

Primäre immunhämolytische Anämie und immunbedingte Thrombozytopenie beim Hund: Studien zu Inzidenz, Gendefekt und Vererbung

M.M. Liang, I. Pfeiffer, B. Kohn

Einleitung

Immunhämolytische Anämie und immunbedingte Thrombozytopenie

Bei der primären immunhämolytischen Anämie (pIHA) und der immunbedingten Thrombozytopenie (pITP) handelt es sich um häufig diagnostizierte Bluterkrankungen beim Hund. Sie werden ursächlich auf eine Störung des Immunsystems zurückgeführt. Die durch Autoimmunreaktionen ausgelösten Erkrankungen beruhen auf Erkennungsfehlern der Immunabwehr, so dass irrtümlich körpereigene Zellen als „fremd“ erkannt werden. Sind hierbei die roten Blutkörperchen (Erythrozyten) betroffen, so handelt es sich um eine immunhämolytische Anämie, erfolgt ein Angriff des Immunsystems auf Blutplättchen (Thrombozyten), so spricht man von einer immunbedingten Thrombozytopenie. Beide Erkrankungen können auch parallel beim selben Tier auftreten, man spricht dann vom Evans' Syndrom. Während bei der sekundären IHA und ITP als mögliche Auslöser Infektionen, Impfungen, Neoplasien, Medikamente o.ä. vermutet werden (Lewis et al. 1995; Duval et al. 1996; Kohn et al.

2000), ist bei der primären IHA / ITP bis dato nicht bekannt, durch welche Faktoren der pathologische Mechanismus ausgelöst wird. Vermutet wird, wie bei anderen Autoimmunerkrankungen auch, ein Zusammenspiel von sowohl genetischer Prädisposition und Umweltfaktoren (Shepshelovich et al. 2006). Untersuchungen in der Humanmedizin haben gezeigt, dass ein ursächlicher Zusammenhang zwischen der Prädisposition für IHA / ITP und Mutationen im Major Histocompatibility Complex (MHC) besteht (Karpatkin et al. 1979; Gratama et al. 1984). Der MHC, der in Klasse I- und Klasse II-Moleküle unterteilt wird, spielt eine maßgebliche Rolle bei der Antigenpräsentation und bei der Erkennung von Antigenen durch T-Lymphozyten. Um körpereigene Zellen vor einem Angriff durch T-Zellen zu schützen, besteht eine immunologische Selbsttoleranz (Wing et al. 2006). Infolge von Mutationen im MHC kann der Mechanismus der Selbsttoleranz außer Kraft gesetzt werden, was zu Angriffen von T-Lymphozyten gegen körpereigene Zellen führen kann. (Sinha et al. 1990).

Die genetische Variabilität

Sowohl MHC Klasse I- als auch MHC Klasse II-Gene besitzen eine umfangreiche genetische Variabilität („genetischer Polymorphismus“). Sie entsteht aus Basenvariationen in bestimmten codierenden Bereichen der Gene. Als Folge eines Polymorphismus kann beim Genprodukt (Protein) ein Aminosäureaustausch auftreten. Einerseits sind Polymorphismen notwendig für den Erhalt der genetischen Variabilität und der genetischen Individualität, andererseits kann aber auch eine Genvariation und ein daraus resultierender Aminosäureaustausch schwerwiegende Konsequenzen haben, wie z.B. die Bildung eines funktionsgestörten Proteins. Die unterschiedlichen Ausprägungen eines Gens werden „Allele“ genannt.

Infolge vermehrter Linienzucht kann es bei manchen Hunderassen zu einer deutlichen Reduzierung der genetischen Variabilität und somit auch zu einer Einschränkung der immunologischen Individualität kommen. Als Folge dessen sind Störungen des Immunsystems möglich.

Vermehrtes Vorkommen der IHA und ITP bei bestimmten Rassen

Für bestimmte Hunderassen ist eine genetische Prädisposition sowohl für die primäre IHA (Engelbrecht et al. 2002) als auch für die primäre ITP bekannt (Kohn et al. 2000). Hierzu gehört insbesondere der Cocker Spaniel, was durch zahlreiche Studien aus Deutschland, Großbritannien und den USA belegt wurde (Klag et al. 1993; Day 1996; Carr et al. 2002; Miller et al. 2004; Weinkle et al. 2005). Daneben wurde über ein gehäuftes bzw. familiäres Vorkommen von ITP bzw. IHA bei Irish Settern (Kohn, unveröffentlicht),

Pudeln und Bobtails (Williams et al. 1984; Jans et al. 1990) sowie verschiedenen weiteren Rassen berichtet.

Ziel der Studie

Ziel dieser Studie ist es, zu untersuchen, ob genetische Unterschiede im Bereich des MHC zwischen gesunden und an pIHA bzw. pITP erkrankten Hunden bestehen. Es soll geklärt werden, ob die bei erkrankten Hunden auftretenden Mutationen im Bereich des MHC im ursächlichen Zusammenhang mit der Krankheit stehen könnten. Sollte dies der Fall sein, wäre ein weiteres Ziel, einen genetischen Test zur Prüfung von Trägartieren zu entwickeln, um die Krankheit mit Hilfe von züchterischen Maßnahmen zu eliminieren. Dieser Test könnte sowohl für präventive als auch für züchterische Zwecke durchgeführt werden.

Material und Methoden

Proben

Zwischen 1998 und 2006 wurden an der Klinik für kleine Haustiere der FU Berlin Blutproben von erkrankten und gesunden Tieren aus einer Cocker Spaniel-Familie und einer Irish Red Setter-Familie gesammelt. Die Diagnose IHA wurde mittels des Nachweises einer persistierenden Erythrozyten-Agglutination, zahlreichen Sphärozyten im Blutausschuss und durch einen positiven direkten Coombs-Tests gestellt. Eine ITP wurde beim Vorliegen einer Thrombozytopenie und des positiven Nachweises von Thrombozyten-gebundenen Antikörpern (Arbeitsgruppe Immunologie) diagnostiziert. Bestmöglich wurden potentielle Auslöser einer sekundären IHA bzw. ITP durch Röntgen- und Ultraschalluntersuchun-

gen sowie Testung auf verschiedene Infektionskrankheiten ausgeschlossen. Neben Blutproben von ausgewählten Cocker Spaniern und Irish Red Settern wurden auch Proben von gesunden und erkrankten Hunden anderer Rassen in die Studie einbezogen, um rasse-spezifische MHC-Merkmale auszuschließen.

Molekularbiologische Untersuchungen

Es wurde eine diagnostische Sequenzierung der codierenden Bereiche des caninen MHC durchgeführt. Dazu erfolgte eine Extraktion der DNA und die Vervielfältigung der für die Studie interessanten Bereiche des MHC mit Hilfe einer Polymerasekettenreaktion. Diese Abschnitte wurden dann nach verschiedenen Arbeitsschritten der Aufbereitung, Auftrennung, Duplikation und Reinigung über einen automatischen Sequenzierer analysiert. Die genetische Struktur des MHC wurde somit visualisiert und in elektronische Daten umgewandelt, die Informationen über die Basensequenz der einzelnen MHC-Bereiche der untersuchten Hunde wiedergeben. Eine Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der Software BIOEDIT (Carlsbad, CA, USA), die Sequenzen wurden auf Mutationen untersucht und gesunde Tiere mit kranken verglichen. Die Benennung der Loci sind in Tab. 1 aufgeführt. Die statistische Signifikanz wurde mit einem zweiseitigen Fischer-Test, die DLA-Allelfrequenzen über das Programm GENETIX (Universität Montpellier, F) berechnet und graphisch dargestellt.

Ergebnisse

Probanden

Es wurden anhand von Ahnentafeln und Züchtergesprächen ein Stammbaum einer **English Cocker Spaniel-Familie** mit 155 Familienmitgliedern und ein weiterer Stammbaum einer **Irish Red Setter-Familie** mit 117 Familienmitgliedern erstellt. In beiden Familien waren auffällig viele Hunde an der IHA und/oder der ITP erkrankt. Die Familien wurden in Unterbereiche aufgeteilt, um eine mögliche Vererbung detaillierter darstellen zu können.

Der autosomal-rezessive Vererbungsmodus lässt sich höchstwahrscheinlich in den meisten Fällen auf die Familien anwenden (Abb. 1). Eine Teilfamilie wies jedoch keinen autosomal-rezessiven Erbgang der Erkrankung auf. Ein Beweis für die Theorie einer mendelschen Vererbung steht aus, solange der Nachweis lediglich auf phänotypischen Merkmalen basiert. Genotypische Merkmals-träger können erst dann ausgemacht werden, wenn nachgewiesen worden ist, auf welche möglichen Defektgene die pIHA und die pITP zurückzuführen sind.

MCH-Kandidatenscreen

MHC I- und MHC II-Kandidatengene wurden in vorliegender Studie sequenziert, miteinander verglichen und hinsichtlich genetischer Mutationen überprüft (Tab. 1 und Tab. 2). In folgenden Tabellen sind alle erfolgreich untersuchten Loci mit zugehörigen Polymorphismen aufgeführt.

- Weiblicher Hund, keine Hinweise für IHA oder ITP
 - Männlicher Hund, keine Hinweise für IHA oder ITP
 - pHA
 - ◐ pHA/ITP (Evans' Syndrom)
- AA = Genotyp gesund, Phänotyp gesund
 Aa = Genotyp Merkmalsträger, Phänotyp gesund
 aa = Genotyp krank, Phänotyp krank

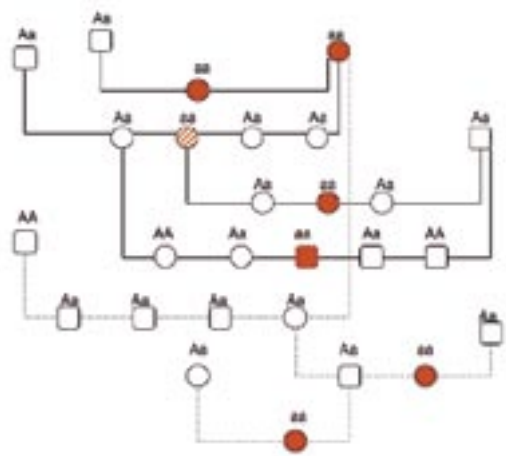


Bild 1: Ausschnitt der Cocker Spaniel-Familie mit erkrankten und gesunden Tieren und möglichem Genotyp

MHC I

Tabelle 1: Untersuchte Loci des MHC I mit Anzahl der gefunden Polymorphismen

Kandida-tengen	PCR- Produkte	Größe (bp)	Status Polymorphismus	Untersuchte Exone
DLA 12	DLA 12A	562	6 Polymorphismen	Teil I des 1. Exons
	DLA12D	815	Ergebnisse unzureichend für eine Auswertung	Teil II des 1. Exons
	DLA 12E	1034	17 Polymorphismen	Exon 1 und 2
	DLA12F	860	5 Polymorphismen	Exon 2
	DLA12I	837	2 Polymorphismen	Exon 5
	DLA 12K	555	4 Polymorphismen	Exon 7

DLA 64	DLA64A	1021	1 Insertion	Teile von Exon 4
	DLA64 B	860	3 Polymorphismen	Exon 4, 5 6
	DLA64D	616	11 Polymorphismen + 1 Deletion	Exon 7 und 8
	DLA64 E	855	Ergebnisse unzureichend für Auswertung	
	DLA64 F	584	2 Polymorphismen + 1 Deletion	Teile von Exon 2 und 3
	DLA64 G	568	Ergebnisse unzureichend für Auswertung	

DLA 79	DLA 79A	725	Ergebnisse unzureichend für Auswertung	Enthält kein Exon
	DLA 79B	930	8 Polymorphismen + 1 Deletion	Exon 1 und 2
	DLA 79D	764	Monomorph	Teile von Exon 3
	DLA 79F	300	1 Polymorphismus	Exon 4
	DLA 79G	752	Monomorph	Exon 5
	DLA 79H	933	Monomorph	Exon 7 + 8
	DLA 79I	429	Monomorph	Kein Exon

DLA 88	DLA88A	705	Ergebnisse nicht auswertbar	Exon 3,4,5
--------	--------	-----	-----------------------------	------------

MHC II

Table 2: Untersuchte Loci des MHC II mit Anzahl der gefundenen Polymorphismen

Kandidaten- gen	PCR-Produkte	Größe (bp)	Status Polymorphismus	Untersuchte Exone
DLA-DRA	DRA1A	551	1 Polymorphismus	Exon 1
	DRA1B	241	3 Polymorphismen	Exon 2
	DRA1C	756	2 Polymorphismen	Exon 3
	DRA1D	214	monomorph	Exon 4

DLA-DRB	DRB1	545	1 Polymorphismus	Exon 1
	DRB1b	270	13 Polymorphismen	Exon 2
DLA-DQA	DQA1	581	2 Polymorphismen	Exon 1
	DQA1b	246	5 Polymorphismen 1 Deletion	Exon 2
DLA-DQB	DQB1	1018	5 Polymorphismen + 1 Insertion	Exon 1
	DQB1b	267	Ergebnisse unzureichend für Auswertung	Exon 2

Statistische Auswertung

Bei der statistischen Auswertung wurde festgestellt, dass kein Genlocus in Zusammenhang mit einer Erkrankung der Hunde steht. Die Odds Ratio (OR), eine Bestimmung der Chance, dass bestimmte Allele in positiver Korrelation mit IHA oder ITP stehen, ergab, dass kein Allel signifikant häufiger bei kranken im Vergleich zu gesunden Tieren auftrat.

Die DLA-Allelfrequenzen wurden über das Softwareprogramm „GENETIX“ berechnet. Im Gegensatz zur Berechnung der OR, die nur das Risiko einer Erkrankung für ein einzelnes Allel berechnet, wird bei GENETIX das Vorkommen mehrerer Allele bei kranken und gesunden Tieren ausgewertet. So kann z.B. ein möglicher Zusammenhang zwischen allen Allelen eines MHC und dem Vorliegen einer IHA- oder ITP-Erkrankung dargestellt werden.

Erfasste man alle Allele der untersuchten MHC II-Loci in ihrer Gesamtheit, so konnten bildlich alle kranken Cocker Spaniel in einem Bereich angehäuft dargestellt werden (Cluster), während gesunde Tiere diffus in der ganzen Matrix verteilt waren.

Diskussion

Vererbung

Bei den meisten Familienmitgliedern beider Pedigrees konnte **höchstwahrscheinlich ein autosomal-rezessiver Erbgang der IHA / ITP rekonstruiert werden**. Es ist davon auszugehen, dass in der Ätiologie beider Erkrankungen eine genetische Komponente beinhaltet ist. Dass nicht alle Untergruppen des Pedigrees diesem Schema folgen, könnte einerseits dadurch erklärt werden, dass ein Ausbruch der Krankheiten bei manchen Hunden

nicht erkannt wurde bzw. ein Hund an einer anderen Erkrankung starb, bevor die Symptome einer IHA oder ITP auftreten konnten. Da nicht alle Hunde des vorliegenden Stammbaums auf das Vorliegen von erythrozyten- oder thrombozyten-gebundenen Antikörpern untersucht wurden, besteht die Möglichkeit, dass kranke Hunde übersehen wurden. Des Weiteren ist zu bedenken, dass die Ätiologie beider Erkrankungen sowohl durch genetische als auch durch Umweltfaktoren bedingt sein kann (Shepshelovich et al. 2006). Da die Welpen und auch die erwachsenen Hunde in unterschiedlichen Lebensräumen und unter verschiedenen Bedingungen aufwachsen und leben, wäre es möglich, dass auch bei einer genetischen Prädisposition bei betroffenen Hunden keine Erkrankung ausbricht, wenn ein bestimmter Trigger aus der Umwelt nicht existiert. **Vorhandene Daten schließen daher trotz einer Nichteinhaltung der Mendel'schen Gesetze eine autosomal-rezessive Vererbung nicht aus.**

Zusammenhang zwischen MHC I- und MHC II-Allelen und dem Auftreten der IHA und der ITP

In dieser Studie konnten eine Vielzahl neuer Allele, besonders im Bereich des MHC I, beschrieben werden. Allerdings wurde keine einzelne Mutation gefunden, die im Vergleich zu gesunden Hunden gehäuft bei kranken Tieren vorkommt. Viele Polymorphismen, die in dieser Studie entdeckt wurden, waren nur bei einigen Rassen, besonders bei einem an IHA erkranktem Staffordshire Terrier, zu finden. Deutliche Allelunterschiede fanden sich bei vielen Loci zwischen den Cockern und

den Settern. Daraus lässt sich eine Rassenzugehörigkeit von bestimmten Loci ableiten. Doch um dieses zu beweisen, bedarf es einer umfangreicheren Stichprobe mit nicht verwandten Hunden.

Für den MHC I existieren außer für DLA-88 noch keine publizierten Allele. DLA-88 konnte in vorliegender Studie nicht beurteilt werden, da die Ergebnisse trotz wiederholten Primerdesigns und Temperaturanpassungen unzureichend waren. Für die anderen Kandidatengene DLA-12, DLA-79 und DLA-64 wurden die Polymorphismen einzeln für alle gesunden und kranken Tiere verglichen. Der Abgleich der Basenfolgen bei allen Hunden erbrachte keine Mutation, die besonders häufig bei kranken Hunden auftrat.

In humanmedizinischen Studien wurde ein Zusammenhang zwischen dem MHC Klasse II-Gen DRw2 und der ITP gefunden (Karpatskin et al. 1979). Eine ursächliche Verknüpfung eines einzelnen MHC II-Allels mit dem Auftreten von IHA / ITP konnte in vorliegender Studie jedoch nicht festgestellt werden. Statistisch betrachtet konnte ein Cluster von allen erkrankten Cocker Spaniern unter Einbeziehung aller Allele der Loci DLA-DRA, DLA-DQA und DLA-DQB gegenüber gesunden Probanden dargestellt werden. Um auszuschließen, dass es sich um einen Zufall oder ein familienspezifisches Phänomen handelt, ist es zwingend notwendig, eine größere Stichprobe mit kranken und nicht verwandten Hunden verschiedener Rassen zu screenen. Sollte sich der Verdacht bestätigen, muss eine genetische Prädisposition auf

wenige Loci eingeschränkt werden. Nichtsdestotrotz scheint die Ätiologie der IHA und ITP multifaktoriell bedingt zu sein, da die Ergebnisse zurzeit noch nicht eindeutig sind. Daher wäre es hilfreich, weitere Gene des Immunsystems, die in der Kaskade der Immunabwehr beteiligt sind, zu prüfen.

*Prof. Dr. Barbara Kohn
M.M. Liang I.
Klinik für kleine Haustiere
FU Berlin
Oertzenweg 19b
14163 Berlin*

*Dr. Ina Pfeiffer
Institut für Biologie
Universität Kassel
Heinrich-Plett-Str. 40
34132 Kassel*