

Deutsche Übersetzung

***Canine DVL2 variant contributes to brachycephalic phenotype and cauda vertebral anomalies***  
***Die DVL2-Variante beim Hund trägt zum brachycephalen Phänotyp und zu Cauda-Vertebral-Anomalien bei***

Copyright Gesunde Bulldoggen e.V.

Eine Frameshift-Deletionsvariante im Wnt-Signalweg-Gen dishevelled 2 (DVL2) steht in Verbindung mit einem verkürzten, geknickten Schwanz ("Korkenzieherrute") bei Englischen Bulldoggen, Französischen Bulldoggen und Boston Terriern. Diese Rassen zeichnen sich auch durch ausgeprägte morphologische Merkmale aus, darunter ein breiter Kopf, ein flaches Gesicht und ein kurzgliedriger Zwergwuchs, die für das Robinow-Syndrom beim Menschen charakteristisch sind und durch Defekte in Genen wie DVL1 und DVL3 verursacht werden. Aufgrund dieser phänotypischen und genetischen Ähnlichkeiten wurde früher die Hypothese aufgestellt, dass die hündische DVL2-Variante zu einem syndromalen Phänotyp führt, der als Robinow-ähnliches Syndrom bezeichnet wird. In unserer Studie untersuchten wir die Verteilung der DVL2-Variante bei 1954 Hunden aus 15 Rassen, wobei wir Rassen mit Allelvariationen identifizierten und zum ersten Mal die Genotyp-Phänotyp-Korrelation untersuchen konnten. Anhand von CT-Untersuchungen bei American Staffordshire Terriern konnten wir bestätigen, dass das DVL2-Allel mit kaudalen Wirbelfehlbildungen und einem brachycephalen Phänotyp assoziiert ist. Wir stellen außerdem die Hypothese auf, dass die Variante mit weiteren Gesundheitszuständen in Verbindung gebracht werden kann, darunter das brachycephale obstruktive Atemwegssyndrom und angeborene Herzfehler. Insgesamt untermauert unsere Studie die Rolle von DVL2 als einer der Faktoren, die zur Morphologie des "Bulldoggentyps" und zu den Merkmalen des menschlichen Robinow-Syndroms beitragen.

## **Einführung**

Der Haushund (*Canis lupus familiaris*) weist aufgrund der Rassenvermehrung eine enorme morphologische Vielfalt auf. Kürzlich haben Mansour et al. (2018) gezeigt, dass kaudale Wirbelfehlbildungen oder ein verkürzter und geknickter Schwanz eine Folge einer Frameshift-Deletionsvariante im DVL2-Gen (dishevelled segment polarity protein 2) sind. Der Schraubenschwanz ist ein charakteristisches Merkmal bei Englischen Bulldoggen, Französischen Bulldoggen und Boston Terriern. Diese Rassen zeichnen sich auch durch andere Wirbelsäulenanomalien, eine brachycephale Schädelmorphologie, weit auseinander stehende Augen und eine kurze Statur aus. Ähnliche klinische Anzeichen sind beim Robinow-Syndrom beim Menschen zu beobachten, einer Erbkrankheit, die durch Gendefekte im Wnt-Signalweg verursacht wird, einschließlich DVL1, DVL3, ROR2, WNT5A, FZD2 und NXN (White et al. 2018). Das Robinow-Syndrom ist gekennzeichnet durch ausgeprägte Gesichtsmerkmale, z. B. eine prominente Stirn, weit auseinanderstehende Augen und einen flachen Nasenrücken, eine mesomelische Verkürzung der Gliedmaßen und variable kardiale, orale und urogenitale Anomalien (Soman und Lingappa 2015). Aufgrund der genetischen und klinischen Ähnlichkeiten zwischen Robinow-Patienten und diesen Rassen schlugen Mansour et al. (2018) vor, dass die DVL2-Variante für die Morphologie des "Bulldoggentyps" verantwortlich sein und zu einem Robinow-ähnlichen Syndrom bei Hunden beitragen könnte.

Die DVL2-Variante segregiert rezessiv mit kaudalen Wirbelfehlbildungen und hat eine unvollständige und variable Penetranz für thorakale Wirbelfehlbildungen (Mansour et al. 2018). Da das Allel jedoch bei Englischen Bulldoggen, Französischen Bulldoggen und Boston Terriern vollständig oder nahezu fixiert ist (Mansour et al. 2018), war bisher unklar, wie sich die Variante auf andere morphologische Merkmale auswirkt und ob Heterozygotie einen Phänotyp verursacht. Unsere Studie untersuchte die Verteilung der Deletionsallele in diesen drei Rassen und bestätigte, dass die Variante fixiert ist, und identifizierte Rassen mit Allelvariationen, die es uns ermöglichten, die Auswirkungen des Allels auf die Morphologie von Hunden zu untersuchen.

## **Materialien und Methoden**

### **Studienkohorte und DNA-Extraktion**

EDTA-Blutproben wurden von insgesamt 1954 Hunden in Privatbesitz entnommen: 165 Boston Terrier, 297 Französische Bulldoggen, 211 Englische Bulldoggen, 4 Alte Englische Bulldoggen, 11 Amerikanische Bulldoggen, 285 American Staffordshire Terrier (AST), 714 Staffordshire Bull Terrier (SBT), 73 Bordeauxdoggen, 16 Bull Terrier, 13 Miniatur Bull Terrier, 40 Lhasa Apsos, 20 Shih Tzus, 46 Tibetische Spaniels, 10 Pekinesen, 47 King Charles Spaniels und 2 Mischlingshunde (Französische Bulldogge × Deutscher Schäferhund). Die genomische DNA wurde mit einem halbautomatischen Extraktionsroboter Chemagic 360 (PerkinElmer Chemagen Technologie GmbH, Deutschland) extrahiert. Die DNA-Konzentration wurde mit dem Nanodrop ND-1000 UV/Vis-Spektrophotometer (Nanodrop technologies, Wilmington, Delaware, USA) oder dem DeNovix DS-11 Spektrophotometer (DeNovix Inc., Wilmington, Delaware, USA) gemessen. Die Proben wurden bei - 20 °C gelagert. Die Probenentnahme wurde von der Tierethikkommission des Landesamts für Südfinnland genehmigt (ESAVI/343/04.10.07/2016 und ESAVI/25696/2020).

### **Varianten-Screening**

Wir genotypisierten die DVL2-Variante bei den 1954 Hunden mit Standard-PCR und Sanger-Sequenzierung unter Verwendung der von Mansour et al. (2018) entwickelten Primer: 5'-CGGCTAGCTGTCAGTTCTGG-3' (vorwärts) und 5'-CAGTGAGTCTGAGCCCTCCA-3' (rückwärts). Die amplifizierten PCR-Produkte wurden mit einem Kapillar-Sequenzierer (Applied Biosystems ABI3730XL DNA Analyzer) in der Core Facility des Institute for Molecular Medicine Finland (FIMM) sequenziert. Die Sequenzen wurden mit Sequencher (Version 5.3, GeneCodes, USA) und UGENE-Software (Okonechnikov et al. 2012) analysiert.

### **Prospektive CT-Bildgebung**

Wir rekrutierten neunzehn AST (11 Männchen und acht Weibchen) mit bekanntem DVL2-Genotyp (acht Wildtypen, acht Heterozygoten und drei Homozygoten) für eine Ganzkörper-CT-Untersuchung an der Veterinärmedizinischen Lehrklinik der Universität Helsinki. Es wurde eine körperliche Untersuchung durchgeführt, Körpergewicht und Alter wurden erfasst, und die Widerristhöhe wurde mit einem Maßband und einer Wasserwaage gemessen.

Jeder Hund wurde für die CT-Untersuchung mit 0,002-0,006 mg/kg Dexmedetomidin (Dexdomitor; Orion, Finnland) und 0,08-0,2 mg/kg Butorphanol (Butordol; Intervet International B.V., Boxmeer, Niederlande), intramuskulär (IM) als einmalige Injektion verabreicht, leicht sediert. Nach Angaben von zwei Hundebesitzern hatte ein Hund eine

leichte Aortenstenose und ein anderer ein unauffälliges Herzgeräusch, die beide echokardiografisch diagnostiziert wurden. In diesen beiden Fällen wurde vor der Sedierung ein Tierarzt für Anästhesie hinzugezogen.

Es wurde eine kontrastfreie Ganzkörper-Spiral-CT-Aufnahme in Rückenlage mit dem GE LightSpeed VCT 64 (GE Healthcare, Fairfield, Connecticut) durchgeführt. Die verwendeten Parameter waren 120 kV Röhrenspannung, maximaler Strom 750 mAs, Rauschindex 10, Intervall 0,625 mm, 0,625 mm Schichtdicke sowohl im Knochen- als auch im Weichteilalgorithmus (Knochenfenster: Mitte 500, Breite 1500 Hounsfield-Einheiten; Weichteilfenster: Mitte 40, Breite 400 Hounsfield-Einheiten), unter Verwendung einer 512 × 512 Matrix. Die Aufnahme erstreckte sich von der Nasenspitze bis zur Spitze des Schwanzes.

Zusätzlich zu den neunzehn ASTs rekrutierten wir auch einen Wildtyp-SBT für eine CT-Untersuchung, der einen kurzen und geknickten Schwanz hatte. Die CT-Untersuchung, die körperliche Untersuchung und die Sedierung wurden wie oben beschrieben durchgeführt.

## **Röntgenbilder**

Röntgenbilder der Wirbelsäule von dreiundzwanzig AST (12 Rüden, 11 Hündinnen) mit bekanntem DVL2-Genotyp (21 Wildtypen, 1 Heterozygote, 1 Homozygote) wurden mit Zustimmung des Besitzers aus der Bilddatenbank des finnischen Kennel Club entnommen und für diese Studie retrospektiv ausgewertet und vermessen. Der Satz bestand aus laterolateralen Aufnahmen der Hals-, Brust- und Lendenwirbelsäule mit dem Kreuzbein und einer ventrodorsalen Aufnahme des Beckens. Bei einem Hund wurden auch laterolaterale und ventrodorsale Aufnahmen des Schwanzes gemacht. Alter, Geschlecht und Körpergewicht wurden ebenfalls erfasst.

Als Pilotstudie wurden an der Veterinärmedizinischen Lehrklinik der Universität Helsinki Röntgenaufnahmen der Wirbelsäule und des Schwanzes von drei Mischlingshunden (Französische Bulldogge × Deutscher Schäferhund) aus demselben Wurf angefertigt. Die körperliche Untersuchung und die Sedierung erfolgten wie oben beschrieben.

## **Bewertung und Vermessung der Bilder**

Alle Bilder wurden von einem klinischen Ausbilder mit zehnjähriger Erfahrung in der Radiologie (VR) interpretiert, der die DVL2-Genotypen der Hunde nicht kannte. Die Analyse der CT-Bilder erfolgte mit der Horos-Software (v2.0.0 RC3 Open-Source PACS Workstation DICOM Viewer). Die Röntgenbilder wurden mit dem PACS-Workstation-DICOM-Viewer Clear Canvas (Synaptive Medical, Toronto, Kanada, Version 7.0) ausgewertet.

Anhand der CT-Bilder wurden die Halbwirbel klassifiziert und alle anderen vertebrealen Fehlbildungen erfasst, wie zuvor beschrieben (Gutierrez-Quintana et al. 2014). Das Vorhandensein von degenerativen Veränderungen der Wirbelsäule und Spondylitis deformans, verkalkten Bandscheiben und anderen Anomalien wurde ebenfalls erfasst. Das Wirbelsäulensegment wurde für jede Wirbelfehlbildung und für jeden Patienten

erfasst. Übergangswirbel wurden bei der Zahl der kaudalen Wirbelfehlbildungen nicht mitgezählt. Alle Brust-, Lenden- und Kreuzbeinwirbel wurden anhand von multiplanaren, sagittal umformatierten Bildern gemessen. Die maximale Länge der dorsalen und ventralen Hälften der Wirbelkörper wurde erfasst. Die maximale Höhe des Wirbelkörpers wurde in der cranio-caudalen Mitte gemessen. Die Länge des knöchernen Schwanzes wurde gemessen, und die Anzahl der Schwanzwirbel wurde gezählt.

Die Länge der Radialachse wurde beidseitig anhand von dorsalen, multiplanaren, umformatierten Bildern gemessen. Gelenkorientierungslinien wurden entlang der proximolateralen und der proximomedialen Seite des Radiuskopfes sowie entlang der distolateralen und der distomedialen Seite des distalen Radius gezogen (Fox et al. 2006). Die Länge des Radius wurde zwischen diesen Linien gemessen.

Die kephalometrischen Messungen umfassten die Länge und Breite des Gesichts, die Länge und Breite des Schädels, die Länge und Breite des Unterkiefers, die Länge und Breite des Schädels und die Länge der Schädelbasis (Evans und de Lahunta 2013). Der Abstand zwischen den Augen wurde als Abstand zwischen der rechten und linken Frontolakrimalnaht gemessen, die Länge des Nasenbeins wurde von der Nasion bis zum rostralen Ende der Mittellinie des Os nasale gemessen und die Länge des harten Gaumens von kaudal bis zum rostralen Ende des harten Gaumens. Länge und Dicke des weichen Gaumens wurden in sagittaler Ansicht gemessen, wie bereits veröffentlicht (Heidenreich et al. 2016). Schließlich wurden die folgenden Indizes berechnet: Schädelindex = Schädelbreite  $\times$  100/Schädellänge, Schädelindex = Schädelbreite  $\times$  100/Schädellänge, und Gesichtindex = Schädelbreite  $\times$  100/Gesichtslänge (Evans und de Lahunta 2013).

Anhand der Röntgenbilder wurden die Wirbelfehlbildungen klassifiziert, gemessen und ähnlich wie bei den CT-Bildern erfasst. Die Länge des knöchernen Schwanzes wurde anhand der laterolateralen Aufnahme des Hundes mit Röntgenbildern des Schwanzes gemessen.

## **Statistische Analysen**

Der Zusammenhang zwischen dem DVL2-Genotyp und den Körpermaßen wurde mit linearen Modellen und verallgemeinerten linearen Modellen untersucht. Die Daten bestanden aus denselben 19 ASTs, die sich einer CT-Untersuchung unterzogen. Wir untersuchten den Zusammenhang zwischen dem Genotyp des Hundes und 11 Messungen, Verhältnissen und Indizes: Körpergewicht, Widerristhöhe, Radiuslänge, Länge des weichen Gaumens, Höhe des weichen Gaumens, Länge des harten Gaumens, Länge der Schädelbasis, Verhältnis der Länge des harten Gaumens zur Länge der Schädelbasis, Gesichtindex, Schädelindex und Schädelindex. Diese Variablen wurden mit dem DVL2-Genotyp des Hundes (Wildtyp/Heterozygote/Homozygote) und dem Geschlecht erklärt. Das Körpergewicht des Hundes wurde ebenfalls als erklärende Variable einbezogen, wenn dies die Modellanpassung verbesserte, was durch eine Verringerung des Akaike-Informationskriteriums (AIC) um mindestens 2 Einheiten bewertet wurde. Dies führte dazu, dass das Körpergewicht nur in das Modell der Gaumensegelhöhe einbezogen wurde. Die Länge des Radius sowohl des rechten als auch des linken Vorderbeins wurde gemessen, und so erstellten wir ein gemischtes Modell mit Genotyp und Geschlecht als feste Variablen und der Hundeidentität als Zufallsvariable.

Die Anpassung des Modells wurde gründlich geprüft. Zunächst wurden verschiedene Verteilungen und Verknüpfungsfunktionen verglichen, indem das Modell angepasst und die Residuen mit den Paketen `boot` und `rcompanion` (Davison und Hinkley 1997; Canty und Ripley 2019; Mangiafico 2019) visuell untersucht wurden. Basierend auf der visuellen Prüfung wurden lineare Modelle für die Analysen von Körpergewicht, Widerristhöhe, Radiuslänge (lineares gemischtes Modell), Länge des weichen Gaumens, Länge des harten Gaumens, Länge der Schädelbasis, Schädelindex und Schädelindex verwendet. Für das Verhältnis der Länge des harten Gaumens zur Länge der Schädelbasis und den Gesichtsindex wurden verallgemeinerte lineare Modelle mit Gammaverteilung und logarithmischer Verknüpfungsfunktion erstellt. Für die Höhe des weichen Gaumens lieferte die inverse Gaußverteilung mit einer logarithmischen Verknüpfungsfunktion die beste Anpassung. Zweitens wurden nach der Auswahl der Verteilung und der Verknüpfungsfunktion Ausreißer untersucht und mit den Paketen `broom`, `dplyr` und `ggplot2` (Wickham 2016; Robinson und Hayes 2019; Wickham et al. 2019) aufgezeichnet. Drittens wurde die Multikollinearität mit dem Varianzinflationsfaktor (VIF) unter Verwendung des Pakets `car` (Fox und Weisberg 2019) bewertet. Schließlich wurde die Linearität der kontinuierlichen erklärenden Variable, des Körpergewichts, durch Anpassung eines verallgemeinerten additiven Modells mit dem Paket `gam` (Hastie 2019) bewertet.

Zur Schätzung des Gesamteffekts der Variablen wurde eine Varianzanalyse (ANOVA) mit dem Paket `car` (Fox und Weisberg 2019) durchgeführt. Um Mittelwertschätzungen für kategoriale Variablen und paarweise Vergleiche zwischen den Ebenen kategorialer Variablen zu erhalten, berechneten wir die geschätzten marginalen Mittelwerte mit dem Paket `emmeans` (Lenth 2019). Die Schätzungen für die kontinuierlichen Variablen wurden mit dem Paket `effects` (Fox 2003; Fox und Weisberg 2019) ermittelt. Aufgrund der hohen Anzahl von Analysen und paarweisen Vergleichen wurden alle p-Werte für die Falschentdeckungsrate (FDR) kontrolliert. Der Signifikanz-Cut-off-Wert wurde auf  $p < 0,05$  festgelegt. Alle statistischen Analysen wurden mit R Version 3.6.2 (R Core Team 2019) durchgeführt.

## **Ergebnisse**

### Prävalenz der DVL2-Variante

Wir haben die DVL2-Variante bei Englischen Bulldoggen, Französischen Bulldoggen und Boston Terriern genotypisiert, um die Prävalenz des Deletionsallels in einer großen Kohorte zu untersuchen. Um Rassen mit DVL2-Allelvariation zu identifizieren und die Untersuchung der Phänotyp-Genotyp-Korrelation zu ermöglichen, haben wir auch andere Rassen, bei denen das Allel segregiert (Mansour et al. 2018), und eng verwandte Rassen untersucht. Außerdem wurden King-Charles-Spaniels aufgrund der hohen Prävalenz signifikanter kaudaler Wirbelanomalien (Hytönen et al. 2009) eingeschlossen. Insgesamt umfasste die Kohorte 1954 Hunde (Tabelle 1).

Die DVL2-Variante war bei Boston Terriern, französischen Bulldoggen und englischen Bulldoggen vollständig fixiert. Deletionshomozygote und -heterozygote wurden zusätzlich bei ASTs und SBTs entdeckt. Darüber hinaus wurden Heterozygoten bei Bordeauxdoggen, Olde English Bulldoggen und Amerikanischen Bulldoggen gefunden.

Insgesamt lag die Trägerhäufigkeit in diesen fünf Rassenkohorten zwischen 18,2 % und 50,0 %; die Stichprobengrößen waren jedoch sehr unterschiedlich (von 4 bis 708). Bei den sieben anderen Rassen schließlich war die Variante nicht vorhanden.

### **Klinische Befunde**

Um die Auswirkungen der DVL2-Deletion auf die Morphologie des Hundes zu untersuchen, führten wir Ganzkörper-CT-Untersuchungen durch (Online-Material 1, Zusatztabelle 1-5) und bewerteten retrospektiv Röntgenbilder in einer Kohorte von Hunden mit bekannten Genotypen (Online-Material 2, Zusatztabelle 6-8). Wir entschieden uns, die Untersuchungen an ASTs durchzuführen, da die Zahl der homozygoten Hunde unter den Rassen mit Allelvariation am höchsten war. Neunzehn Hunde (11 Rüden, acht Hündinnen) nahmen an den CT-Untersuchungen teil. Das Durchschnittsalter der Kohorte betrug 5,7 Jahre (min: 2,7, max: 10,6, SD: 2,8), und das Durchschnittsgewicht lag bei 29,2 kg bei Rüden (min: 23,0, max: 36,5, SD: 3,3) und 25,2 kg bei Hündinnen (min: 21,4, max: 29,2, SD: 2,5). Von den 19 Hunden waren 3 homozygot, 8 waren heterozygot und 8 waren Wildtyp für die DVL2-Variante.

Der Schwanz konnte bei allen CT-aufgenommenen Hunden und bei den Röntgenbildern eines DVL2-Homozygoten (N = 20) vollständig ausgewertet werden. Bei den DVL2-homozygoten Hunden (N = 4) betrug die mittlere Schwanzlänge 26 cm und lag damit unter dem Mittelwert der heterozygoten (33 cm, N = 8) und Wildtyp-Hunde (34 cm, N = 8). Die Gesamtzahl der Schwanzwirbel reichte von 19 bis 21 bei heterozygoten und Wildtyp-Hunden und von 20 bis 21 bei homozygoten Hunden, die alle abnorme Schwanzwirbel aufwiesen (Abb. 1). Bei den DVL2-Homozygoten betrug die Zahl der missgebildeten Schwanzwirbel pro Hund 1, 8, 10 bzw. 14. Eine oder mehrere der folgenden kaudalen Wirbelfehlbildungen wurden festgestellt: Blockwirbel, dorso-lateraler Halbwirbel, lateraler Halbwirbel, Schmetterlingswirbel, ventrale Keilform, nicht klassifizierte angeborene Fehlbildung und abnorm kurze Wirbel. Außerdem wies ein Homozygot Wirbelfehlbildungen im Kreuzbein auf, nämlich einen ventralen Keilwirbel und eine nicht klassifizierte angeborene Fehlbildung. Bei diesen vier homozygoten Hunden wurden keine weiteren Wirbelfehlbildungen festgestellt. Schließlich berichteten die Besitzer von zwei homozygoten Hunden, die für eine klinische Untersuchung nicht zur Verfügung standen (ein AST und ein SBT), dass die Schwänze ihrer Hunde geknickt waren.

Zusätzlich zu den DVL2-Homozygoten wurden bei CT-Untersuchungen und im Rest der Screening-Kohorte mehrere heterozygote und Wildtyp-Hunde mit Schwanzanomalien entdeckt (Abb. 2, Tabelle 2). Erstens wiesen drei der acht CT-untersuchten DVL2-Heterozygoten kaudale Wirbelfehlbildungen auf: ein Hund hatte vier Fehlbildungen (ventrale Keilform und dorsaler Halbwirbel sowie zwei nicht klassifizierte kongenitale Fehlbildungen) und zwei Hunde hatten eine Fehlbildung (nicht klassifizierte kongenitale Fehlbildung). Zweitens wiesen zwei der acht CT-untersuchten Wildtyp-ASTs eine kaudale Wirbelfehlbildung auf (dorso-lateraler Halbwirbel und unklassifizierte kongenitale Fehlbildung). Darüber hinaus hatte ein CT-untersuchter Wildtyp-SBT einen kurzen Schwanz, der nur aus 11 Schwanzwirbeln bestand, was weniger ist als der Durchschnitt von 20 Schwanzwirbeln, der typischerweise bei Hunden mit normalen Schwänzen wie unseren Wildtyp-ASTs zu sehen ist. Der vorletzte Wirbel wies eine nicht klassifizierte angeborene Fehlbildung auf, und der letzte Wirbel war klein, dreieckig und zeigte nach hinten. Die anderen kaudalen Wirbel waren normal. Thorakale, lumbale oder sakrale

Wirbelfehlbildungen wurden weder bei DVL2-Heterozygoten noch bei Wildtypen festgestellt.

Insgesamt wiesen 12 heterozygote und 13 Wildtyp-Hunde in den Screening-Kohorten Schwanzanomalien auf, die entweder in CT-Untersuchungen oder nach Angaben der Besitzer festgestellt wurden (Tabelle 2). Da nicht für alle Screening-Kohorten genaue Gesundheitsinformationen verfügbar waren, ist die Häufigkeit der Schwanzanomalien nicht repräsentativ für die gesamte Rasse und möglicherweise zu niedrig angesetzt. Schließlich hatten alle drei Französische Bulldogge × Deutscher Schäferhund-Kreuzungen normale Wirbelsäulen und normal lange Schwänze ohne Wirbelfehlbildungen.

Die Form der Hals-, Brust- und Lendenwirbel sowie das Verhältnis von Höhe zu Länge der Brust- und Lendenwirbel waren bei allen Hundegruppen normal. Spondylose und Merkmale von Übergangswirbeln wurden bei allen DVL2-Genotypen gefunden.

Schließlich wiesen zwei der drei DVL2-Homozygoten (ein Rüde und eine Hündin) in der CT-Studie bei der klinischen Untersuchung asymmetrische Stirnhöhlen und ein leichtes Herzgeräusch auf. Bei einem Hund war zuvor echokardiografisch eine Aortenstenose diagnostiziert worden, bei dem anderen lagen die echokardiografischen Messwerte im Normalbereich, aber es wurde eine Nachuntersuchung durch einen Kardiologen empfohlen. Darüber hinaus hatte ein homozygoter AST, der für eine CT-Untersuchung nicht zur Verfügung stand, laut Bericht des Besitzers ein leichtes, asymptomatisches Herzgeräusch.

### **Zusammenhang zwischen dem DVL2-Genotyp und Körpermaßen**

Von den 11 Körpermaßen waren fünf mit dem DVL2-Genotyp assoziiert: Länge des harten Gaumens, Länge der Schädelbasis, Verhältnis der Länge des harten Gaumens zur Länge der Schädelbasis, Gesichtsinde (Abb. 3) und Höhe des weichen Gaumens. Außerdem war das Geschlecht des Hundes mit dem Körpergewicht, der Widerristhöhe, der Radiuslänge und der Länge des harten Gaumens assoziiert. Schließlich wurde die Höhe des weichen Gaumens mit dem Körpergewicht des Hundes in Verbindung gebracht, wobei ein dickerer weicher Gaumen mit einem höheren Körpergewicht korrelierte.

### **Diskussion**

Wir haben die mit dem Robinow-ähnlichen Syndrom assoziierte DVL2-Variante bei 15 Rassen untersucht, die hauptsächlich aus Hunden vom Typ Bulldogge und Pitbull sowie aus tibetischen Hunden bestehen, um die Verteilung des Deletionsallels in Hundepopulationen besser zu verstehen. Wie Mansour et al. (2018) stellten wir fest, dass die Variante bei Französischen Bulldoggen und Englischen Bulldoggen fixiert ist. Ebenso waren alle Boston Terrier in unserer Studie homozygot, obwohl Mansour et al. (2018) eine Häufigkeit von 94 % Homozygoten beobachteten. Außerdem fanden wir das Allel bei American Staffordshire Terriern, Staffordshire Bull Terriern, Bordeauxdoggen, American Bulldoggen und Olde English Bulldoggen. Bei ASTs und SBTs wurden einige homozygote Individuen gefunden, was die Untersuchung der Korrelation zwischen

Phänotyp und Genotyp ermöglichte, um die spezifischen Auswirkungen der DVL2-Variante zu untersuchen.

Um die quantitativen und qualitativen Auswirkungen des DVL2-Deletionsallels auf die Morphologie von Hunden zu untersuchen, rekrutierten wir 19 ASTs für eine Ganzkörper-CT-Untersuchung und werteten retrospektiv Röntgenbilder von 23 Hunden aus. Wir stellten fest, dass alle untersuchten Homozygoten variable kaudale Wirbelmissbildungen aufwiesen, was mit früheren Ergebnissen übereinstimmt; allerdings war die Gesamtzahl der kaudalen Wirbel nicht reduziert und der Schwanz war nicht so vollständig missgebildet und verschmolzen wie bei Englischen Bulldoggen, Französischen Bulldoggen und Boston Terriern (Mansour et al. 2018). Außerdem wies ein homozygoter Hund sakrale Wirbelmissbildungen auf, aber lumbale oder thorakale Anomalien wurden bei keinem Hund festgestellt, auch nicht bei den Kreuzungen Deutscher Schäferhund × Französische Bulldogge, und die Form der Wirbel war bei allen Hunden ähnlich. Dies steht in scharfem Kontrast zu Englischen Bulldoggen, Französischen Bulldoggen und Boston Terriern, bei denen in früheren Berichten eine hohe Prävalenz von Wirbelmissbildungen festgestellt wurde (Moissonnier et al. 2011; Guevar et al. 2014; Gutierrez-Quintana et al. 2014; Ryan et al. 2017). Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Deletion entweder nicht zu thorakalen Fehlbildungen führt oder deren Penetranz variabler ist als die zuvor geschätzten 45-100 % (Mansour et al. 2018). Die unvollständige Penetranz könnte auch die komplexe Rolle von DVL2 in der Skelettentwicklung widerspiegeln, da Wirbelsäulenfehlbildungen bei Dvl2<sup>-/-</sup> Mäusen ebenfalls nicht vollständig penetrant waren: 90 % der Embryonen wiesen abnorme Wirbelkörper auf und 25 % der überlebenden Nachkommen hatten geknickte Schwänze (Hamblet et al. 2002). Umgekehrt traten kaudale Wirbelmissbildungen auch bei heterozygoten und Wildtyp-Hunden auf, und das Allel wurde bei King-Charles-Spaniels nicht gefunden, was darauf hindeutet, dass es neben dem DVL2-Allel weitere, noch unbekannte Varianten gibt, die Schwanzknicke bei Hunden verursachen. Dies wird auch durch Studien an Mäusen unterstützt, bei denen der Knickschwanz (MP:0000585) mit mehr als 370 Genotypen in verschiedenen Stämmen assoziiert ist (Smith und Eppig 2009; Bult et al. 2019).

Zusätzlich zu den kaudalen morphologischen Anomalien stellten wir fest, dass die DVL2-Deletion mehrere kephalometrische Messungen signifikant beeinflusst. Insbesondere waren ein kürzerer harter Gaumen und eine kürzere Schädelbasislänge, ein kleineres Verhältnis zwischen der Länge des harten Gaumens und der Schädelbasislänge sowie ein höherer Gesichtsskindex mit einem oder zwei DVL2-Deletionsallelen assoziiert, was zusammen bestätigt, dass die Variante zu einem eher brachycephalen Phänotyp führt (Abb. 1). Im Gegensatz dazu war die Länge des weichen Gaumens nicht mit dem Genotyp assoziiert, was darauf hindeutet, dass er trotz der reduzierten Länge des Gesichtsskeletts in allen Genotypen ähnlich lang ist, was zu einem Missverhältnis der Proportionen des Gesichtsskeletts und der Weichteile der Mundhöhle führt, d. h. zu einem verlängerten weichen Gaumen. Der verlängerte weiche Gaumen ist zusammen mit den stenotischen Nasenlöchern eine der Hauptanomalien beim brachycephalen obstruktiven Atemwegssyndrom (BOAS) (Stockard 1941; Harvey 1989). Die Verkürzung der skelettartigen Schnauze führt zu einem Stauereffekt, wobei die "überschüssigen" Weichteile den Luftstrom behindern und den Nasopharynx und den Larynx während der Atmung teilweise blockieren (Harvey 1989). Stenotische Nasenlöcher erhöhen den Luftstromwiderstand weiter und beeinträchtigen die Thermoregulation (Knecht 1979; Oechtering et al. 2010). Infolgedessen zeigen die Betroffenen klinische Anzeichen wie Atemnot, Dyspnoe sowie Hitze- und Belastungsintoleranz, und eine Operation des



weichen Gaumens und der Nasenlöcher sowie sekundäre Veränderungen wie ein Kehlkopfkollaps sind häufig erforderlich, um die Atemwegsobstruktion zu verringern und die Lebensqualität zu verbessern (Packer und Tivers 2015).

Unsere Ergebnisse deuten stark auf Brachyzehalie und einen verlängerten weichen Gaumen bei Hunden mit dem DVL2-Deletionsallel hin und legen nahe, dass die Variante ein zusätzliches Risiko für BOAS mit sich bringt. Allerdings war unsere Kohortengröße mit nur drei Homozygoten sehr klein, und das Allel wirkte mit unterschiedlichen Mechanismen, darunter unvollständig dominant (Länge des harten Gaumens), vollständig dominant (Verhältnis der Länge des harten Gaumens zur Länge der Schädelbasis) oder rezessiv (Länge der Schädelbasis, Gesichtsindex und Höhe des weichen Gaumens), abhängig von der Messung. Daher müssen unsere Ergebnisse in einer größeren Kohorte bestätigt werden, bevor ein definitiver Vererbungsmodus für jedes Merkmal bestimmt werden kann.

Zusätzlich zu den veränderten Gesichtsproportionen ist die Verkürzung der mesomelischen Gliedmaßen ein typisches Merkmal bei menschlichen Robinow-Patienten (White et al. 2018). Im Gegensatz dazu zeigten unsere Daten zwar einen leichten Trend zwischen dem DVL2-Genotyp und einem kürzeren Radius sowie einer geringeren Widerristhöhe, die Ergebnisse waren jedoch statistisch nicht signifikant (Online-Material 3, Zusatztabelle 13-14). Diese Körperproportionen müssen auch in einer größeren Kohorte untersucht werden, um zu bestätigen, ob der mesomelische Zwergwuchs ein Teil des Phänotyps bei DVL2-homozygoten Hunden ist.

Als zusätzliche Entdeckung stellten wir fest, dass zwei von drei homozygoten Hunden in der CT-Studie ein leichtes Herzgeräusch hatten, und bei einem von ihnen war die Diagnose einer Aortenstenose bereits bestätigt worden. Während der Organogenese entstehen Aorten- und Pulmonalklappen aus endokardialen Polstern unter Beteiligung von kardialen Neuralleistenzellen, und diese Zellpopulationen sind auch an der Septierung des gemeinsamen Ausflusstraktes in die Aorta und den Pulmonalstamm beteiligt (Waldo et al. 1998; Nakajima et al. 2000; Jiang et al. 2000; Délot 2003; Brown und Baldwin 2006; Hutson und Kirby 2007). Dvl2<sup>-/-</sup> Mäuse weisen verschiedene Fehlbildungen des Ausflusstraktes auf, darunter eine doppelte rechte Herzkammer, eine Transposition der großen Arterien und einen persistierenden Truncus arteriosus, was auf einen Signaldefekt in der kardialen Neuralleiste zurückzuführen ist (Hamblet et al. 2002). Aufgrund dieses gemeinsamen Entwicklungsursprungs des Ausflusstraktes und der semilunaren Klappen kann die Hypothese aufgestellt werden, dass die DVL2-Deletion bei homozygoten Hunden an kardiovaskulären Anomalien beteiligt sein könnte. Diese Vermutung ist jedoch spekulativ und bedarf weiterer Untersuchungen, zumal Pulmonalstenose und Aortenstenose zu den häufigsten angeborenen Herzfehlern bei Englischen Bulldoggen, Französischen Bulldoggen und ASTs gehören (Brambilla et al. 2020).

Die Korkenzieherrute ist ein Rassemerkmal bei Boston Terriern, Französischen Bulldoggen und Englischen Bulldoggen, und sie sind für die DVL2-Deletion fixiert. Im Gegensatz dazu sind Rutenwirbelanomalien bei ASTs, SBTs und Bordeauxdoggen unerwünscht und werden bekämpft, was sich in der niedrigeren Allelfrequenz (18,9-37,0 %) bei diesen Rassen widerspiegelt. Bemerkenswert ist, dass die beobachteten Genotypen bei den ASTs im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht liegen, nicht aber bei den

SBTs, trotz einer großen Anzahl von Hunden. Ausgehend von der Häufigkeit des DVL2-Allels bei SBTs hätten wir erwartet, mehr Deletionshomozygoten zu finden (beobachtet = 1, erwartet = 6,6,  $P < 0,015$ ). Ob dies eine Verzerrung der Stichprobe oder ein anderes Phänomen widerspiegelt, z. B. die Entfernung von homozygoten Hunden aus der Population, ist uns derzeit nicht bekannt.

Insgesamt bestätigen die quantitativen und qualitativen morphologischen Veränderungen, dass die DVL2-Deletion zu einem syndromalen Phänotyp führt, der dem Robinow-Syndrom beim Menschen ähnelt, was die frühere Hypothese des Robinow-ähnlichen Syndroms beim Hund unterstützt. Dennoch werden die Merkmale des Robinow-Syndroms beim Menschen nicht allein durch DVL2 beim Hund beeinflusst: So sind beispielsweise die brachycephalen, kurzgliedrigen und vertebralen Phänotypen bei Englischen Bulldoggen, Französischen Bulldoggen und Boston Terriern aufgrund selektiver Zucht extremer. Im Allgemeinen sind viele morphologische Merkmale bei Hunden genetisch komplex und von mehreren Varianten betroffen, deren Häufigkeit durch den unterschiedlichen Selektionsdruck bei verschiedenen Rassen beeinflusst wird. Beispiele für solche Varianten sind die mit Brachyzehalie assoziierten SMOC2- und BMP3-Varianten und die mit Chondrodysplasie assoziierten FGF4-Retrogene auf den Chromosomen 12 und 18 (Parker et al. 2009; Schoenebeck et al. 2012; Marchant et al. 2017; Brown et al. 2017), und wahrscheinlich gibt es noch weitere, bisher unentdeckte Varianten. Darüber hinaus ist bemerkenswert, dass bei Zebrafischen zygotische *dvl2*-Mutanten im Vergleich zu Wildtyp-Individuen relativ normal sind, während maternal-zygotische Mutanten schwere kraniofaziale Defekte aufweisen, die einem "Bulldoggen-Gesichtstyp" ähneln (Xing et al. 2018). Unseres Wissens nach wurde die mögliche mütterliche Wirkung von DVL2 bei Säugetieren noch nicht untersucht. Daher kann die Hypothese aufgestellt werden, dass das Robinow-ähnliche Syndrom auch bei Hunden mit homozygoten Deletionsmüttern stärker ausgeprägt sein könnte, was bei Rassen, bei denen das Allel fixiert ist, immer der Fall ist. Es sind jedoch weitere Untersuchungen erforderlich, um zu prüfen, ob unsere Hypothese richtig ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass unsere Studie die Rolle der DVL2-Variante für den brachycephalen Phänotyp und die kaudalen Wirbelanomalien untermauert und darauf hindeutet, dass andere Bedingungen mit dem Robinow-ähnlichen Syndrom bei Hunden in Verbindung stehen könnten, darunter BOAS und angeborene Herzfehler. Der Knickschwanz ist ein unerwünschtes Merkmal bei Rassen ohne Korkenzieherrute, und unsere Studie zeigt, dass das Screening der DVL2-Variante dazu beitragen könnte, Zuchtpläne neu zu gestalten, um unerwünschte DVL2-bedingte Anomalien zu reduzieren und das Wohlergehen von Hunden zu verbessern.

### **Verfügbarkeit der Daten**

Alle Daten, die im Rahmen dieser Studie generiert oder analysiert wurden, sind in diesem veröffentlichten Artikel und seinen ergänzenden Informationsdateien enthalten.

Referenzen siehe verlinkten Original Text in Englisch