The role of the HLA class II genes.” Hum Immunol **42**(3): 203-8.

Kelton, J.G. (1995). „The Serological Investigation of Patients with Autoimmun Thrombocytopenia.” Thromb Haemost **74**: 228-33

Kennedy, L. J., L. Altet, J. M. Angles, A. Barnes, S. D. Carter, O. Francino, J. A. Gerlach, G. M. Happ, W. E. Ollier, A. Polvi, W. Thomson und J. L. Wagner (1999). „Nomenclature for factors of the dog major histocompatibility system (DLA), 1998. First report of the ISAG DLA Nomenclature Committee. International Society for Animals Genetics.” Tissue Antigens **54**(3): 312-21.

Kennedy, L. J., J. M. Angles, A. Barnes, S. D. Carter, O. Francino, J. A. Gerlach, G. M. Happ, W. E. Ollier, W. Thomson und J. L. Wagner (2001). „Nomenclature for factors of the dog major histocompatibility system (DLA), 2000: Second report of the ISAG DLA Nomenclature Committee.” Tissue Antigens **58**(1): 55-70.

Kennedy, L. J., A. Barnes, G. M. Happ, R. J. Quinnell, O. Courtenay, S. D. Carter, W. E. Ollier und W. Thomson (2002). „Evidence for extensive DLA polymorphism in different dog populations.” Tissue Antigens **60**(1): 43-52.

Kennedy, L. J., L. J. Davison, A. Barnes, A. D. Short, N. Fretwell, C. A. Jones, A. C. Lee, W. E. Ollier und B. Catchpole (2006a). „Identification of susceptibility and protective major histocompatibility complex haplotypes in canine diabetes mellitus.” Tissue Antigens **68**(6): 467-76.

Kennedy, L. J., A. Barnes, W. E. Ollier und M. J. Day (2006b). „Association of a common dog leucocyte antigen class II haplotype with canine primary immune-mediated haemolytic anaemia.” Tissue Antigens **68**(6): 502-8.

Klag, A., U. Giger und F. Shofer (1993). „Idiopathic immune-mediated hemolytic anemia in dogs: 42 cases (1986-1990).” J Am Vet Med Assoc **202**(5): 783-8.

Klein, M. K., S. W. Dow und R. A. Rosychuk (1989). „Pulmonary thromboembolism associated with immune-mediated hemolytic anemia in dogs: ten cases (1982-1987).” J Am Vet Med Assoc **195**(2): 246-50.

Kohn, B., R. Engelbrecht, U. Giger und W. Leibold (2000a). „Platelet-bound antibodies in dogs with thrombocytopenia and change with treatment.” J Vet Intern Med **13**: 361.

Kohn, B., R. Engelbrecht, W. Leibold und U. Giger (2000b). „Klinische Befunde, Diagnostik und Behandlungserfolge bei der primären und sekundären immunbedingten Thrombozytopenie beim Hund.” Kleintierpraxis **45**(12): 893-907.

Kohn, B. und U. Giger (2006a). „Anämie.” In Suter, P. u. B. Kohn (Hrsg.): Praktikum der Hundeklinik, 10. Auflage, Parey Verlag, Stuttgart: 630-1.

Kohn, B. und U. Giger (2006b). „Thrombozytenbedingte Gerinnungsstörungen.” In Suter, P. u. B. Kohn (Hrsg.): Praktikum der Hundeklinik, 10. Auflage, Parey Verlag Stuttgart: 652-5.

Kohn, B., D. Galke, P. Beelitz und K. Pfister (2008). „Clinical features of canine granulocytic anaplasmosis in 18 naturally infected dogs.“ J Vet Intern Med **22**(6): 1289-95.

Kristensen, A. T., D. J. Weiss, J. S. Klausner, J. Laber und D. J. Christie (1994a). „Detection of antiplatelet antibody with a platelet immunofluorescence assay.” J Vet Intern Med **8**(1): 36-9.

Kristensen, A.T., D.J. Weiss, J.S. Klausner, J. Laber und D.J. Christie (1994b). „Comparison of microscopic and flow cytometric detection of platelet antibody in dogs suspected of having immune-mediated thrombocytopenia.” Am J Vet Res **55**, 1111-4

Kristiansen, O. P., Z. M. Larsen und F. Pociot (2000). „CTLA-4 in autoimmune diseases—a general susceptibility gene to autoimmunity?” Genes Immun **1**(3): 170-84.

Kuwana, M., J. Kaburaki, J. P. Pandey, M. Murata, Y. Kawakami, H. Inoko und Y. Ikeda (2000). „HLA class II alleles in Japanese patients with immune thrombocytopenic purpura. Associations with anti-platelet glycoprotein autoantibodies and responses to splenectomy.” Tissue Antigens **56**(4): 337-43.

Lechler, R. und A. Warrens (2000). „HLA in Health and Disease.” Academic Press **2nd ed.** San Diego.

Lewis, D. C., D. S. McVey, W. S. Shuman und W. B. Muller (1995a). „Development and characterization of a flow cytometric assay for detection of platelet-bound immunoglobulin G in dogs.” Am J Vet Res **56**(12): 1555-8.

Lewis, D. C., K. M. Meyers, M. B. Callan, J. Bucheler und U. Giger (1995b). „Detection of platelet-bound and serum platelet-bindable antibodies for diagnosis of idiopathic thrombocytopenic purpura in dogs.” J Am Vet Med Assoc **206**(1): 47-52.

Lewis, D.C., D.S. McVey und M.B. Callan (1995c). „Flow-cytometric detection of platelet-bound and serum platelet-bindable IgG in dogs with immune-mediated thrombocytopenia.” J Vet Intern Med **9**: 189

Lewis, D. C. und K. M. Meyers (1996a). „Canine idiopathic thrombocytopenic purpura.” J Vet Intern Med **10**(4): 207-18.

Lewis, D. C. und K. M. Meyers (1996b). „Studies of platelet-bound and serum platelet-bindable immunoglobulins in dogs with idiopathic thrombocytopenic purpura.” Exp Hematol **24**(6): 696-701.

Lippman, S. M., F. C. Arnett, C. L. Conley, P. M. Ness, D. A. Meyers und W. B. Bias (1982). „Genetic factors predisposing to autoimmune diseases. Autoimmune hemolytic anemia, chronic thrombocytopenic purpura, and systemic lupus erythematosus.” Am J Med **73**(6): 827-40.

Lobetti, R. G. und T. Schoeman (2001). „Immune-mediated haemolytic anaemia: possible association with *Ancylostoma caninum* infection in three dogs.” J S Afr Vet Assoc **72**(1): 52-4.

Lortholary, O., D. Valeyre, M. Gayraud, P. Casassus, J. P. Battesti und L. Guillevin (1990). „Autoimmune haemolytic anaemia and idiopathic pulmonary fibrosis associated with HLA-B27 antigen.” Eur J Haematol **45**(2): 112-3.

Manzillo, V. F., S. Cappiello und G. Oliva (2006). „Tick-transmitted diseases in dogs: clinicopathological findings.” Parassitologia **48**(1-2): 135-6.

McCullough, S. (2003). „Immune-mediated hemolytic anemia: understanding the nemesis.” Vet Clin North Am Small Anim Pract **33**(6): 1295-315.

McMillan, R. (1983). „Immune thrombocytopenia.” Clin Haematol **12**(1): 69-88.

- McMillan, R. (1990). „Antigen-Specific Assays in Immune Thrombocytopenia.” Transfusion Medicine Reviews **IV**(2): 136-43
- McPherson, R.A. (1998): „Platelet Antibody Testing for Evaluating Immune Thrombocytopenias.” Am J Clin Pathol **109**: 123-6
- Mellanby, R. J., A. Holloway, J. Chantrey, M. E. Herrtage und J. M. Dobson (2004). „Immune-mediated haemolytic anaemia associated with a sarcoma in a flat-coated retriever.” J Small Anim Pract **45**(1): 21-4.
- Mellersh, C. S., C. Hitte, M. Richman, F. Vignaux, C. Priat, S. Jouquand, P. Werner, C. Andre, S. DeRose, D. F. Patterson, E. A. Ostrander und F. Galibert (2000). „An integrated linkage-radiation hybrid map of the canine genome.” Mamm Genome **11**(2): 120-30.
- Mellor, P. J., A. J. Roulois, M. J. Day, B. A. Blacklaws, S. J. Knivett und M. E. Herrtage (2005). „Neutrophilic dermatitis and immune-mediated haematological disorders in a dog: suspected adverse reaction to carprofen.” J Small Anim Pract **46**(5): 237-42.
- Meyer, D. und G. Thomson (2001). „How selection shapes variation of the human major histocompatibility complex: a review.” Ann Hum Genet **65**(Pt 1): 1-26.
- Miller, S. A., A. E. Hohenhaus und A. S. Hale (2004). „Case-control study of blood type, breed, sex, and bacteremia in dogs with immune-mediated hemolytic anemia.” J Am Vet Med Assoc **224**(2): 232-5.
- Moller, E. (1998). „Mechanisms for induction of autoimmunity in humans.” Acta Paediatr Suppl **424**: 16-20.
- Monier, J. C., C. Fournel, M. Lapras, M. Dardenne, T. Randle und C. M. Fontaine (1988). „Systemic lupus erythematosus in a colony of dogs.” Am J Vet Res **49**(1): 46-51.
- Moss, R. A. (1980). „Drug-induced immune thrombocytopenia.” Am J Hematol **9**(4): 439-46.
- Murken, J., T. Grimm und E. Holinski-Feder (2006). „Mutationen beim Mensch und ihre Folgen.” In Murken, J., T. Grimm u. E. Holinski-Feder (Hrsg.): Humangenetik, 7. Auflage, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart: 40-77
- Nagata, H. (1993). „Mechanism of thrombocytopenia in dogs infected with *Babesia gibsoni*.” Jpn J Vet Res **41**: 36.

Nakao, S., M. Yamaguchi, M. Saito, S. Yasue, S. Shiobara, T. Matsuda, M. Nitta und M. Sasaki (1992). „HLA-DR2 predicts a favorable response to cyclosporine therapy in patients with bone marrow failure.” Am J Hematol **40**(3): 239-40.

Nakao, S., H. Takamatsu, T. Chuhjo, M. Ueda, S. Shiobara, T. Matsuda, T. Kaneshige und H. Mizoguchi (1994). „Identification of a specific HLA class II haplotype strongly associated with susceptibility to cyclosporine-dependent aplastic anemia.” Blood **84**(12): 4257-61.

Naquet, P., J. Ellis, D. Tibensky, A. Kenshole, B. Singh, R. Hodges und T. L. Delovitch (1988). „T cell autoreactivity to insulin in diabetic and related non-diabetic individuals.” J Immunol **140**(8): 2569-78.

Nel, J. D., K. Stevens, A. Mouton und F. J. Pretorius (1983). „Platelet-bound IgM in autoimmune thrombocytopenia.” Blood **61**(1): 119-24.

Nepom, G. T. und W. W. Kwok (1998b). „Molecular basis for HLA-DQ associations with IDDM.” Diabetes **47**: 1177-84.

Nomura, S., F. Okamae, T. Matsuzaki, T. Ishida und S. Fukuhara (1998). „Autoimmune hemolytic anemia and HLA-DQ6.” Autoimmunity **28**(1): 57-8.

Nossal, G. J. (1983). „Cellular mechanisms of immunologic tolerance.” Annu Rev Immunol **1**: 33-62.

Nussbaum, R. L., R. R. McInnes und H. F. Willard (2001). „Patterns of Single-Gen Inheritance.” In Nussbaum, R. L., R. R. McInnes und H. F. Willard (Hrsg.): Thompson & Thompson Genetics in Medicine, 6. Auflage, W.B. Saunders, Philadelphia: 51-77

Ollier, W. E., L. J. Kennedy, W. Thomson, A. N. Barnes, S. C. Bell, D. Bennett, J. M. Angles, J. F. Innes und S. D. Carter (2001). „Dog MHC alleles containing the human RA shared epitope confer susceptibility to canine rheumatoid arthritis.” Immunogenetics **53**(8): 669-73.

Petersen-Jones, S. M. (1998). „A review of research to elucidate the causes of the generalized progressive retinal atrophies.” Vet J **155**(1): 5-18.

Phillips, J., B. Stephenson, M. Hauck und J. Dillberger (2007). „Heritability and segregation analysis of osteosarcoma in the Scottish deerhound.” Genomics **90**: 354-63.

Pirofsky, B. (1968). „Hereditary aspects of autoimmune hemolytic anemia; a retrospective analysis.” Vox Sang **14**(5): 334-47.

Pirofsky, B. (1969). "Autoimmunization and the autoimmune hemolytic anemias." In Pirofsky (Hrsg.): Autoimmunization and the autoimmune hemolytic anemias, 1. Auflage, Williams & Wilkins, Baltimore

Proudfoot, N. J., A. Furger und M. J. Dye (2002). „Integrating mRNA processing with transcription.“ Cell **108**(4): 501-12.

Putsche, J. und B. Kohn (2008). „Primary immune-mediated thrombocytopenia in 30 dogs (1997-2003).“ J Am Anim Hosp Assoc **44**(5): 250-7.

Quinnell, R. J., L. J. Kennedy, A. Barnes, O. Courtenay, C. Dye, L. M. Garcez, M. A. Shaw, S. D. Carter, W. Thomson und W. E. Ollier (2003). „Susceptibility to visceral leishmaniasis in the domestic dog is associated with MHC class II polymorphism.“ Immunogenetics **55**(1): 23-8.

Ramsdell, F. und B. J. Fowlkes (1990). „Clonal deletion versus clonal anergy: the role of the thymus in inducing self tolerance.“ Science **248**(4961): 1342-8.

Reimer, M. E., G. C. Troy und L. D. Warnick (1999). „Immune-mediated hemolytic anemia: 70 cases (1988-1996).“ J Am Anim Hosp Assoc **35**(5): 384-91.

Riehl, J., M. Okura, E. Mignot und S. Nishino (2000). „Inheritance of von Willebrand's disease in a colony of Doberman Pinschers.“ Am J Vet Res **61**(2): 115-20.

Rischewski, J. R., P. Imbach, M. Paulussen und T. Kuhne (2006). „Idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP): is there a genetic predisposition?“ Pediatr Blood Cancer **47**(5 Suppl): 678-80.

Roark, J. H., J. B. Bussel, D. B. Cines und D. L. Siegel (2002). „Genetic analysis of autoantibodies in idiopathic thrombocytopenic purpura reveals evidence of clonal expansion and somatic mutation.“ Blood **100**(4): 1388-98.

Romagnani, S. (2006). „Immunological tolerance and autoimmunity.“ Intern Emerg Med **1**(3): 187-96.

Rosenfeld, C.S., G. Nichols und D.C. Bodensteiner (1987). „Flow Cytometric Measurement of Antiplatelet Antibodies.“ Am J Clin Pathol **87**, 518-22

Rugman, F. P., D. Ashby und J. M. Davies (1990). „Does HLA-DR predict response to specific immunosuppressive therapy in aplastic anaemia?“ Br J Haematol **74**(4): 545-6.

Sanchez Fayos, J., E. Olavarria, A. Roman, A. Cabello, C. Soto und C. Paniagua (1994). „Idiopathic thrombocytopenic purpura in 5 members of a family.” Sangre (Barc) **39**(3): 215-7

Schwartz, R. S., E. M. Berkman und L. E. Silberstein (2000). „Autoimmune hemolytic anemias.” In Hoffman R, Benz EJ Jr, Shattil SJ, et al (Hrsg): Hematology: Basic principles and Practice, 3. Auflage, Churchill Livingstone, Philadelphia: 624.

Scott, M. A. (2000). „Immune-Mediated Thrombocytopenia.” In Feldman B.F., Zinkl J.G., Jain N.C. (Hrsg.): Schalm's Veterinary Hematology, 5.Ausgabe, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 478-86

Scott-Moncrieff, J. C., N. G. Treadwell, S. M. McCullough und M. B. Brooks (2001). „Hemostatic abnormalities in dogs with primary immune-mediated hemolytic anemia.” J Am Anim Hosp Assoc **37**(3): 220-7.

Semple, J. W. und J. Freedman (1991). „Increased antiplatelet T helper lymphocyte reactivity in patients with autoimmune thrombocytopenia.” Blood **78**(10): 2619-25.

Shamim, E. A. und F. W. Miller (2000). „Familial autoimmunity and the idiopathic inflammatory myopathies.” Curr Rheumatol Rep **2**: 201-11.

Shepshelovich, D. und Y. Shoenfeld (2006). „Prediction and prevention of autoimmune diseases: additional aspects of the mosaic of autoimmunity.” Lupus **15**(3): 183-90.

Shiina, T., H. Inoko und J. K. Kulski (2004). „An update of the HLA genomic region, locus information and disease associations: 2004.” Tissue Antigens **64**(6): 631-49.

Shulman, N. R. und D. M. Reid (1994). „Platelet Immunology.” In Colman, R.W., J. Hirsh, V.J. Marder u. E.W. Salzman (Hrsg.): Hemostasis and Thrombosis, Basic Principles and Clinical Practice, 3. Auflage, J.B. Lippincott Company, Philadelphia: 414-68.

Sinha, A. A., M. T. Lopez und H. O. McDevitt (1990). „Autoimmune diseases: the failure of self tolerance.” Science **248**(4961): 1380-8.

Spurkland, A., T. Tabira, K. S. Ronningen, B. Vandvik, E. Thorsby und F. Vartdal (1991). „HLA-DRB1, -DQA1, -DQB1, -DPA1 and -DPB1 genes in Japanese multiple sclerosis patients.” Tissue Antigens **37**(4): 171-3.

Stanworth, S. J., D. M. Turner, J. Brown, D. McCloskey, C. Brown, D. Provan, C. V. Navarrete und A. C. Newland (2002). „Major histocompatibility complex susceptibility genes and immune thrombocytopenic purpura in Caucasian adults.” Hematology **7**(2): 119-21.

- Stear, M. J., G. T. Innocent und J. Buitkamp (2005). „The evolution and maintenance of polymorphism in the major histocompatibility complex.” Vet Immunol Immunopathol **108**(1-2): 53-7.
- Stuart, M. J., R. H. Tomar, M. L. Miller und F. R. Davey (1978). „Chronic Idiopathic Thrombocytopenic Purpura: A Familial Immunodeficiency Syndrome?” JAMA **239**(10): 939-42.
- Takai, T. (2002). „Roles of Fc receptors in autoimmunity.” Nat Rev Immunol **2**(8): 580-92.
- Teichner, M., K. Krumbacher, I. Doxiadis, G. Doxiadis, C. Fournel, D. Rigal, J. C. Monier und H. Grosse-Wilde (1990). „Systemic lupus erythematosus in dogs: association to the major histocompatibility complex class I antigen DLA-A7.“ Clin Immunol Immunopathol **55**(2): 255-62.
- The MHC sequencing Consortium, T. M. s. (1999). „Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. The MHC sequencing consortium.” Nature **401**(6756): 921-3.
- Thorsby, E. (1997). „Invited anniversary review: HLA associated diseases.” Hum Immunol **53**(1): 1-11.
- Tizard, I. R. (2004a). „Organ-specific Autoimmune Diseases.“ In Tizard, I.R. (Hrsg.): Veterinary Immunology: An introduction, 7. Auflage, Elsevier Saunders, Philadelphia: 395-97.
- Tizard, I. R. (2004b). „Acquired Immunity: Antigen-Presenting Receptors.“ In Tizard, I.R. (Hrsg.): Veterinary Immunology: An introduction, 7. Auflage, Elsevier Saunders, Philadelphia: 67-78.
- Toolis, F., A. C. Parker, A. White und S. Urbaniak (1977). „Familial autoimmune haemolytic anaemia.” Br Med J **1**(6073): 1392.
- Van Heyningen, V. und P. L. Yeyati (2004). „Mechanisms of non-Mendelian inheritance in genetic disease.” Hum Mol Genet **13 Spec No 2**: 225-33.
- Verge, C. und G. S. Eisenbarth (1992). „Autocrine polyendocrine syndromes.” In Wilson, J.D. & Forster, D.W (Hrsg.): Williams Textbook of Endocrinology, 9. Auflage, W.B. Saunders, Philadelphia: 131

von dem Borne, A. E., F. M. Helmerhorst, E. F. van Leeuwen, H. G. Pegels, E. von Riesz und C. P. Engelfriet (1980). „Autoimmune thrombocytopenia: detection of platelet autoantibodies with the suspension immunofluorescence test.” Br J Haematol **45**(2): 319-27.

Vyse, T. J. und J. A. Todd (1996). „Genetic analysis of autoimmune disease.” Cell **85**(3): 311-8.

Wagner, J. L., S. A. DeRose, R. C. Burnett und R. Storb (1995). „Nucleotide sequence and polymorphism analysis of canine DRA cDNA clones.” Tissue Antigens **45**(4): 284-7.

Wagner, J. L., R. C. Burnett, J. D. Works und R. Storb (1996a). „Molecular analysis of DLA-DRBB1 polymorphism.” Tissue Antigens **48**(5): 554-61.

Wagner, J. L., R. C. Burnett, S. A. DeRose, L. V. Francisco, R. Storb und E. A. Ostrander (1996b). „Histocompatibility testing of dog families with polymorphic microsatellite markers.” Transplantation **62**: 876-77.

Wagner, J. L. (1996c). „Direct submission (NCBI): Canis familiaris MHC class IIA (DLA-DRB) gene, exon 1.“ Submitted (28-Jan-1996) John L. Wagner, Trans. Bio., FHCR, 11124 Columbia St., Seattle, WA 98104, USA: Acc.-No. AH003370.

Wagner, J. L. (1996d). „Direct submission (NCBI): Canis familiaris MHC class IIA (DLA-DQA) gene, exon 1.“ Submitted (05-JAN-1996) John L. Wagner, Transplantation Bio, Fred Hutch Cancer Resch Center, 1124 Columbia Street M 318, Seattle, WA 98104, USA: Acc.-No. AH003446.

Wagner, J. L., B. Hayes-Lattin, J. D. Works und R. Storb (1998). „Molecular analysis and polymorphism of the DLA-DQB genes.” Tissue Antigens **52**(3): 242-50.

Wagner, J. L., R. C. Burnett und R. Storb (1999). „Organization of the canine major histocompatibility complex: current perspectives.” J Hered **90**(1): 35-8.

Wagner, J. L., S. A. Creer und R. Storb (2000). „Dog class I gene DLA-88 histocompatibility typing by PCR-SSCP and sequencing.“ Tissue Antigens **55**(6): 564-7.

Wagner, J. L. (2003). „Molecular organization of the canine major histocompatibility complex.” J Hered **94**(1): 23-6.

Wagner, J. L., Y. Palti, D. DiDario und J. Faraco (2005). „Sequence of the canine major histocompatibility complex region containing non-classical class I genes.” Tissue Antigens **65**(6): 549-55.

Walter, M., E. Albert, M. Conrad, E. Keller, M. Hummel, K. Ferber, B. J. Barratt, J. A. Todd, A. G. Ziegler und E. Bonifacio (2003). „IDDM2/insulin VNTR modifies risk conferred by IDDM1/HLA for development of Type 1 diabetes and associated autoimmunity.” Diabetologia **46**(5): 712-20.

Wang-Rodriguez, J. und A. Rearden (1996). „Reduced frequency of HLA-DQ6 in individuals with a positive direct antiglobulin test.” Transfusion **36**(11-12): 979-84.

Ware, R. E. und T. A. Howard (1993). „Phenotypic and clonal analysis of T lymphocytes in childhood immune thrombocytopenic purpura.” Blood **82**(7): 2137-42.

Warren, R. W. und M. L. Collins (1988). „Immune hemolytic anemia in children.” Crit Rev Oncol Hematol **8**(1): 65-73.

Watts, C. (1997). „Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules.” Annu Rev Immunol **15**: 821-50.

Weinkle, T. K., S. A. Center, J. F. Randolph, K. L. Warner, S. C. Barr und H. N. Erb (2005). „Evaluation of prognostic factors, survival rates, and treatment protocols for immune-mediated hemolytic anemia in dogs: 151 cases (1993-2002).” J Am Vet Med Assoc **226**(11): 1869-80.

Weiss, D. J. und S. A. Smith (2002). „A retrospective study of 19 cases of canine myelofibrosis.” J Vet Intern Med **16**(2): 174-8.

Weiss, D. J. and J. L. Brazzell (2006). „Detection of activated platelets in dogs with primary immune-mediated hemolytic anemia.” J Vet Intern Med **20**(3): 682-6.

Whitney, K. M., S. A. Goodman, E. M. Bailey und C. D. Lothrop, Jr. (1994). „The molecular basis of canine pyruvate kinase deficiency.” Exp Hematol **22**(9): 866-74.

Wiesner, E. und S. Willer (1993). „Erbanalysen.” In Wiesner, E. und S. Willer (Hrsg.): Genetische Beratung in der tierärztlichen Praxis, 1. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart: 34-90

Wilkins, R. J., A. I. Hurvitz und W. J. Dodds-Laffin (1973). „Immunologically mediated thrombocytopenia in the dog.” J Am Vet Med Assoc **163**(3): 277-82.

Williams, D. und L. Maggio-Price (1984). „Canine idiopathic thrombocytopenia: clinical observations and long-term follow-up in 54 cases.” J Am Vet Med Assoc **185**(6): 660-3.

Wilson, S. J., W. E. Larsen, R. S. Skillman und T. R. Walters (1963). „Familial thrombocytopenic purpura.” Blood **22**: 827.

Wolffe, A. P. und M. A. Matzke (1999). „Epigenetics: regulation through repression.” Science **286**(5439): 481-6.

Wooley, E. J. S. (1956). „Familial idiopathic thrombocytopenic purpura.” Br Med J **1**: 440.

Zhou, B., H. Zhao, R. C. Yang und Z. C. Han (2005). „Multi-dysfunctional pathophysiology in ITP.” Crit Rev Oncol Hematol **54**(2): 107-16.

IX. Anhang

Fragebogen zur Evaluierung einer möglichen immunhämolytischen Anämie und / oder einer immunbedingten Thrombozytopenie beim Hund

Kontaktdaten des Besitzers:

Name, Vorname _____

Telefonnummer _____

E-Mail _____

Allgemeine Daten des Hundes:

Name des Hundes _____

Geschlecht _____

Geboren am _____

Evtl. verstorben am _____

Wenn ja, woran? _____

Anzahl der Geschwister _____

Waren Sie mit Ihrem Hund im Ausland? Wenn ja, wo?

Wurde mit Ihrem Hund gezüchtet? _____

Wie viele Würfe hatte Ihr Hund? _____

Spezielle Daten:

1. Hatte Ihr Hund jemals blutigen Durchfall? ja nein

2. Hatte Ihr Hund jemals blutigen Urin? ja nein

Wenn ja, wie wurde Ihr Hund behandelt?

3. Bekommt / bekam Ihr Hund oft bzw. leicht "blaue Flecken"? ja nein

4. Wurde Ihr Hund schon mal ohnmächtig? ja nein

Was waren mögliche Ursachen und worin bestand die Therapie?

5. Beobachten Sie zeitweise Blutungen an den Schleimhäuten/ Zahnfleisch? ja nein

6. Hat / hatte Ihr Hund sehr blasse Schleimhäute/ Zahnfleisch? ja nein

7. Wurde regelmäßig eine Vorsorgeuntersuchung durchgeführt? ja nein

Wenn ja, war sie irgendwann mal auffällig?

Inwiefern äußerten sich die Auffälligkeiten

8. Wurden Blutuntersuchungen bei Ihrem Hund durchgeführt? ja nein

9. Wenn ja, litt Ihr Hund jemals unter einer im Labor bestätigte Blutarmut?
Wenn ja, wie wurde sie behandelt? ja nein

10. Fand nach der Therapie eine Besserung des Hundes statt? ja nein

11. Wurden bei Ihrem Hund Blutparasiten gefunden (Babesien, Ehrlichien o.ä) ja nein

12. Litt Ihr Hund an einem Tumor? ja nein

Wenn ja, welcher und wie wird er behandelt?

13. Bekommt Ihr Hund eine Dauermedikation? ja nein

Wenn ja, welche und seit wann?

Bitte senden Sie den ausgefüllten Fragebogen per Fax an die Nummer: 0211-301 48 71

Oder per Post an folgende Adresse:

Meng Meng Liang

Millrather Weg 105

40699 Erkrath

DANKSAGUNG:

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Zunächst danke ich Frau Prof. Kohn für die Überlassung dieses Themas für meine Dissertation. Sie stand mir mit wertvollen Ratschlägen, kritischen aber hilfreichen Anmerkungen zur Seite und opferte viele Stunden für Korrekturarbeiten. Ebenso bedanke ich mich bei Herrn Prof. Brunberg, der mir die Möglichkeit gab, an der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere mein fachliches Wissen wesentlich zu erweitern.

Des Weiteren bin ich Frau Priv.-Doz. Ina Pfeiffer und ihren Mitarbeitern von der Universität Kassel zu Dank verpflichtet. Ohne sie hätte ich das Kernstück meiner Arbeit, die Sequenzierung der DNA-Proben, nicht durchführen können. Dieses Dankeschön gilt auch Prof. Leibold und der Arbeitsgruppe „Immunologie“ von der Universität Hannover. Mit ihrer Hilfe wurden die Untersuchungen der Blutproben unserer Patienten auf Tc-gebundene Antikörper durchgeführt. Mein Dank richtet sich auch an Herrn Dr. Wellmann von der Universität Kassel, der mir mit Geduld die mathematischen Grundlagen der Segregationsanalyse vermittelt hat.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei allen Cocker Spaniel- und Irish Setter-Züchtern, die mir sehr bei der Erfassung der Stammbäume geholfen haben. Hierbei möchte ich insbesondere Frau Glasspool erwähnen, die mir unermüdlich bei der Zusammenstellung aller Cocker Spaniel-Daten zur Seite stand.

Vielen Dank an alle Kolleginnen und Kollegen, Assistenzärzte und Mitarbeitern im Labor der Klinik für kleine Haustiere für die schöne gemeinsame Zeit.

Für die großzügige Unterstützung während meiner gesamten akademischen Laufbahn danke ich Familie Goder aus Neuss. Auch meinen Eltern und meinem Bruder gebührt meine tiefste Dankbarkeit für ihre Liebe und Zuneigung. Die Familie hat mir stets Halt gegeben.

Nicht zuletzt danke ich Patrick für seine Geduld, stundenlanges Korrekturlesen und seine liebevolle seelische Unterstützung. Er hat mir stets beiseite gestanden und mich auch in den schweren Phasen immer wieder ermutigt, diese Arbeit zu beenden.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Meng Meng Liang

Auszüge der Dissertation wurden bereits veröffentlicht:

LIANG, M.M., I. PFEIFFER, T. ROTH, B. KOHN (2006)
The major histocompatibility complex and its role in canine immune-mediated hemolytic anemia and thrombocytopenia
16th ECVIM-CA Congress, Amsterdam, 14. – 16.09.2006 (Poster)
Proceedings S. 200
ISBN: ISSN 1726-3204

LIANG, M.M., I. PFEIFFER, R. WELLMANN, T. ROTH, B. KOHN (2007)
Immunhämolytische Anämie und immunbedingte Thrombozytopenie beim Hund:
familiäres Auftreten und mögliche genetische Ursachen
53. Jahreskongress des DGK-DVG, Berlin, 15. – 18.11.2007 (Poster)
Referatezusammenfassung S. 134- 135
ISBN: 978-3-939902-49-2

LIANG, M.M., I. PFEIFFER, R. WELLMANN, T. ROTH, B. KOHN (2008)
Die canine immunhämolytische Anämie und immunbedingte Thrombozytopenie:
Studien zur Genetik und Vererbung
16. Jahrestagung der Fachgruppe "Innere Medizin und Klinische
Laboratoriumsdiagnostik". Gießen, 02. – 03.02.2008 (Vortrag)
Abstr. In: Tierärztl. Praxis (K), 36, 2008 S. A10