

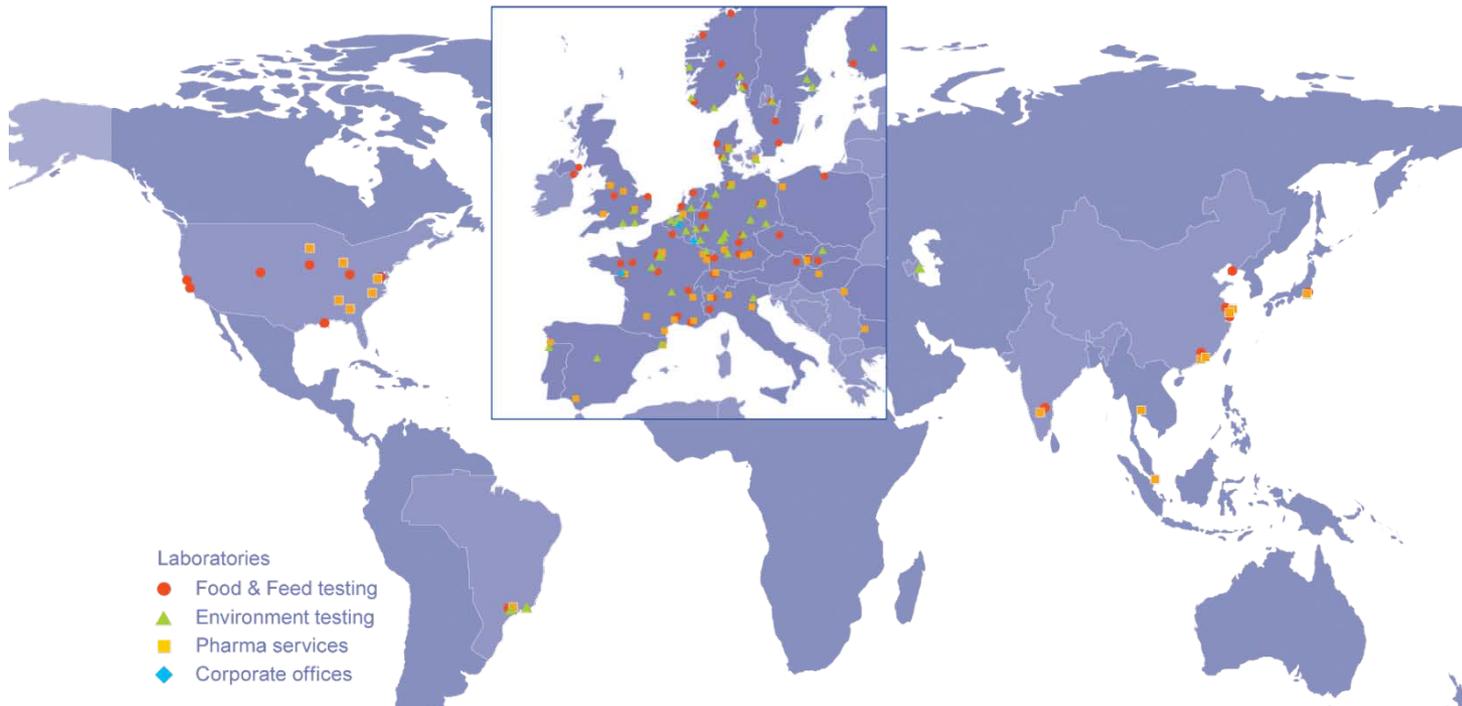
DNA-Test zur Rassebestimmung bei Windhunden

Dr. Barbara Wimmer, Eurofins Medigenomix GmbH

Wer wir sind - Eurofins Scientific Gruppe



- 150 Labore in 30 Ländern in Europa, USA, Asien & Südamerika mit über 10.000 Mitarbeitern
- Weltführend in den Bereichen Lebensmittel- und Umweltanalytik, Pharma, Genetik und übergreifenden Labordienstleistungen.



Der DNA Campus in Ebersberg

- Kompetenzzentrum für genetische Analysen der Eurofins Scientific Group
- Eurofins Medigenomix & Eurofins MWG Operon
- 5.500 m² Büro- und Laborfläche
- 225 Mitarbeiter
- Modernste Ausstattung



- regelmäßige interne & externe Audits sichern hohen Qualitätsstandard
- Analysen sind validiert & werden genau dokumentiert, so dass alle Schritte nachvollziehbar sind
- ISO 17025 Akkreditierung für “Forensische Genetik (Abstammungsgutachten, DNA-Spuren, Vergleichsproben) , Veterinärmedizinische Laboratoriumsdiagnostik, Lebensmitteluntersuchung, Spezies-Untersuchungen”
- ISO 9001:2000 zertifiziert.
- Regelmässige erfolgreiche Teilnahme an Ringversuchen (z. B. ISAG)
- Partner für MARS Scientific (WisdomPanel™)



Abstammungsanalysen mittels Mikrosatelliten

- Lebenslanger und eindeutiger Identitätsnachweis
- Nachweis, dass es sich um ein Tier aus eigenem Besitz / eigener Zucht handelt
- Gespeicherte Daten erlauben selbst nach Ableben eines Hundes ihn noch in eine Abstammungsuntersuchung mit einzubeziehen.
- International anerkannt
- Sichere und zuverlässige Zuchtergebnisse

Wie wird getestet?



oder



Biologische Probe

•



DNA Extraktion

•



Amplifizierung mittels PCR

•

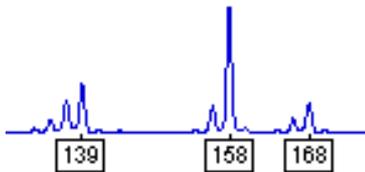


Kapillarelektrophorese

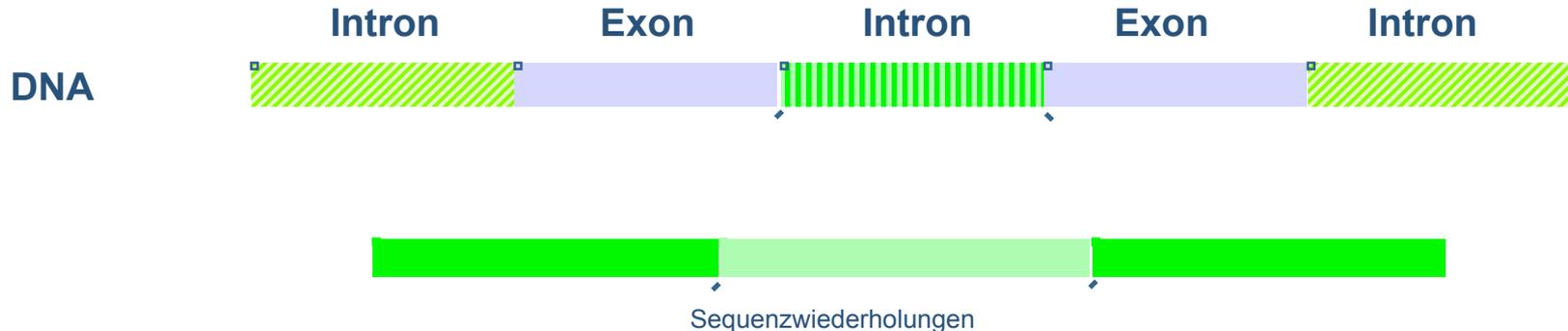
•



Individuelles DNA Profil



Einsatz von genetischen Markern in der Zucht - Mikrosatelliten



Individuum A Allel 1: ACGTCAGTGA CG CG CG CG CG CG CG CG TTGAGATAGATCCAGAT
8 Wiederholungen TGCAGTCACT GC GC GC GC GC GC GC GC AACTCTATCTAGGTCTA

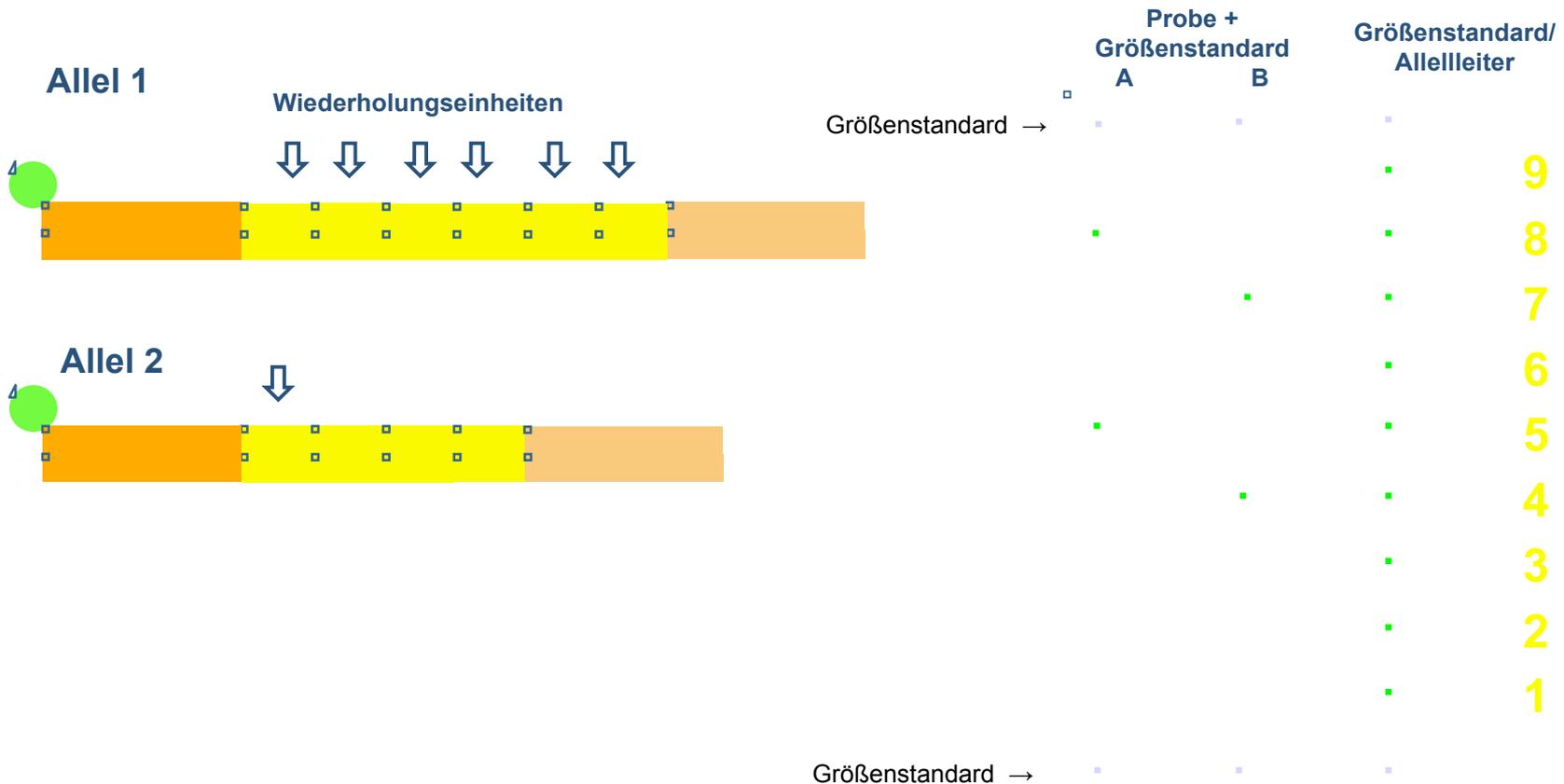
Individuum A Allel 2: ACGTCAGTGA CG CG CG CG CG TTGAGATAGATCCAGAT
5 Wiederholungen TGCAGTCACT GC GC GC GC GC AACTCTATCTAGGTCTA

Individuum B Allel 1: ACGTCAGTGA CG CG CG CG CG CG CG TTGAGATAGATCCAGAT
7 Wiederholungen TGCAGTCACT GC GC GC GC GC GC GC AACTCTATCTAGGTCTA

Individuum B Allel 2: ACGTCAGTGA CG CG CG CG TTGAGATAGATCCAGAT
4 Wiederholungen TGCAGTCACT GC GC GC GC AACTCTATCTAGGTCTA

Die nicht kodierenden Bereiche des Genoms (Introns) enthalten variable Regionen, die unterschiedlich häufige Wiederholungen von einfachen Basensequenzen beinhalten, die sog. Mikrosatelliten. Jedes Individuum enthält davon je eine Variante vom Vater und von der Mutter.

Einsatz von genetischen Markern in der Zucht - Mikrosatelliten



Während der Kapillarelektrophorese wandert das kleinere Fragment Allel 2 im elektrischen Feld schneller durch das Trenn-Medium.

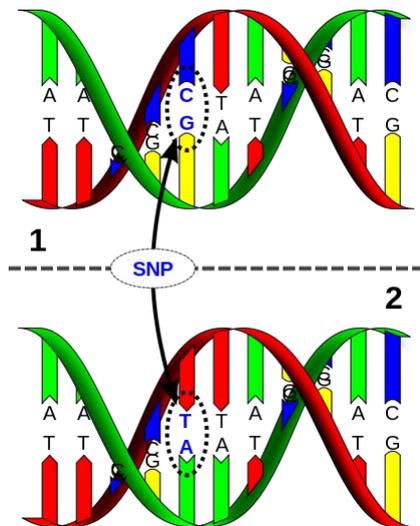
Einsatz von genetischen Markern in der Zucht - Mikrosatelliten

Ein Profil wird mit mindestens 9 Markern pro Tier erstellt: theoret. über 10×10^{10}
Kombinationsmöglichkeiten

Name Marker	Anzahl der möglichen Allele
FHC 2010	9
FHC 2054	11
PEZ 1	13
PEZ 12	39
PEZ 20	9
PEZ 5	8
FHC 2079	10
PEZ 6	30
PEZ 8	9

Single Nucleotide Polymorphism= Variationen einzelner Basenpaare in einem DNA-Strang

Die meisten dieser SNPs sind ohne Auswirkungen auf die Gesundheit des Tieres. Sie sind genetische Veränderungen, die sich zu einem gewissen Grad im Genpool einer Population durchgesetzt haben und eignen sich deshalb für vergleichende genetische Untersuchungen.



Individuum A: AACTAGGCTTGACTA



Individuum B: AACTGGGCTTGACTA

Einsatz von genetischen Markern in der Zucht - SNPs



Kurze Fragmente mit komplementären Enden binden an einen DNA-Chip mit bekannten Abschnitten. Licht wird emittiert und das Signal erfasst (base calling)

A,
T,
G C

A	T	C	C	G	A	T	T	G
C	T	T	A	C	G	A	C	G
T	C	A	A	C	C	G	A	T
G	G	G	C	T	T	A	C	G
A	C	A	T	C	C	G	A	C
A	C	T	C	A	A	C	C	A
G	A	T	A	C	G	A	C	G
G	T	G	G	G	A	T	T	T

Jedes Individuum erzeugt ein eigenes Muster

Genetische Bestimmung der Rassen – Wozu?

- Phänotypisch schwer zu erkennen, da wenige Gene für ein diverses Bild sorgen
- Mehr Kenntnisse über körperliche Merkmale und Verhalten erlauben gezielte Maßnahmen (z.B. Diät, Training)
- Gesundheitsscreenings (erbliche Vorbelastungen)
- Reinrassigkeit?

Einsatz von genetischen Markern in der Zucht - SNPs



Einzelne Genombereiche werden von mehreren Individuen einer Art sequenziert. Wird ein Polymorphismus gefunden, kann man ihn verwenden. Die Suche wird möglichst über weite Bereiche des Genoms der Art durchgeführt.

ABER: es sind zufällig generierte Segmente/ Bereiche OHNE Zuordnung zu einem bestimmten Gen. Die Sequenzabschnitte könne nur über sehr aufwendige bioinformatische Analysen zusammengefügt und analysiert werden.

Es gibt auch die Möglichkeit in einem bekanntem Abschnitt (z.B. in einem Gen) nach solchen SNPs zu suchen → anderes Ziel als Rassetest

- Ausgangspunkt: Von Mars etablierter SNP-basierter Mischlingstest WisdomPanel
- Anzahl der getesteten SNPs: **321**
- Erstellen einer rassespezifischen Signatur
- Zuordnung der Rasseanteile bei einem Mischling zu den jeweiligen Signaturen über ein multivariates statistisches Verfahren

Beispiel:



SNP 1	AA	TT	TT	AA
SNP 2	TT	GG	TT	GG
SNP 3	AA	AA	TT	TT
SNP 4	GG	AA	GG	AA

Wisdom Panel®- Mischlingstest

What breeds make up my dog?

The infographic shows a DNA tree with various breeds and their percentages. It includes a list of breeds and their corresponding DNA percentages.

Labrador Retriever

Height: 57-62 cm
Weight: 25-36 kg
Life span: 10-12 years

The Labrador Retriever comes in solid black, chocolate and yellow. The yellow color has a gold coat and the most popular and most common color.

Miniature Poodle

Height: 35-48 cm
Weight: 4-12 kg
Life span: 12-15 years

The Poodle is a breed with a long history and unusual origins. Poodles have been featured in many famous movies and TV shows.

American Staffordshire Terrier

Height: 45-58 cm
Weight: 17-32 kg
Life span: 12-14 years

The American Staffordshire Terrier was developed in the United States in the 19th century. It is a breed known for its strength and loyalty.

More insight

Learn more about the history of the breeds identified in your dog's DNA. You can also learn more about the health and behavior of your dog.

Stammbaum mit:

- Elternrassen
- Großeltern
- Urgroßeltern

Spezifische Informationen zu den aufgeführten Rassen :

- Körperbau, Größe, Fell
- Verhalten
- Rassenvielfalt

Detailseite mit:

- Name des Besitzer
- Barcode
- Kontakt Information

- Testetablierung mit DNA von über 25,000 reinrassigen Hunden aus USA und GB
- Test im Februar 2008 in den USA und 2010 in GB eingeführt
- Bis jetzt: Mehr als 235 Rassen in der Datenbank (wird kontinuierlich erweitert) und damit derzeit der Test mit den meisten Hunderassen!

ABER:

- KEIN TEST AUF REINRASSIGKEIT
- Nicht alle Windhundrassen sind vorhanden
- Regionale/Geographische Besonderheiten

⇒ **Neuentwicklung eines rassespezifischen Tests für den DWZRV**

- Vorhandene SNPs Wisdom Panel werden zur Etablierung verwendet
- mindestens 20-25 reinrassige, möglichst unverwandte Hunde von jeder Rasse (MHA)
- Vermerken von Besonderheiten bei einzelnen Hunden/ Rassen (z.B. Einkreuzungen in der Zuchthistorie von anderen Rassen etc.)
- Vergleich mit den Daten aus der bestehenden Datenbank für die bereits vorhandenen Rassen

Rassetest - Windhunde

Von jeder Rasse wurden möglichst mindestens 20 unverwandte Hunde (beide Geschlechter) gesammelt.

Insgesamt waren es 462 Proben von 19 Rassen.

Davon konnten 8 Proben aus Qualitätsgründen nicht ausgewertet werden.

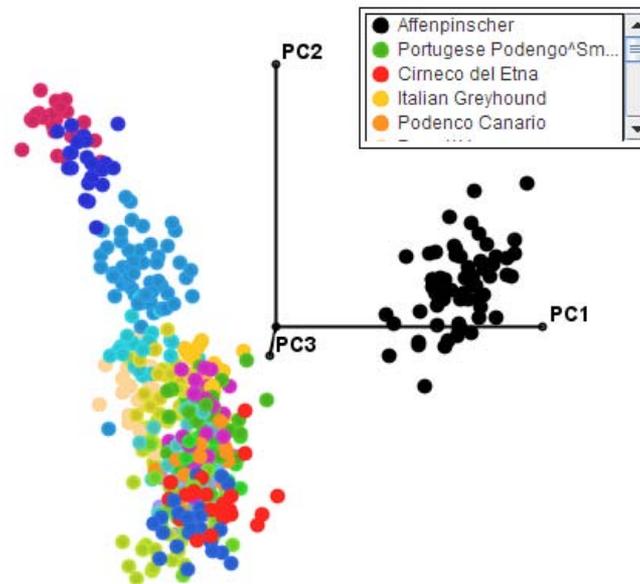
Rasse	Abkürzung	Anzahl Proben
Afghane	A	24
Azawakh	Az	25
Barsoi	B	25
Chart Polksii	CP	25
Deerhound	D	25
Galgo Espanol	GA	26
Greyhound	G	25
Irish Wolfhound	IW	23
Magyar Agar	MA	27
Saluki	S	25
Sloughi	SL	24
Whippet	WH	25
Windspiel	WI	25
Pharaoh Hound	Gr5 P	25
Cirneco del Etna	Gr5 CE	23
Podenco Ibicenco	Gr5 PI	21
Podenco Canario	Gr5 PC	23
Podengo Portugues pequeno	Gr5 PPp	25
Podengo Portugues medio	Gr5 PPm	21

Auswertung:

- Alle Rassen werden einer Außengruppe gegenübergestellt.
- Ähnlichen Rassen bilden ein Cluster. Rassen die sich abheben, liegen außerhalb eines Clusters.
- Werden viele Rassen gleichzeitig miteinander verglichen, erhält man eine geringe Auflösung \Rightarrow bei jeder Analyse wird die Gruppe herausgenommen, die die größte Distanz zum restlichen Cluster zeigt.
- Einzelanalyse der Außenseitergruppe zur Auflösung von Substrukturen
- Proben, die ein ungewöhnliches Verhalten im Vergleich zeigen (Ausreißer) werden erst einmal aus dem Datensatz entfernt und später nach analysiert, um den Gesamtdatensatz nicht zu verfälschen

Grundlegende Ergebnisse:

Vergleich der Gruppe Windhunde mit einer Außengruppe (Affenpinscher) zeigt, dass die Rassen innerhalb der Gruppe eine größere genetische Nähe zueinander haben, als zur Außengruppe.

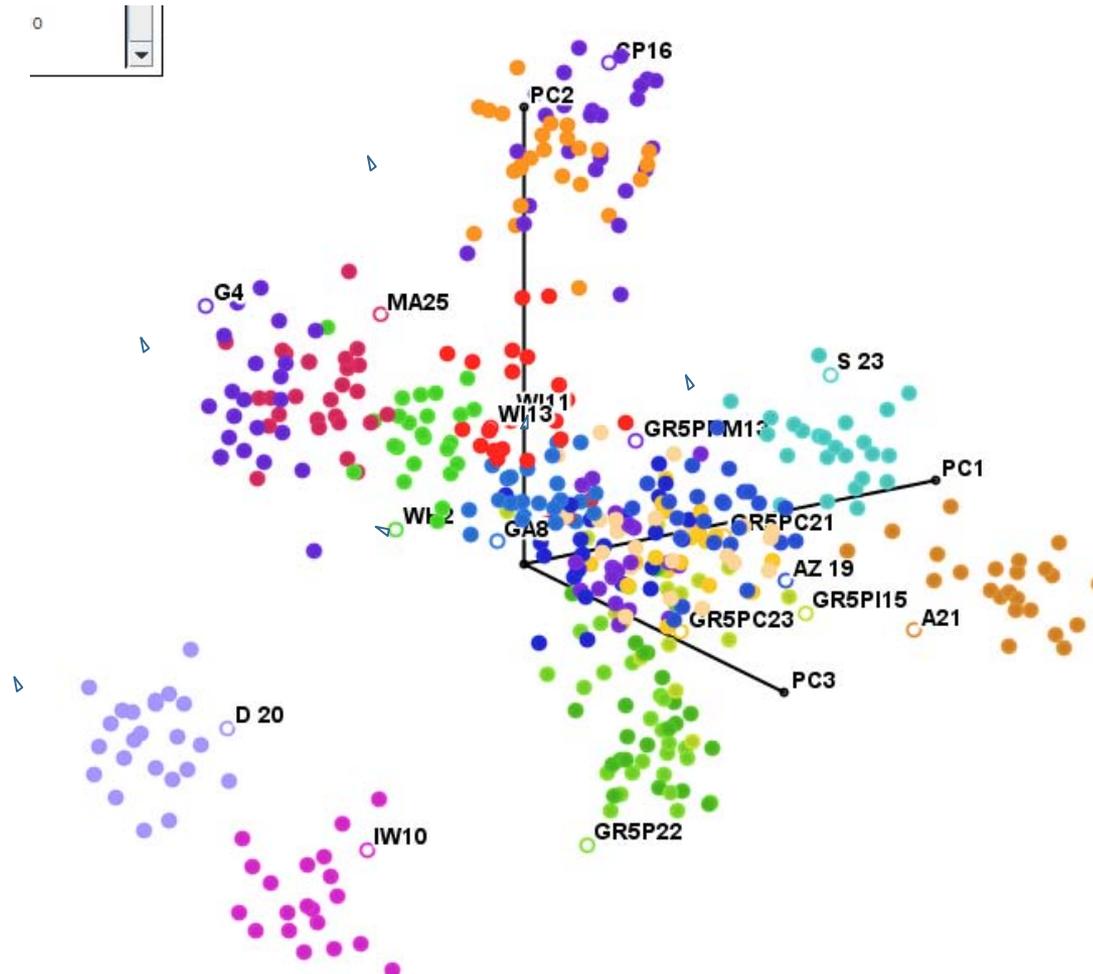


Vergleich der Windhund-Gruppe:

Einige Rassen zeigen eine größere Nähe zueinander als zum Rest:

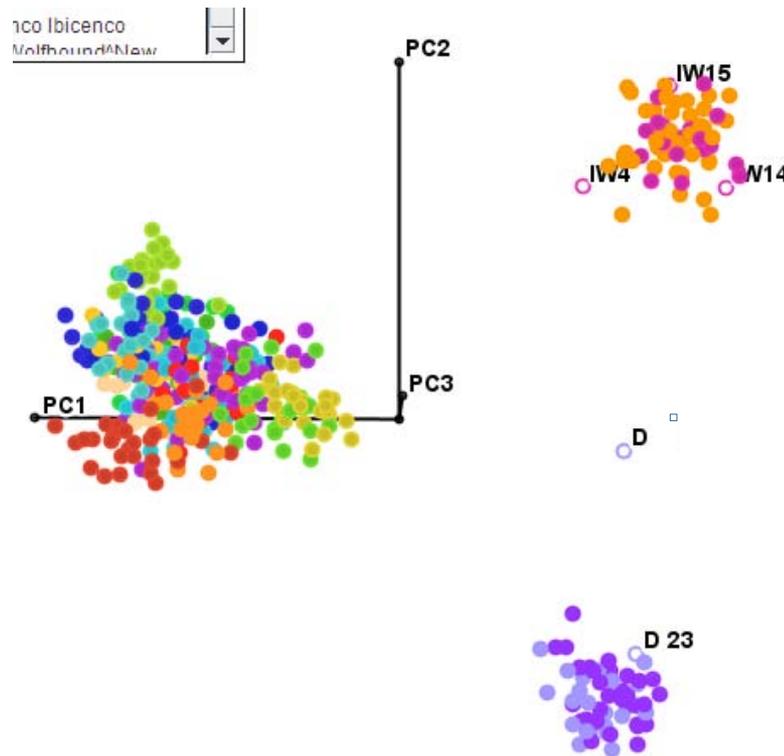
- Deerhound & Irish Wolfhound (welche die größte Distanz zum Rest zeigen)
- Barsoi und Chart Polski
- Greyhound & Magyar Agar
- Saluki & Afghanen
- Whippets & Italienisches Windspiel
- Mediterrane Rassen (Gruppe 5)

Bildung von deutlichen Substrukturen:



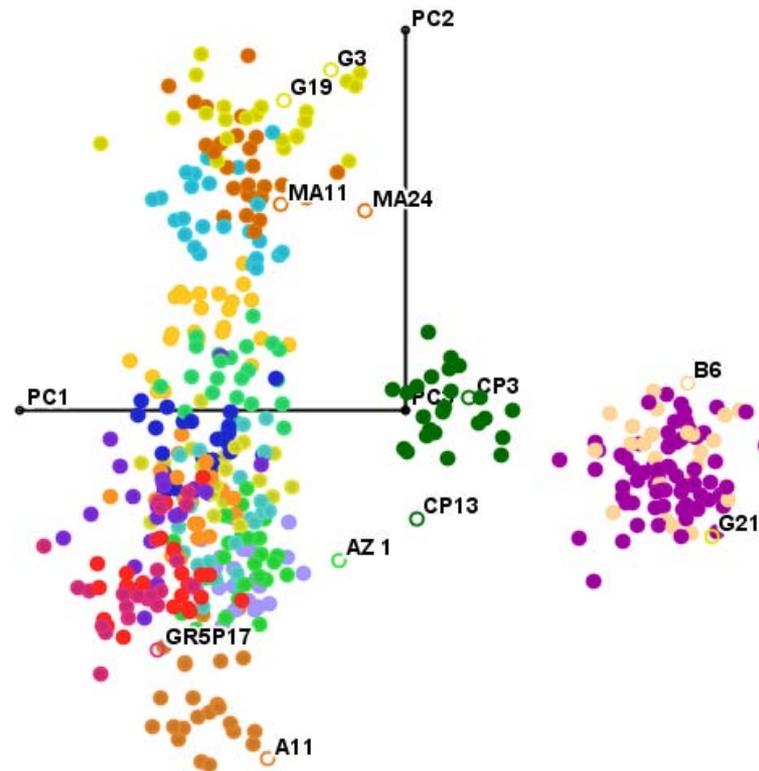
Rassetest - Windhunde

Deerhounds und Irish Wolf zeigen deutliche Aufspaltung in ihre jeweiligen Rassen. Cluster sind in sich homogen. Ein Datenpunkt befindet sich zwischen beiden Rassen.

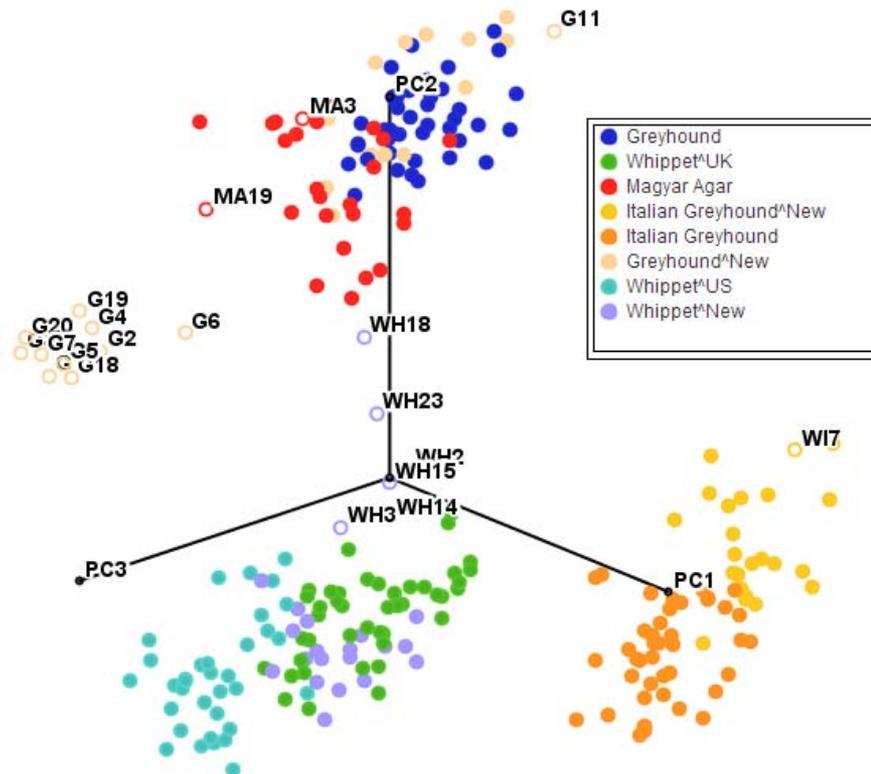


Rassetest - Windhunde

Cluster nach Entfernung der Deerhounds & Irish Wolfs: Barsois & Chart Polski bilden eindeutige Cluster, aber eine mögliche Falschklassifizierung (Greyhound)



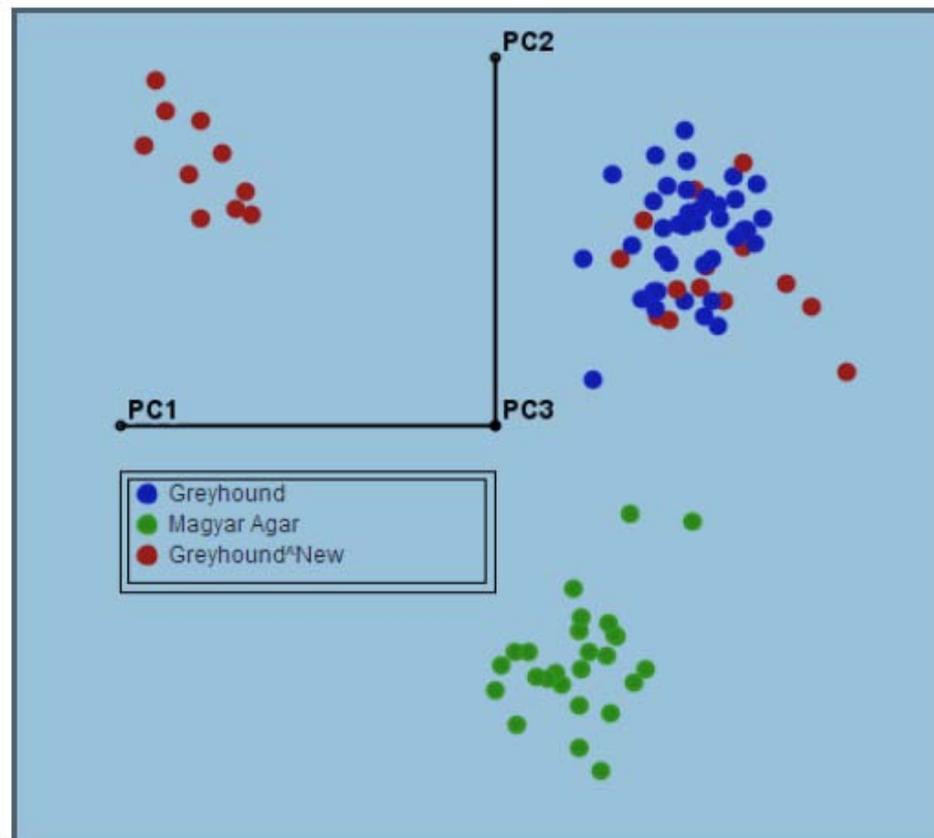
Vergleich von Greyhound, Magyar Agar, Whippet & Windspiel (mit allen Daten):



- **Deutliche geographische Aufspaltung bei Whippets & Italienisches Windspiel (WH: D & GB ⇔ US; WI:D ⇔ GB & US)**
 - **Greyhounds fallen in zwei Gruppen! Distanz zwischen beiden Gruppen so groß wie zwischen Magyar Agar & Greyhound**
- ⇒ **Analyse ohne WI & WH mit Focus auf dieses Cluster**

Rassetest – Windhunde Greyhounds

Greyhounds und Magyar Agar fallen in verschiedene Cluster
ABER: Greyhounds bleiben zwei entfernte Gruppen!



Frage: Was unterscheidet beide Gruppen?

- **Alle Individuen, die anfänglich mit den Magyar Agar clustern, sind Rennhunde (auch die Datenbankproben, die ausschließlich aus GB stammen)**
- **Alle Individuen im entfernten Cluster sind „Show-Hunde“**
- **Jedes Cluster für sich zeigt ein homogenes Bild (keine Datenstreuung)**

⇒ Show-Greyhounds sind deutlich anders als Renn-Greyhounds!

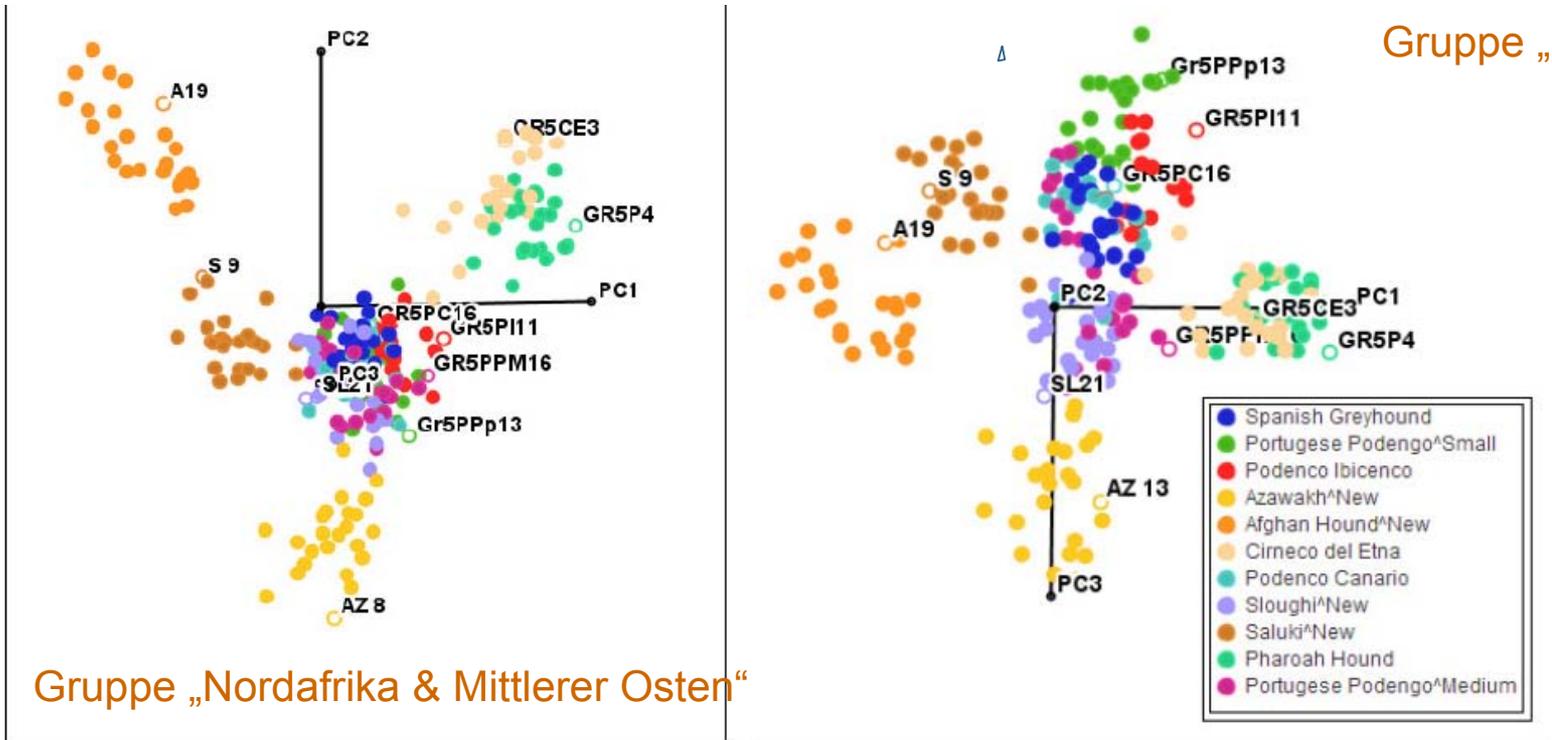
Wie kann man sich so ein Ergebnis erklären?

- **Es wurde eine Familiengruppe gesammelt (Voraussetzung unverwandte Hunde nicht erfüllt?)**
- **Züchterische Selektion auf bestimmte Merkmale führt zur genetischen Entfernung zwischen beiden Gruppen und zur Homogenität der Gruppen**

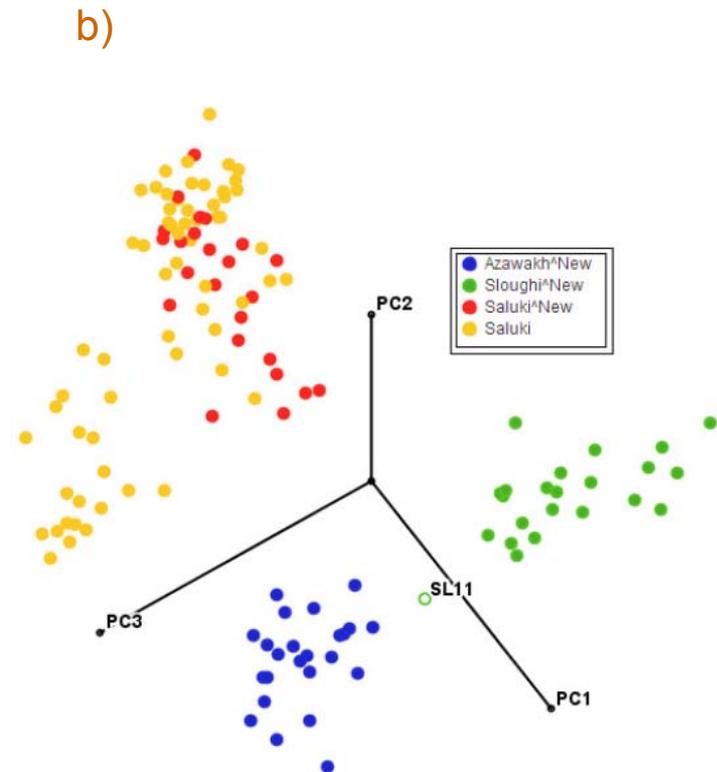
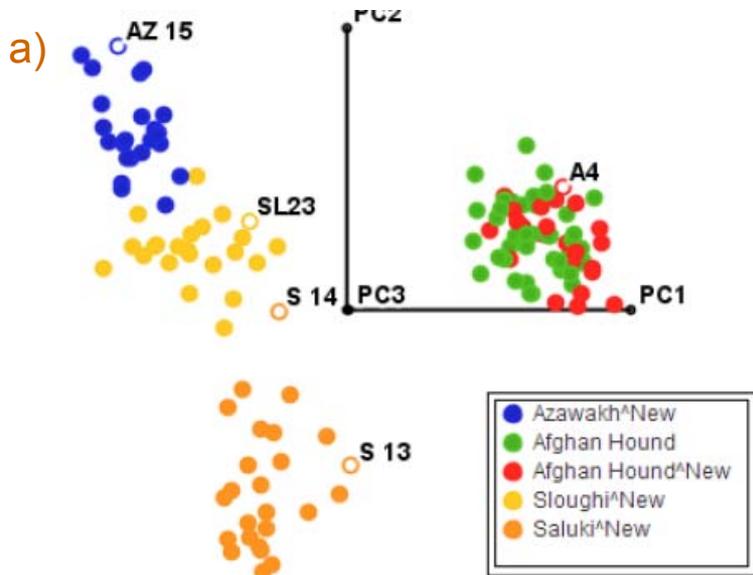
Analyse der verbleibenden Rassen:

- **Afghanen zeigen eine größere Distanz zum Rest und stehen den Salukis am nächsten, innerhalb der nordafrikanischen Gruppe, findet man zwischen Sloughi & Azawakh die größte Ähnlichkeit**
- **Sloughis als historisches Bindeglied zwischen Rassen Nordafrika & Mittelmeer? (über Galgo Espanol)**
- **Alle Rassen mit Ursprung Nordafrika und Mittlerer Osten zeigen eine gute Auflösung und formen getrennte rasse-spezifische Cluster**

Rassetest – Windhunde



Rassetest – Windhunde



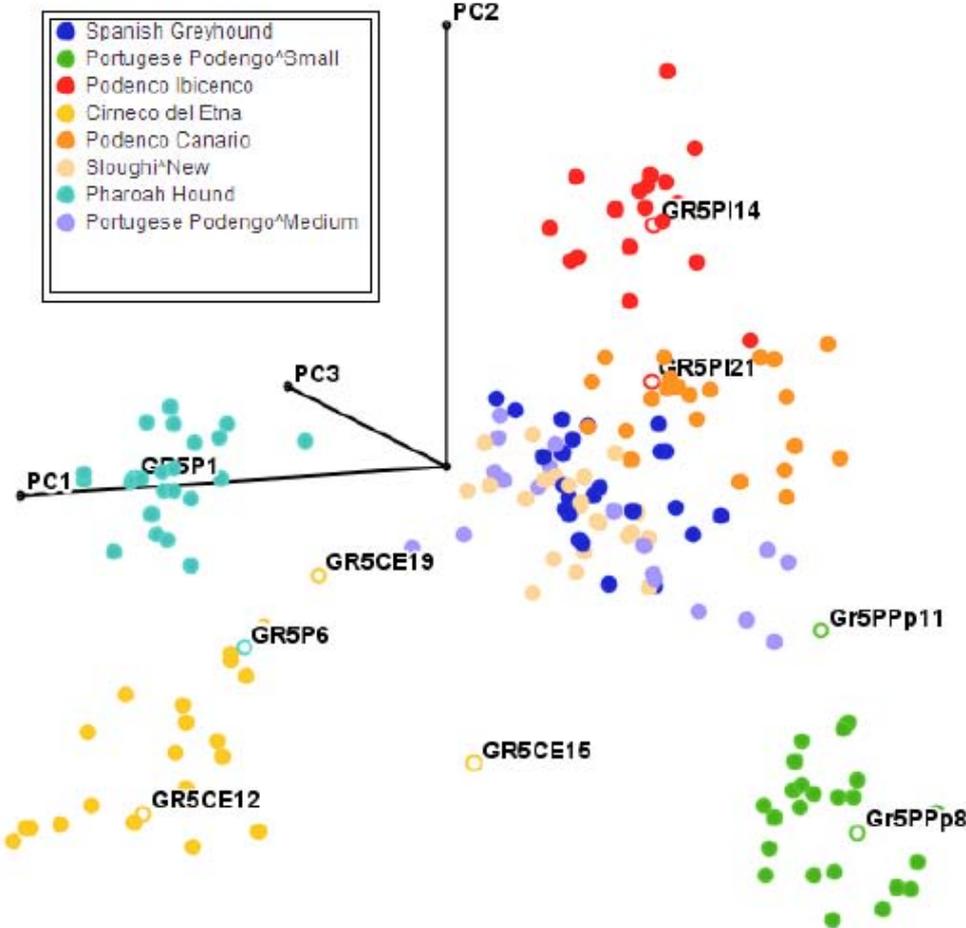
Die Gruppe 5 (Podengo, Podenco, Pharaoh, Cirneco del Etna) ist sehr variabel. Cluster sind z.T. diffus

Aber:

Probenanzahl dieser Gruppe aufgrund der Ausreißer unter 20

Große phänotypische Variabilität (z.B. Fellstruktur & Farbe)

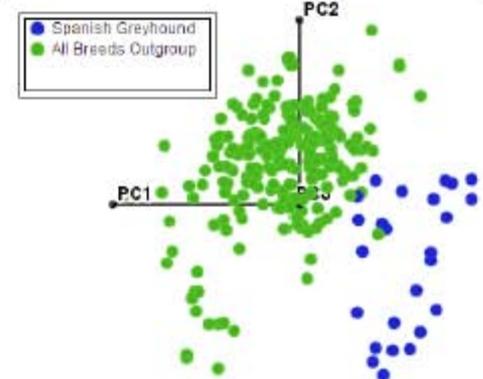
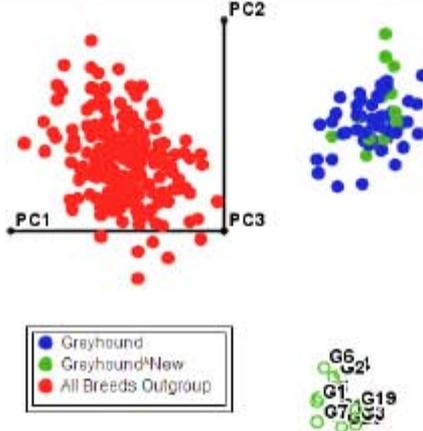
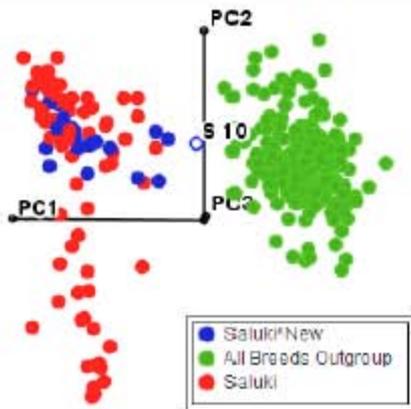
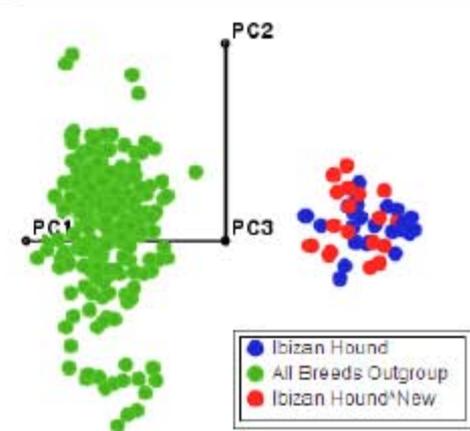
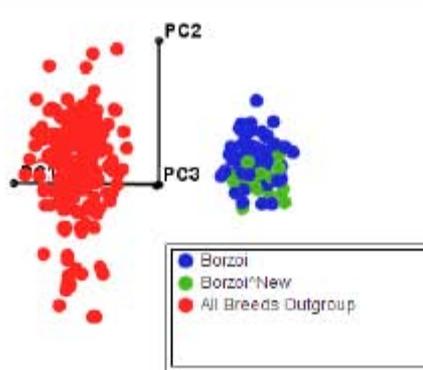
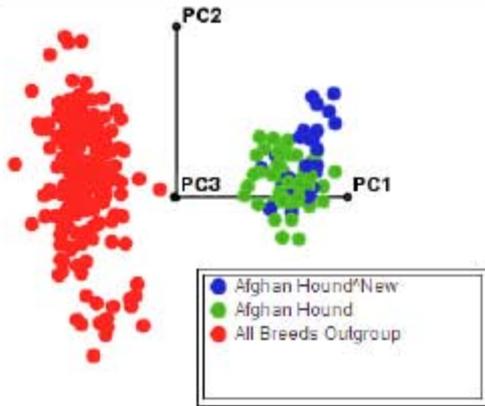
Rassetest – Windhunde Gruppe 5



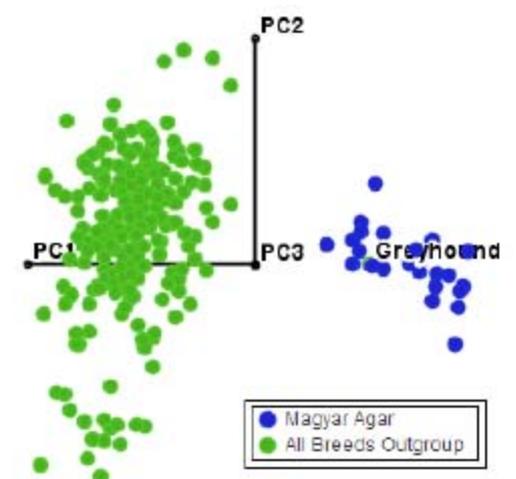
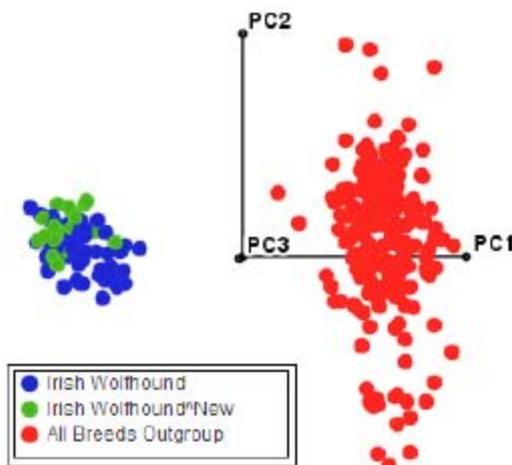
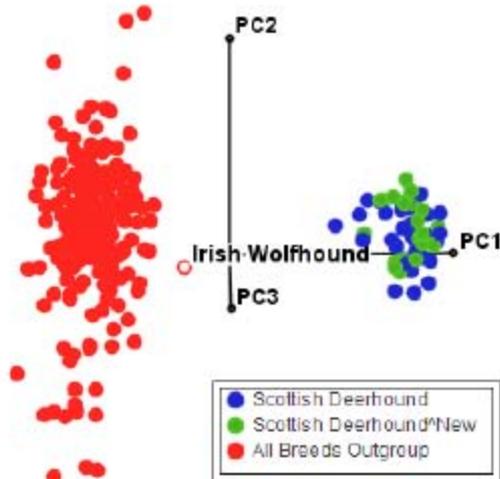
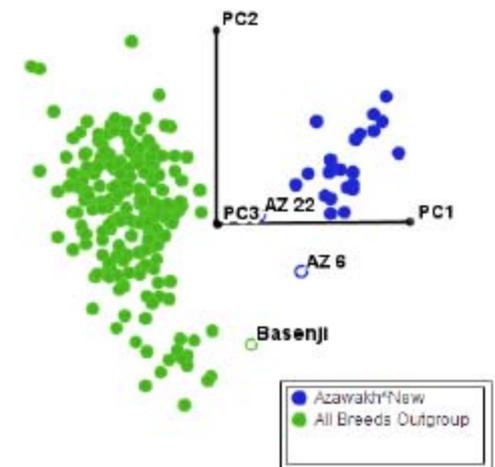
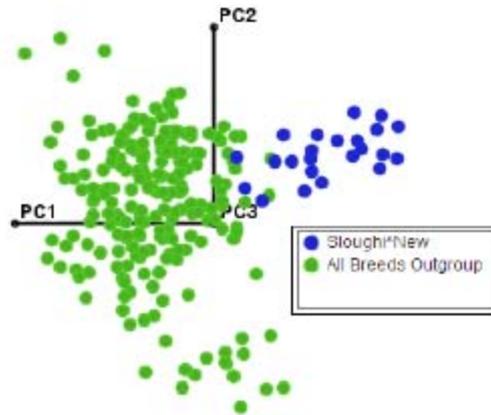
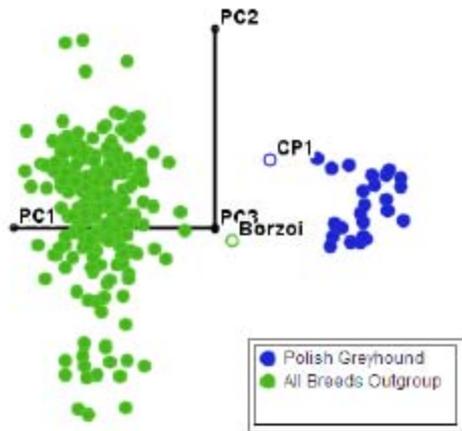
Vergleich der Rassen mit einer „all breed“ Außengruppe:

- **Alle Rassen unterscheiden sich deutlich von der „all breed“-Gruppe und bilden eindeutige Cluster.**
- **Auch in diesem Vergleich bleibt die Teilung der Greyhounds bestehen**

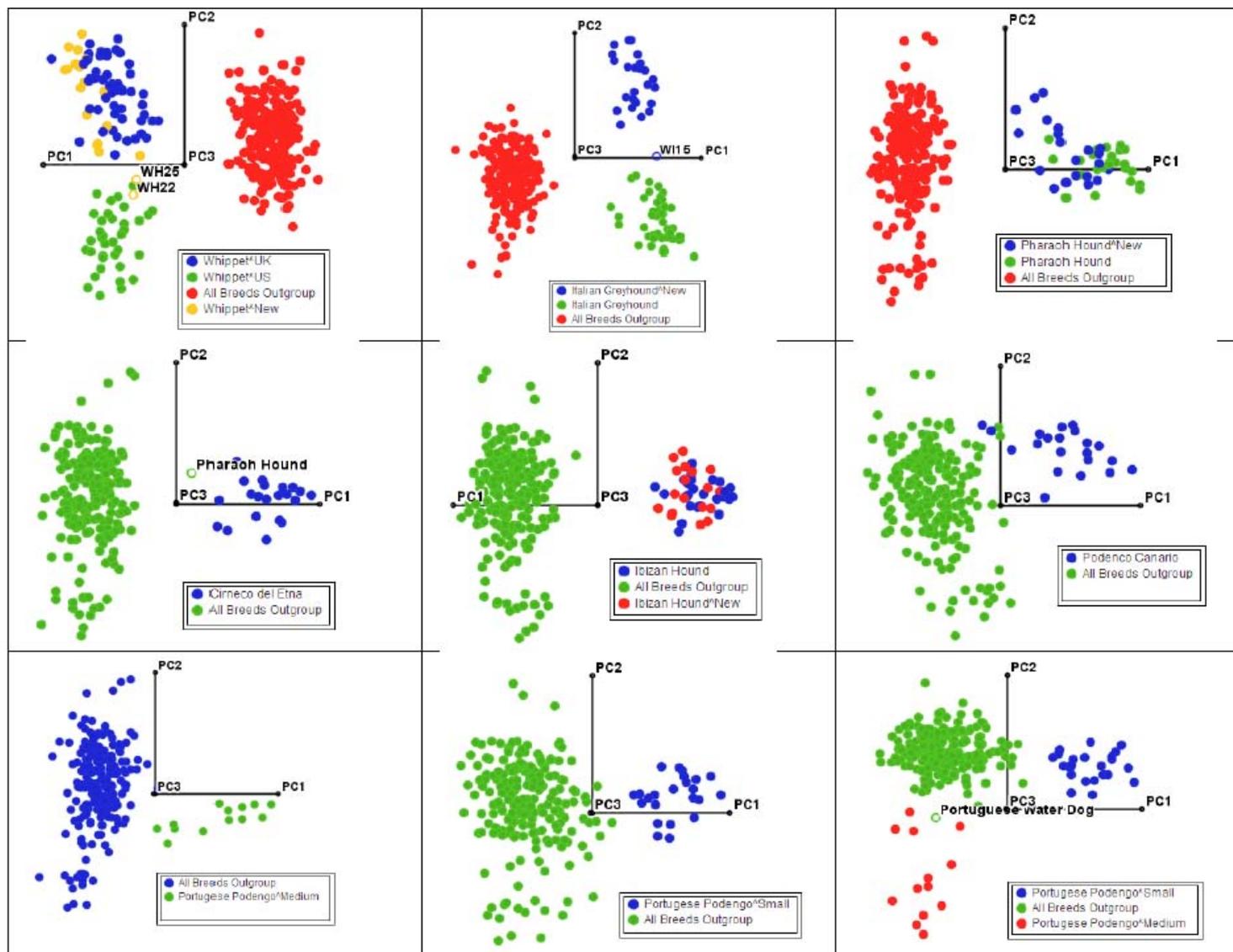
Rassetest – Windhunde



Rassetest – Windhunde



Rassetest – Windhunde



Zusammenfassung

- Zuordnung von reinrassigen Hunden möglich
- Bestimmte Gruppen müssen überarbeitet werden
- Historische und populationsbedingte Einflüsse konnten aufgezeigt werden

Zukunft

„Test the test“: Proben von „definierten“ Mischlingen werden auf Zuordnung überprüft

Danke für Ihre Aufmerksamkeit!

