

## Studie zur genetischen Diversität und Populationsstruktur des Leonbergers

Anna Letko<sup>1</sup>, Katie M. Minor<sup>2</sup>, Vidhya Jagannathan<sup>1</sup>, Franz R. Seefried<sup>3</sup>, James R. Mickelson<sup>2</sup>, Pieter Oliehoek<sup>4</sup>, and Cord Drögemüller<sup>1</sup>

1 Institute of Genetics, Vetsuisse Faculty, University of Bern, 3012 Bern, Switzerland

2 Department of Veterinary and Biomedical Sciences, College of Veterinary Medicine, University of Minnesota, St. Paul, Minnesota, 55108, USA

3 Qualitas AG, 6300 Zug, Switzerland

4 Dogs Global, Wageningen, the Netherlands

Der Leonberger gehört zu den grossen Hunderassen, die in den 1850er Jahren in Deutschland als Wach-, Begleit- und Familienhunde entstanden. Seine Beliebtheit hat nach dem Zweiten Weltkrieg zu seiner aktuellen Population von weltweit rund 30.000 Hunden geführt.

Die Rasse zeigt neurodegenerative Erkrankungen und Krebserkrankungen (Hämangiosarkome und Osteosarkome), was mit grosser Wahrscheinlichkeit auf die begrenzte genetische Vielfalt zurückzuführen ist. Die Genvarianten ARHGEF10 **LPN1** und GJA9 **LPN2** erklären etwa ein Drittel der mit Polyneuropathie diagnostizierten Leonberger-Fälle. Eine rezessiv vererbte Genvariante NAPEPLD verursacht eine juvenile Leukoencephalomyelopathie **LEMP**.

Es gibt bis anhin keinen wissenschaftlichen Bericht über Parameter der Genetik und die sogenannte genomische Architektur der heutigen Population.

Für unsere Untersuchungen haben wir umfangreiche Stammbaumaufzeichnungen von 142.072 Leonbergern, die bis 2016 geboren wurden (das älteste aufgezeichnete Geburtsdatum datiert aus dem Jahr 1880), sowie umfassende DNA-Analysedaten, genauer sogenannte SNP-Array-Genotypdaten von 1.203 Hunden und Ganzgenomsequenzen (WGS Whole genome sequencing) von 39 Hunden, ausgewertet.

### Stammbaumanalysen

Die Stammbaumanalysen identifizierten 22 Gründertiere und zeigten einen offensichtlichen Vererber-, Rüden-, oder Vätereffekt und einen klaren Bottleneck Event während der 1940er Jahre, als 1946 nur 17 Hunde registriert wurden, was zu dem jüngsten hohen Verwandtschaftsgrad unter den Leonbergern führte. *(Der beliebte Vater-Effekt (oder das beliebte Deck-/Vater-Syndrom) tritt auf, wenn ein Tier mit wünschenswerten Eigenschaften wiederholt gezüchtet wird. In der Hundezucht ist ein Rüde, der angesehene Wettbewerbe gewinnt, sehr gefragt, da die Züchter glauben, dass der Vater die Gene besitzt, die für die Produktion von Champions erforderlich sind. Der beliebte Rüde deckt viele Hündinnen und produziert viele Nachkommen. Dies kann dazu führen, dass sich unentdeckte, unerwünschte genetische Merkmale in der Zucht schnell innerhalb des Genpools ausbreiten. Der Vätereffekt kann auch die genetische Vielfalt durch den Ausschluss anderer Rüden verringern)*

**Die insgesamt 22 identifizierten Gründertiere (10 Rüden, 12 Hündinnen), von denen 3 (2 Rüden, 1 Hündin) trugen zusammen zu fast 46 % zur letzten Kohorte (Geburtsjahr 2016) bei.**

Eine begrenzte Anzahl von Vorfahren mit einem hohen genetischen Beitrag hat einen grossen Einfluss auf die Verwandtschaft innerhalb der Rasse, was zu Inzucht aufgrund dieser Verwandtschaft und damit zur Inzuchtdepression führt. **Mögliche krankheitsverursachende genetische Varianten, die diese Vorfahren trugen, sind nun wahrscheinlich in der gesamten Population verbreitet.**

Der Verlust an genetischer Diversität sowie die Möglichkeit, die Diversität zu erhöhen, wurde anhand der mittleren Verwandtschaft (*MK Meankinship*) mit der tabellarischen Methode bewertet, wie zuvor von Oliehoek et al. beschrieben. MK der aktuellen Population wurde für 31.832 ausgewählte Hunde berechnet, von denen angenommen wird, dass sie für die Zucht zur Verfügung stehen und zum Zeitpunkt der Berechnung am Leben sind. Bei vor 2009 geborenen Rüden und vor 2011 geborenen Hündinnen wurde davon ausgegangen, dass sie nicht mehr in der Zucht sind. Sie wurden zusammen mit den verstorbenen Hunden ausgeschlossen.

Der Unterschied zwischen den minimalen (0,29) und maximalen (0,33) Werten der MK war gering, und es wurden keine Linien gefunden, die in hohem Maße nicht mit der Gesamtpopulation verwandt wären. Zur besseren Visualisierung wurden drei Gruppen mit den Farben grün (MK<0,31), gelb (MK=[0,31-0,32]) und orange (MK>0,32) gebildet. Der Anteil der Hunde mit höherer oder niedrigerer

MK unterschied sich in den verschiedenen Ländern. Die farbkodierten MK-Koeffizienten sind in die Worldwide Independent Leonberger Database eingeflossen.

Der durchschnittliche stammbaumbasierte Inzuchtkoeffizient von 0,29 (F\_PED) zeigte zusammen mit der durchschnittlichen Verwandtschaft von 0,31 (MK Meankinship) einen dramatischen Verlust der genetischen Vielfalt und einen stetigen Anstieg über die analysierten Jahre, wobei F\_PED in der letzten Kohorte (Geburtsjahrgang 2016) auf 0,29 geschätzt wurde (**Abbildung 1A**). Ein beliebter Vater wurde definiert als ein Rüde, der mindestens 33 Welpen gezeugt hat, was 5 Würfen auf der Grundlage der beobachteten durchschnittlichen Wurfgröße entspricht. Für 5.456 Vererber, die zwischen 1894 und 2016 geboren wurden, waren Informationen über die Anzahl der Nachkommen verfügbar.

**Ein populärer Vaternoteffekt war offensichtlich, da ein Viertel aller Väter zwei Drittel aller Nachkommen produzierte (Abbildung 1B).** Zusätzlich, obwohl der 1985 geborene Top-Zuchtrüde 434 Hunde gezeugt hat, haben der zweite und dritte Top-Zuchtrüde, beide 2003 geboren, 394 bzw. 337 registrierte Welpen gezeugt. Dieser Trend ist in der gesamten Zuchtgeschichte des Leonbergers sichtbar: die Top 27 Vererber, die zwischen 1976 und 2010 geboren wurden, haben jeweils mehr als 200 Welpen produziert (was mindestens 30 Würfen pro Vererber entspricht). Zusätzlich war das Todesdatum von 4.783 Hunden (2.453 Hündinnen und 2.330 Rüden) bekannt, die zwischen 1959 und 2019 geboren wurden. Die Lebenserwartung wurde weiterhin für die Jahre 1989-2004 ausgewertet, in denen mehr als 100 Datensätze verfügbar waren und davon ausgegangen werden konnte, dass es keine lebenden Hunde mehr gab. Diese Kohorte umfasste 3.044 Hunde (1460 Rüden und 1584 Hündinnen) und ergab eine mittlere Lebenserwartung von 8,2 (Median 8,5) Jahren, wobei die Lebenserwartung der Rüden (Mittelwert=7,9) niedriger war als die der Hündinnen (Mittelwert=8,5). Darüber hinaus wurde ein langsamer, kontinuierlicher Rückgang über die Zeit beobachtet, von durchschnittlich 9,4 Jahren im Jahr 1989 auf 7,7 Jahre im Jahr 2004 (Median: 10,1 bis 8,2 Jahre) (**Abbildung 1C**).

### **Globale Gesundheitsumfrage**

Eine globale Umfrage zur Gesundheit bestätigte eine hohe Prävalenz (Krankheitshäufigkeit) von Krebs sowie neurologischen Erkrankungen. Ein Online-Fragebogen wurde an die Mitglieder verschiedener europäischer und amerikanischer Leonberger-Zuchtvereine verschickt und darüber hinaus auch periodisch über Facebook beworben. Ein Link zu einer internetbasierten Version des Fragebogens in sieben Sprachen wurde bereitgestellt, um eine weltweite Reichweite von Besitzern und Züchtern sicher zu stellen. Der Fragebogen besteht aus drei Hauptteilen, in denen allgemeine Informationen über den Hund, Anzeichen für spezifische Krankheiten wie neurologische Störungen und Krebs sowie die gesamte medizinische Vorgeschichte der einzelnen Hunde einschließlich des Todesdatums abgefragt werden.

Wir sammelten zwischen 2013 und 2019 medizinische Informationen über die gesamte Lebensdauer von 2.726 Leonbergern. Von diesen litten 1.334 (48,9 %) Hunde an mindestens einer Beeinträchtigung des Gesundheitszustandes. Einzelne Hunde (n=544) litten jedoch oft an mehreren Störungen. Bei insgesamt 586 (21,5 %) Hunden wurde ein Tumor oder Krebs festgestellt, wobei das Osteosarkom (42,5 %) und das Hämangiosarkom (22,5 %) die beiden häufigsten Arten waren. Andere häufig auftauchende Gesundheitsprobleme waren orthopädischer (15,8 %), neurologischer (14,8 %), endokrinologischer (5,6 %), verdauungsbedingter (4,2 %) und kardialer (4,1 %) Natur. Die häufigsten spezifischen Störungen in jeder Systemkategorie waren Arthritis (222 Fälle), Polyneuropathie (362 Fälle), Hypothyreose (142 Fälle), Magentorsion (54 Fälle) und dilatative Kardiomyopathie (45 Fälle). Die meisten von Polyneuropathie betroffenen Hunde (71,0 %) zeigten sowohl Atem- als auch Ganganomalien, während 14,6 % nur eine Larynxlähmung oder Atemprobleme und 14,4 % nur Ganganomalien aufwiesen.

Bei anderen Hunderassen haben genetische Assoziationsstudien zur Identifizierung genetischer Risikofaktoren eine starke Assoziation mit bestimmten Genomregionen ergeben; z. B. für Osteosarkome. Ähnliche Studien könnten beim Leonberger durchgeführt werden, um Verknüpfungen und Marker für die Selektion gegen das erhöhte Risiko bestimmte Krebsformen zu entwickeln, zu entschlüsseln. Auch die Hypothyreose wurde recht häufig festgestellt, was frühere

Berichte über diese Rasse bestätigen. Dagegen traten Erkrankungen wie Herzrhythmusstörungen, die zum plötzlichen Herztod führen und von denen berichtet wurde, dass sie bei Leonbergern gehäuft vorkommen, in unserer Untersuchung nur sporadisch auf. Neben den orthopädischen Erkrankungen, von denen bekannt ist, dass sie polygenetischer Natur sind, waren neurologische Erkrankungen die zweithäufigste Krankheitskategorie beim Leonberger, mit überwiegend verschiedenen Formen der Polyneuropathie, wie bereits berichtet.

Eine kürzlich von der Leonberger Health Foundation International durchgeführte Studie, die auf mehr als 1.000 Hunden aus 24 verschiedenen Ländern basierte, wies auch auf die hohe Prävalenz bestimmter Krebsformen wie Osteosarkom und Hämangiosarkom sowie neurologischer Störungen wie Kehlkopflähmung und andere Formen der Polyneuropathie hin. Obwohl diese beiden Erhebungen nicht wirklich umfassend und daher möglicherweise nicht vollkommen repräsentativ waren, wurden sie unabhängig voneinander zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt, weshalb wir sie als angemessene Schätzungen der tatsächlichen Häufigkeiten betrachteten.

### **Analyse der SNP-Array-Genotypdaten**

SNP-Daten ermöglichen auch die Charakterisierung von Runs of Homozygotie (ROH), die eine Quantifizierung des Ausmaßes der Inzucht bei diploiden Individuen ermöglichen (*Diploide Zellen weisen einen doppelten Chromosomensatz (46) auf. Die meisten Säugetierzellen sind diploid*), insbesondere im Fall von unvollständigen, unzuverlässigen oder fehlenden Stammbauminformationen. **Darüber hinaus kann die Länge der beobachteten ROH-Segmente zur Unterscheidung zwischen heutiger (gegenwärtiger) und alter Inzucht verwendet werden und erlaubt Rückschlüsse auf die Populationsgeschichte von Populationen bzw. Rassen.**

Die SNP-basierte Analyse der Segmente der Homozygotie (ROH) identifizierte 125'653 ROHs mit einer durchschnittlichen Länge von 5,88 Mb und bestätigte einen durchschnittlichen Inzuchtkoeffizienten von 0,28 (*d.h. umfangreiche Abschnitte des Leonberger Genoms sind auf beiden DNA-Strängen abstammungsidentisch*).

Die 1.203 Hunde, die auf SNP-Arrays genotypisiert wurden, repräsentierten die Leonberger-Population gut, da sie im Laufe der letzten 10 Jahre und aus verschiedenen Ländern kamen. Aufgrund der großen geografischen Entfernungen zwischen den Hunden wurden Subpopulationen erwartet: 579 Proben (48,1 %) kamen aus den USA und Kanada, 602 Proben (50,0 %) kamen aus europäischen Ländern und 22 Proben (1,8 %) kamen aus Australien, Neuseeland oder Japan. Die multidimensionale Skalierung (MDS) der paarweisen genetischen Abstände zeigte jedoch keine offensichtliche Clusterung (*Gruppenbildung*) (**Figure 2A**), obwohl eine kleine Gruppe nordamerikanischer Hunde sich nicht vollständig mit dem Rest der Population überschneidet. Die sich nicht überlappende Hundegruppe wurde mehrheitlich vor dem Jahr 2000 geboren, während die erst kürzlich geborenen Hunde näher an der europäischen Population zu sein scheinen. Zusätzlich muss der offensichtliche Unterschied in der Anzahl der genotypisierten Hunde, die im oder vor dem Jahr 2000 geboren wurden, aus Nordamerika (199 von 579) und andererseits aus Europa (88 von 602) berücksichtigt werden; diese Disproportion (Missverhältnis) in der Probenmenge könnte zu der nicht vollständigen Überlappung beitragen.

### **Analyse der runs of homozygotie (ROH)**

Der ROH-basierte genomische Inzuchtkoeffizient ( $F_{ROH}$ ) lag im Durchschnitt bei 0,28 (mit Bereich [0,05-0,47]). **Darüber hinaus deckte der Vergleich von  $F_{PED}$  (Pedegree, Stammbaum) und  $F_{ROH}$  einige Hunde mit offensichtlich falschen Stammbaumeinträgen auf und ermöglichte die Schätzung der Inzucht bei Individuen mit fehlenden oder unbekanntem Stammbäumen (Abbildung 2B).** Insgesamt wurden 125.653 ROHs mit einer durchschnittlichen Länge von 5,88 Mb (Bereich von [1,00-90,17]) identifiziert. ROHs konnten aufgrund der unterschiedlichen Größen in fünf Gruppen eingeteilt werden. Die meisten der entdeckten ROHs (53,6 %) waren kleiner als 4 Mb und 16,1 % waren größer als 10 Mb (**Abbildung 2C**). Die Anzahl der ROHs pro Chromosom reichte von 1.419 auf Chromosom 38 bis 5.303 auf Chromosom 1; der Anteil der gesamten chromosomalen Beteiligung in homozygoten Regionen im Verhältnis zu seiner chromosomalen Größe war am höchsten bei Chromosom 33 (16,9 %) und am niedrigsten bei Chromosom 1 (6,6 %) (**Abbildung 2D**). Im Durchschnitt wurden 104,4 ROHs pro Hund festgestellt, wobei die Spanne von 37 bis 177 reichte. Die Gesamtlänge des ROH über

das Genom pro Individuum betrug im Durchschnitt 614 Mb und reichte von 104,6 bis 1028,2 Mb. Der Anteil der Hunde mit einem SNP innerhalb eines ROH variierte über die 38 Autosomen. Auf Chromosom 10 teilten 1.047 Hunde (87,0 %) einen ROH über ~302kb. Nur ein Protein-kodierendes Gen ist in dieser Region annotiert, TMEM131, das für ein Transmembranprotein kodiert, von dem nicht bekannt ist, dass es mit einer Krankheit in Verbindung steht. Seine vermutete Funktion liegt in der Entwicklung und Differenzierung von T-Zellen sowie in der Kollagenrekrutierung und -sekretion. Eine ~236kb große Region am Ende von Chromosom 26 wurde von 1.000 (83,1 %) Hunden geteilt (**Abbildung 2E**). Allerdings sind in dieser Region nur zwei Pseudogene und eine uncharakterisierte ncRNA annotiert, von denen BLAST-basierte Vergleiche keine signifikante Sequenzähnlichkeit zum Menschen ergaben.

Während längere ROH-Segmente (~10 Mb) als Ergebnis Inzucht der jüngeren Zeit auftreten, zeigen kürzere ROHs (<2 Mb) genomische Regionen an, die kennzeichnend für die Spuren der bereits länger bestehenden Inzucht sind, diese abstammungsidentischen Genomabschnitte wurden durch Rekombinationsereignisse während zahlreicher Generationen deutlich verkürzt. Bei den untersuchten Leonberger-Hunden machen die 1-2 Mb großen Segmente etwa 25 % der entdeckten ROHs aus, während etwa 20 % der Segmente länger als 8 Mb sind (**Abbildung 2C**), was sowohl auf frühere als auch auf neue Inzucht hinweist. Dies steht im Einklang mit der bekannten Geschichte der Rasse und den beobachteten aktuellen Zuchtpraktiken.

Darüber hinaus zeigte die MDS-Analyse keine klare geografische oder abstammungsbedingte Differenzierung in der Leonberger-Population, im Gegensatz zu anderen Rassen von denen früher berichtet wurde, wie z.B. den Englischen Windhunden und Labrador Retrievern, die sich auf der Basis spezifischer Arbeits- und Showlinien unterschiedliche Gruppen bilden; oder die italienischen Windhunde und Shetland-Schäferhunde, bei denen die europäischen und nordamerikanischen Populationen getrennte Cluster bilden.

### **WGS Ganzgenomsequenzierung**

WGS (Ganzgenomsequenzierung) hat das Erstellen eines großen genetischen Variantenkatalogs ermöglicht, der einen Großteil der bei modernen Hunden vorhandenen Variationen erfasst. Die daraus resultierende Identifizierung von ursächlichen Varianten (*für Gesundheitsprobleme*) trägt zur nachhaltigen Erhaltung von Rassen durch die Reduktion von vererbten Gesundheitsproblemen bei. Das mitochondriale Genom (mtDNA) (*Die mitochondriale DNA oder kurz mtDNA befindet sich in den Mitochondrien. Das sind Zellorganellen, die für den Energiehaushalt der Zelle verantwortlich sind. Besonders wichtig ist, dass Mitochondrien die einzigen Organellen (außer dem Zellkern) sind, die eine eigene DNA besitzen. Es befindet sich außerhalb der Chromosomen einer Zelle. Die Mitochondrien und damit alles was drin ist, werden nur über die Mutter an die Nachkommen weitergegeben. Alle Nachkommen einer Mutter haben also die gleiche mtDNA. Nur sie wird vererbt. Die Mutter hat ihrerseits dieselbe mtDNA wie ihre Großmutter und Urgroßmutter usw. Die mitochondriale DNA eignet sich also besonders gut, die mütterliche Linie zurückzuverfolgen. Über eine mtDNA Untersuchung kann z. B. festgestellt werden, wie nah zwei Völkergruppen miteinander verwandt sind*), das während der WGS sequenziert wird, kann ebenfalls als zusätzlicher Indikator zur Beurteilung der Diversität verwendet werden, um ein umfassenderes Bild der Herkunft und Geschichte von Hundepopulationen zu erhalten.

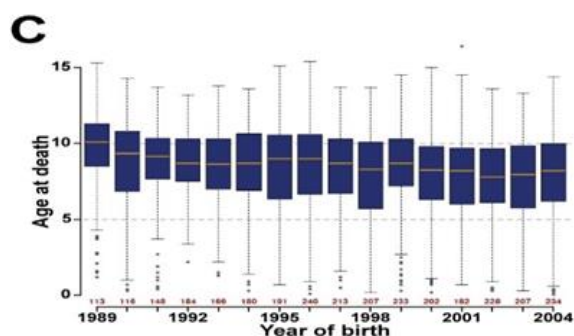
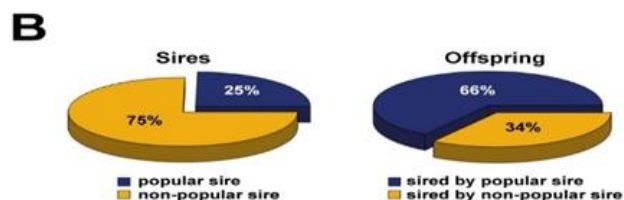
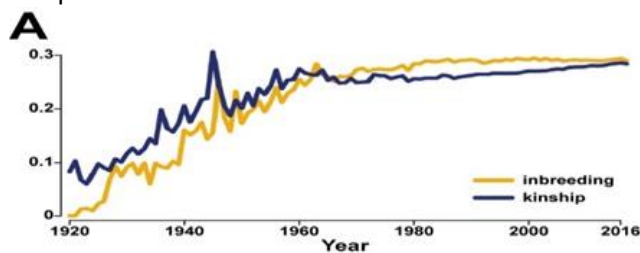
Die genomweite Filterung der WGS-Daten ergab 28 nicht-kodierende Genvarianten, die in allen Leonbergern vorkommen, und eine Liste von 22 potentiell pathogenen (krankheitsauslösenden) Genvarianten für neurologische Erkrankungen; die Hälfte dieser Varianten traten nur in Leonberger Hunden auf, während die andere Hälfte der Varianten mit seltener Häufigkeit in weiteren verschiedenen Hunderassen zu finden waren. Außerdem war eine der beiden gefundenen sogenannten Haplogruppen der nur von der Mutter auf die Nachkommen vererbten mt DNA nur bei einem von 39 Hunden vorhanden.

DNA-Varianten die ausschliesslich nur bei Leonbergern auftreten, die von allen Leonbergern geteilt werden, und seltene Varianten, die bei mindestens einem Leonberger auftreten, wurden durch Vergleich mit dem Variantenkatalog von 605 öffentlich zugänglichen Kontrollhunden aus 128 verschiedenen Rassen und 9 Wölfen identifiziert, der vom Dog Biomedical Variant Database Consortium zur Verfügung gestellt wurde.

Wir sequenzierten die Genome von mehr als 30 an Polyneuropathie erkrankten Hunden mit dem Ziel, weitere krankheitsverursachende Varianten zu entschlüsseln. Die Genomsequenzdaten lieferten

Hinweise auf sowohl rassespezifische als auch Genvarianten die vermehrt beim Leonberger (im Vergleich zu allen anderen Hunderassen) vorkommen, in den Genomen von an Polyneuropathie erkrankten Leonbergern mit unterschiedlichen Häufigkeiten. Die kurze Liste von 21 potentiell pathogenen Varianten in Kandidatengenomen für neurologische Erkrankungen enthält die beiden zuvor berichteten Varianten in GJA9, die Polyneuropathie verursachen, und in NAPEPLD, die Leukoenzephalomyelopathie verursachen, und bestätigt damit die potentielle Nützlichkeit des gewählten Ansatzes. Die neu entdeckten Varianten sind bekannte Kandidaten für neurologische Erkrankungen bei verschiedenen Spezies. Zukünftige Genotypisierungen der 19 neu identifizierten, potenziell schädlichen, proteinverändernden Varianten in Kohorten von gut phänotypisierten Leonberger Hunden sind erforderlich, um eine Verknüpfung dieser Varianten mit der Krankheit zu bestätigen. Die zweite potenziell pathogene Missense-Variante in GJA9 ist überzeugend, da sie auch bei Hunden nicht verwandter Rassen in geringerer Häufigkeit vorhanden ist. Die zwei der drei mtDNA-SNVs, die tRNA-Gene betreffen, werden ebenfalls interessant zu verfolgen sein, da eine Variante in tRNA-Tyr eine bekannte Form der sensorischen ataktischen Neuropathie bei Golden Retrievern verursacht [61]. Da wir bisher nicht in der Lage waren, durch genomweite Assoziationsstudien zusätzliche Loci zu identifizieren, die mit einer mendelschen Vererbung (*ein Gen = ein Merkmal*) der Polyneuropathie assoziiert sind, halten wir es für durchaus möglich, dass eine Untergruppe dieser Störung eine komplexe genetische Natur hat (*mehrere Gene, sowie Umweltfaktoren können für die Merkmalsausprägung verantwortlich sein*) und die individuelle Wahrscheinlichkeit, die Störung zu entwickeln, von einer Kombination mehrerer Allele an mehreren Loci (Orten) zusätzlich von Umweltfaktoren abhängt.

Die Untersuchung des Vorhandenseins großer struktureller Variationen im gesamten Leonberger-Genom wäre in Zukunft ebenfalls aufschlussreich, wenn eine verbesserte kynologische Referenzassemblierung (*Ein Referenzgenom, auch als Referenzassemblierung bekannt, ist eine digitale Nukleinsäuresequenzdatenbank, die von Wissenschaftlern als repräsentatives Beispiel für den Satz von Genen in einem idealisierten einzelnen Organismus einer Spezies zusammengestellt wurde*) und Annotation, also der Bestimmung der genauer Lokalisation der Gene, zusätzlich zu Long-Read-Sequenzdaten verfügbar werden. Frühere Studien schlugen einen Geschlechterbias (*Geschlechterverzerrung*) vor, wobei mehr männliche Leonberger von Polyneuropathie betroffen waren als weibliche [62], bis jetzt wurde kein Hauptrisikofaktor auf dem Chromosom X identifiziert.



**Abbildung 1 Stammbaumanalysen von Leonberger Hunden.**

**A.** Durchschnittlicher stammbaumbasierter Inzuchtkoeffizient und geschätzte Verwandtschaft (MK) pro Jahr von 1920 bis 2016.

**B.** Tortendiagramme des Anteils der in der Zucht verwendeten Vererber zeigen deutlich das beliebte Vätereffekt. Beliebte Vererber sind Rüden, die mindestens 33 Welpen produziert haben und 25 % aller Zuchtrüden ausmachen. Diese Vererber sind für 66 % aller Nachkommen verantwortlich.

**C.** Boxplot des Sterbealters pro Geburtsjahr, der die Lebenserwartung der Leonberger Hunde über die Jahre 1989-2004 zeigt. Die genaue Anzahl der verfügbaren Datensätze pro Jahr ist in Rot über jedem Jahr angegeben.

**Leonberger Hunde sind anfällig für mehrere Erkrankungen**  
**MDS-Analyse der weltweiten Leonberger-Populationsstruktur**

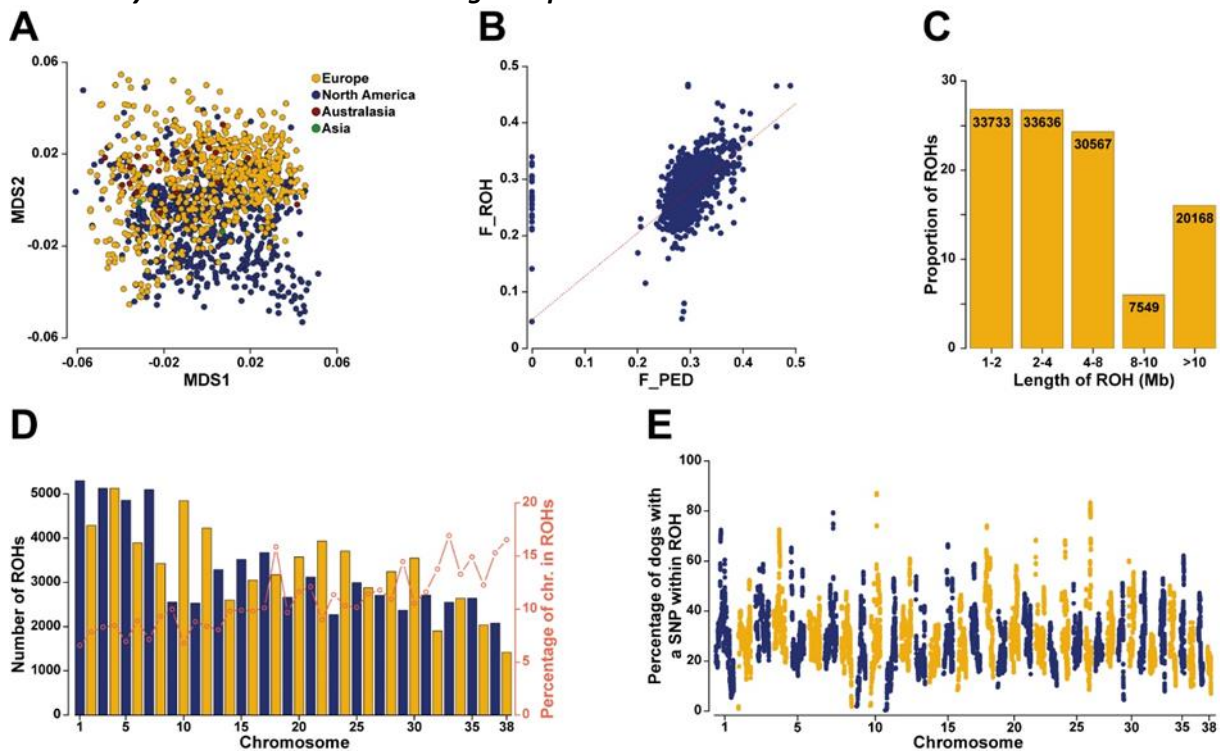


Abbildung 2 Grafische Darstellung der genomischen Analysen von Leonberger Hunden.

A. Das MDS-Diagramm von 1203 Hunden zeigt unabhängig von der geografischen Region des Wohnortes keine offensichtlichen Subpopulationen.

B. Korrelation der Inzuchtkoeffizienten, die aus den Stammbaumdaten (F\_PED) und der ROH-Analyse (F\_ROH) geschätzt wurden. Beachten Sie, dass die Hunde mit unbekanntem Stammbaum (F\_PED=0) auf der linken Seite meist den gleichen Grad an Inzucht aufweisen wie die Hunde mit bekannten registrierten Aufzeichnungen.

C. Häufigkeiten und Anzahl der verschiedenen Klassen von ROHs, basierend auf ihrer Länge, die sowohl alte als auch neue Inzucht anzeigen.

D. Anzahl der erkannten ROHs pro Autosom (linke y-Achse) und der Anteil der Chromosomen in einem ROH (rechte y-Achse).

E. Manhattan-Diagramm, das den Anteil der Hunde zeigt, die einen SNP innerhalb eines ROH über die 38 Autosomen teilen. Die meisten Hunde teilen eine Region auf Chromosom 10 und 26.

**Diskussion**

Dies ist die erste Studie, die die genomische Diversität und Populationsstruktur der Rasse Leonberger umfassend beschreibt, indem sie die ROH-Verteilung und SNVs anhand von SNP-Array- und WGS-Daten untersucht. Darüber hinaus wurden die genealogischen Stammbauminformationen verwendet, um die geschätzten Inzuchtkoeffizienten und die mittlere Verwandtschaft in der aktuellen Population zu vergleichen. Den neu entdeckten genomischen Regionen könnten rassespezifische Merkmale zugrunde liegen und sie könnten Informationen über die genetische Struktur der Rasse liefern, wie z. B. den Selektionsdruck auf bestimmte Merkmale, Inzuchtgrade oder genetische Engpässe. Stammbaumanalysen, die auf umfangreichen Daten basieren, ergaben ähnliche Zahlen zur durchschnittlichen Wurfgröße und Lebenserwartung für Leonberger Hunde, die mit den Ergebnissen einer früheren Studie übereinstimmen.

Die zunehmende Größe der Leonberger-Population ging nach dem Bottleneck-event in den 1940er Jahren (*im 2. Weltkrieg brach die Hundezucht und Hundepopulation zusammen*) mit einem beträchtlichen Verlust an genetischer Vielfalt einher. Die intensive Verwendung beliebter Zuchtrüden (*Vatereffekt*) führte in einem hohen Masse zur Steigerung der Inzucht der Rasse. Dies könnte auch die hohe Prävalenz bestimmter Erkrankungen erklären; die genomischen Daten liefern jedoch keine Hinweise auf fixe kodierende Genvarianten, also Mutationen die bei nahezu allen Leonbergern gleich vorkommen, die

diese rassespezifischen Prädispositionen erklären. Die Liste der möglichen ursächlichen Varianten für weitere bislang ungeklärte Formen der häufig auftretenden Polyneuropathie beim Leonberger muss weiter ausgewertet werden.

Die Aufrechterhaltung des gegenwärtigen Niveaus der genetischen Vielfalt wird nur durch klare Selektionsentscheidungen möglich sein, einerseits durch den Einbezug von insgesamt deutlich mehr Hunden in die Zucht und insbesondere die Vermeidung von wiederholten Anpaarungen (Wurfwiederholungen) sowie der Begrenzung des Einsatzes beliebter Vererber, neben einer Minimierung der Verwandtschaft zwischen den ausgewählten Anpaarungspartnern. Die ermittelten mittleren Verwandtschaftsgrade (*MK*) können Züchtern, zusätzlich zu den bereits verwendeten stammbaumbasierten Inzuchtkoeffizienten, bei der Auswahl geeigneter Verpaarungen helfen. Darüber hinaus könnte eine sorgfältige Auskreuzung dazu beitragen, langfristig die genetische Vielfalt zu optimieren, insgesamt die Heterozygotie in der Population zu erhöhen und zudem die Häufigkeit von krankheitsverursachenden Allelen zu reduzieren, um so das Auftreten verschiedener Gesundheitsprobleme zukünftig zu verringern.

Die hier vorgelegte Liste der mutmasslichen krankheitsverursachenden Varianten in Kandidatengenen für neurologische und neuromuskuläre Erkrankungen könnte in Zukunft die Identifizierung weiterer tatsächlich krankheitsverursachender Mutationen ermöglichen und somit helfen bislang ungeklärte Formen z.B. der Polyneuropathie aufzuklären. Sie veranschaulicht auch die höchstwahrscheinlich heterogene genetische Architektur dieser Gruppe von Krankheiten, von der man annahm, dass sie einer einfachen Vererbung nach Mendel folgt, aber offensichtlich insgesamt betrachtet mehr und mehr genetisch komplexer, polygener Natur ist.

**Die Erhaltung der aktuellen genetischen Vielfalt ist möglich, indem (1.) grundsätzlich mehr Hunde aktiv in die Zucht einbezogen werden, während (2.) die Anzahl der Würfe pro Vater/Mutter klar eingeschränkt bzw. begrenzt wird.**

**Zusätzlich würde eine Auskreuzung (Kreuzung verschiedener Rassen, die keine gemeinsame Vorfahren besitzen) helfen, langfristig die genetische Vielfalt zu erhöhen und somit zu optimieren und zur Nachhaltigkeit und Gesundheit der Population beizutragen.**

### **Liste der Abkürzungen**

BLAST: Basic local alignment search tool

F\_PED: pedigree-based coefficient of inbreeding

F\_ROH: genomic-based coefficient of inbreeding

MDS: multidimensional scaling

MK: mean kinship/mittlere Verwandtschaft

mtDNA: mitochondriale DNA

OMIA: Online Mendelian Inheritance in Animals

OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man

ROH: run of homozygosity

SNP: single nucleotide polymorphism

SNV: single nucleotide variant

WGS: whole-genome sequencing Ganzgenomsequenzierung

### **Danksagung**

The authors are grateful to all Leonberger owners and breeders, the Leonberger Health Foundation, the Schweizerischer Leonberger Club, and the International Leonberger Union for their support during the entire project. Special thanks go to Wilma and Ben Kroon for sharing the Worldwide Independent Leonberger Database. We thank Nathalie Besuchet-Schmutz and Heidi Signer-Hasler for invaluable technical assistance. The Next Generation Sequencing Platform and the Interfaculty Bioinformatics Unit of the University of Bern are acknowledged for performing the WGS and providing high-performance computational infrastructure.

## Theorie

**ROH:** Auf Englisch runs of homozygosity. Sind Regionen im Genom eines Organismus welche kontinuierliche homozygote Regionen aufweisen. Diese entstehen aufgrund von Eltern, die identische Haplotypen an ihre Nachkommen weitergeben. Diese Technik kann verwendet werden, um den genomischen Fußabdruck von Inzucht in Erhaltungsprogrammen zu identifizieren, da Organismen, die kürzlich Inzucht erfahren haben, lange Läufe von Homozygotie aufweisen.

**Bottleneck-Event:** auf Deutsch Flaschenhals-Event beschreibt eine starke Verringerung der Grösse einer Population. Dieses Ereignis kann unterschiedliche Gründe haben wie Hungersnöte, Brände, Krankheiten etc. Solche Ereignisse können die Variation im Genpool einer Population verringern; danach verbleibt eine kleinere Population mit einer geringeren genetischen Vielfalt, um die Gene durch sexuelle Fortpflanzung an zukünftige Generationen von Nachkommen weiterzugeben. Die genetische Vielfalt bleibt geringer und nimmt nur zu, wenn es zu einem Genfluss aus einer anderen Population kommt oder sie nimmt mit der Zeit sehr langsam zu, da zufällige Mutationen auftreten.

**Allel:** Ein Allel ist eine von zwei oder mehr Versionen des gleichen Gens an der gleichen Stelle auf einem Chromosom. Die meisten Allele führen zu keiner oder nur zu einer geringen beobachtbaren Veränderung in der Funktion des Proteins, für das das Gen kodiert. Manchmal können jedoch unterschiedliche Allele zu unterschiedlichen beobachtbaren phänotypischen Merkmalen führen. Wenn die beiden Chromosomen für ein bestimmtes Gen das gleiche Allel enthalten, sind sie und der Organismus homozygot in Bezug auf dieses Gen. Wenn die Allele unterschiedlich sind, sind sie und der Organismus in Bezug auf dieses Gen heterozygot.

**Literaturhinweise und weitere Grafiken finden sich in der Übersetzung des Originals und in der Originalarbeit auf Englisch.**