

## Anregung und genaue Darstellung Unterschied CDDY/IVDD/CDPA Chromosom 12 und

18 Copyright@ Bianca Schulte, 08.09.2020

Eines der wichtigsten Merkmale, welche viele Hunderassen besitzen, sind extrem kurze Gliedmaßen. Dieses morphologische Merkmal ist das Ergebnis eines abnormalen Wachstums der sich entwickelnden Gliedmaßen aufgrund von Defekten im Prozess der endochondralen Ossifikation. Kurze Gliedmaßen waren mit zwei Zuständen verbunden: Chondrodysplasie und Chondrodystrophie. **Chondrodysplasie (CDPA)** ist eine Erbkrankheit, die durch abnormales Wachstum an den Knochenenden, insbesondere an den langen Knochen, gekennzeichnet ist. Bei Hunden war **CDPA mit der Insertion des FGF4-Gens auf Chromosom 18 assoziiert**, das als **autosomal dominantes** Merkmal vererbt wird und bei Basset Hound, Welsh Corgi, Dackel, West Highland White Terrier und Scottish Terrier einen **kurzbeinigen Phänotyp verursacht**.

**Die Chondrodystrophie (CDDY) ist nicht gleichzustellen mit der CDPA in Chromosom 18 !!** Bei Hunden wird durch dysplastische, verkürzte lange Knochen und vorzeitige Degeneration und Verkalkung der Bandscheibenerkrankung Typ IV (IVDD) definiert. Abnormale Bandscheiben sind für einen Bruch prädisponiert, der bei Hunden in jungen Jahren zu IVDD ( Abkürzung **für Bandscheibenvorfall** ) führt. CDDY / IVDD war mit der Insertion des FGF4-Gens auf Chromosom 12 assoziiert, das in Bezug auf die Körpergröße semi-dominant vererbt wird (Hunde mit 2 Kopien der Mutation haben kürzere Beine als Hunde mit einer Kopie der Mutation) und dominant für IVDD (Hunde mit einer oder zwei Kopien der Mutation sind einem IVDD-Risiko ausgesetzt. Diese Mutation wurde in vielen Hunderassen gefunden.

Vererbung: autosomal dominant

Mutation: FGF4-Gen

Zum besseren Verständnis der Vererbung haben wir eine kurze Erklärung der drei häufigsten verschiedenen Vererbungsarten vorbereitet. Bevor wir verschiedene Vererbungsmuster erklären, möchten wir auch einen allgemeinen Überblick über die Genetik geben.

Jeder Organismus hat ein genetisches Material, nämlich DNA. Die DNA besteht aus 4 Nukleotiden - Adenin (A), Thymin (T), Cytosin (C) und Guanin (G). DNA kodiert für verschiedene Proteine, die aus zwanzig Aminosäuren bestehen. Proteine sind Träger verschiedener Funktionen in Zellen und Geweben (vom Metabolismus von Zucker und Energie bis zur Übertragung elektrischer Impulse entlang von Neuronen, Zell und Gewebestrukturelementen, Muskelkontraktion, Blutfilterung, Haaren, Nägeln usw.). Obwohl dieselben Gene für dasselbe Protein kodieren, das dieselbe Funktion erfüllt, ist es nicht erforderlich, dass die Nukleinsäuresequenz des Gens (und anschließend der Aminosäuren) vollständig identisch ist. Solche Varianten bestimmter Gene, die am selben genomischen Ort liegen, werden Allele genannt. In einer Population von Individuen kann es viele verschiedene Allele (Varianten desselben Gens) geben. Jedes Tier hat ein diploides Genom, was bedeutet, dass es 2 Chromosomensätze trägt. Ein Set stammt von der Mutter, das andere vom Vater. Dies bedeutet, dass jedes Gen in einer Zelle durch zwei Kopien dargestellt wird. Dies ermöglicht das Überleben von Organismen, falls ein Allel beschädigt (mutiert) ist. Darüber hinaus ermöglicht die Diploidität von Organismen die Rekombination (den Austausch) von genetischem Material zwischen Chromosomen, die eine Grundlage für die sexuelle Reproduktion von Lebewesen darstellt.

**Autosomale Chromosomen** sind Chromosomen, bei denen die Rekombination (oder Umlagerung von genetischem Material zwischen zwei Chromosomen) frei erfolgt, während Geschlechtschromosomen Chromosomen sind, die keine Rekombination aufweisen, die die Unterscheidung zwischen zwei Geschlechtern ermöglicht. Es gibt zwei Kopien von Geschlechtschromosomen, da nur geringe genetische Unterschiede erforderlich sind, damit die Spezies ein männliches oder weibliches Muster entwickelt.

**Rezessive Vererbung bedeutet**, dass ein Defekt im Vater- und Mutter-Allel erforderlich ist, um einen bestimmten Phänotyp (das Erscheinungsbild) zu exprimieren (Eigenschaften, die gesehen oder gemessen werden können).

**Dominante Vererbung bedeutet**, dass nur ein Defekt eines Allels (entweder Väter oder Mütter) zur

Expression eines bestimmten Phänotyps erforderlich ist.

**Homozygot bedeutet**, dass das Individuum zwei vollständig identische Allele trägt (DNA-Sequenz), während **Heterozygot** bedeutet, dass das Individuum zwei unterschiedliche Allele trägt (DNA-Sequenz). Im Folgenden finden Sie weitere Erklärungen zu drei häufigsten Vererbungsmustern bei getesteten genetischen Erkrankungen.

**Wenn also ein Hund bei Laboklin getestet wird und man findet eine Mutation als Heterozygot kann es nur eine Trägerschaft bedeuten, findet man die Mutation als Homozygot auf, handelt es sich hierbei um eine Doppelträgerschaft in einem Chromosomen auf 2 Allelen.**

### Autosomal rezessiv ( Bedeutung für die Zucht )



Autosomal rezessiv bedeutet, dass ein Merkmal auf dem **Nicht-Geschlecht -Chromosom** (Autosom) übertragen wird und dass ein Merkmal nur dann exprimiert wird, wenn beide Allele (von Mutter und Vater geerbt) beschädigt sind (schädliche Mutation enthalten). Es gibt drei mögliche genetische Kombinationen in der Population solcher Individuen: Homozygoten, die zwei normale Allele tragen, Homozygoten, die zwei mutierte Allele tragen, und Heterozygoten, die normale und mutierte Allele tragen. Heterozygoten sind in diesem Fall die Träger der Mutation, da sie die Krankheit nicht exprimieren (unerwünschtes Merkmal). Es ist besonders wichtig, solche Tiere auf Mutationen zu testen, da mutierte Allele »still« (ohne unerwünschten Phänotyp zu sehen) durch die Population transportiert werden und daher die Züchtung solcher Mutationen aus der Population ermöglichen

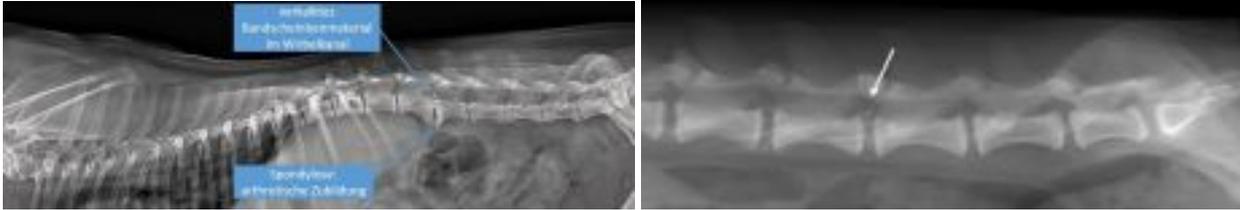
### Autosomal dominant ( Bedeutung für die Zucht )



Autosomal dominante Vererbung bedeutet, dass ein Merkmal auf dem **Nicht-Geschlecht-Chromosom** (Autosom) übertragen wird und dass ein Merkmal ausgedrückt wird, wenn eines der Allele (entweder Mutter oder Vater vererbt) **beschädigt ist (schädliche Mutation enthält)**. Es gibt drei mögliche genetische Kombinationen in der Population solcher Individuen: normale Homozygote (**mit zwei normalen Allelen**), betroffene Homozygote (**mit zwei mutierten Allelen**), betroffene Heterozygote (**mit normalem und mutiertem Allel**), da nur ein einzelnes mutiertes Allel bereits eine Krankheit verursacht. Die Bedeutung für Gentests solcher Tiere liegt hauptsächlich in der Früherkennung der Krankheit und der Identifizierung von Tieren vor ihrer Paarung, da die meisten Krankheiten mit autosomal dominanter Vererbungsart später im

Leben der Tiere auftreten, wenn das Tier bereits Nachkommen haben konnte.

**Bandscheibenvorfall (Diskopathie) / engl.: IVDD (Intervertebral-Disc Disease) Veröffentlichung: Brown EA, et al. FGF4 retrogene on CFA12 is responsible for chondrodystrophy and intervertebral disc disease in dogs. Proc Natl Acad Sci USA. 2017;114(43):11476-11481. (DOI: 10.1073/pnas.1709082114)**



Der Bandscheibenvorfall ist eine Erkrankung, die vorwiegend, aber nicht ausschließlich bei bestimmten kurzbeinigen Hunderassen auftritt. **Klinisch können nach Hansen 2 Formen unterschieden werden:**

**Typ 1:** Bereits bei jungen Hunden kommt es zu einer **Degeneration und Verkalkung** aller Zwischenwirbelscheiben (Bandscheiben). In Folge des Elastizitätsverlustes kann der äußere Faserring, der den gallertigen Kern einer Bandscheibe umschließt, einreißen. Durch den Riss quillt der Bandscheibenhalt explosionsartig hervor und drückt auf das Rückenmark. Typ 1 verläuft daher akut mit plötzlichen Schmerzen und Lähmungen.

**Typ 2:** Bei dieser Form verliert der äußere Faserring seine Festigkeit und der gallertige Kern drückt den Faserring auf das Rückenmark. Die Symptome entwickeln sich schleichend und nehmen mit der Zeit zu. Der fortdauernde Druck behindert die Blutversorgung und führt häufig zu Dauerschäden der Nerven.

**Für die Anfälligkeit an einem Bandscheibenvorfall Typ 1 zu erkranken steht ein Gentest zur Verfügung.** Veröffentlichung: Brown EA, et al. FGF4 retrogene on CFA12 is responsible for chondrodystrophy and intervertebral disc disease in dogs. Proc Natl Acad Sci USA. 2017;114(43):11476- 11481. (DOI: 10.1073/pnas.1709082114)

**Die Autoren beschreiben als Ursache die Insertion eines FGF4-Retrogens an einer bestimmten Stelle des Chromosom 12.** Die Mutation wird als der **entscheidende Faktor** angesehen, der für das Eintreten des Bandscheibenvorfalles verantwortlich ist. Bei allen Tieren der Studie, die einen Bandscheibenvorfall hatten, war die Mutation entweder **reinerbig oder mischerbig vorliegend. Der Test untersucht, ob der Hund die FGF4-Retrogen-Insertion auf dem Chromosom 12 trägt.**

Die Wirkung der Mutation ist dominant, jedoch mit unvollständiger Penetranz. Das bedeutet: Tiere, die im Ergebnis des Tests ‚frei‘ von der Mutation sind, haben keine Anfälligkeit einen durch diese Mutation bedingten Bandscheibenvorfall zu entwickeln. Bei Tieren, die die Mutation reinerbig oder mischerbig aufweisen, besteht die Anfälligkeit für den Bandscheibenvorfall Typ 1.

Mit den gegenwärtig verfügbaren Daten ist noch nicht messbar, wie hoch das Risiko des einzelnen Tieres für das tatsächliche Eintreten der Krankheit ist.

**Es wurde erwiesen, dass das FGF4-RETROGEN auf Chromosom 18 keine Bandscheibenverkalkungen und Einbruch der Bandscheibe IVDD herbeiführt. Es kombiniert lediglich das phänotypische Aussehen des chondrodystrophen Hundes (kurze Beine und langer Rücken meist mit großen Ohren) doch ist nicht erwiesen, dass es ausschließlich durch das Chromosom 18 zu IVDD Fällen kommt.**

**Für mich ist deshalb wichtig das FGF4-RETROGEN als erstes aus dem Chromosom 12 zu eliminieren. Chromosom 18 ist dabei für mich absolut beiläufig !!**

**Fakt ist, es muss eine kontrollierte Zuchtthgiene erfolgen um weitere Generationen vor der IVDD zu schützen!**

Quelle: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6627552/?fbclid=IwAR1mNeSisLxgPrXi6yTKYV7P1O9R7\\_YprN0VhVz2a-zwaimK7hVxpMNgE](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6627552/?fbclid=IwAR1mNeSisLxgPrXi6yTKYV7P1O9R7_YprN0VhVz2a-zwaimK7hVxpMNgE)

## Phänotypische Effekte von FGF4-Retrogenen auf die Bandscheibenerkrankung bei Hunden.

Herausgeber: [Kevin Batchelor](#),<sup>1</sup> [Peter Dickinson](#),<sup>2</sup> [Michelle Giuffrida](#),<sup>2</sup> [Beverly Sturges](#),<sup>2</sup> [Karen Vernau](#),<sup>2</sup> [Marguerite Knipe](#),<sup>2</sup> [Sheida Hadji Rasouliha](#),<sup>3</sup> [Cord Drögemüller](#),<sup>3</sup> [Tosso Leeb](#),<sup>3</sup> [Kimberly Maciejczyk](#),<sup>1</sup> [Christopher A. Jenkins](#),<sup>4</sup> [Cathryn Mellersh](#),<sup>4</sup> and [Danika Bannasch](#)<sup>1,\*</sup>

Zwei FGF4-Retrogene auf den Chromosomen 12 (12-FGF4RG) und 18 (18-FGF4RG) tragen zu kurzgliedrigen Phänotypen bei Hunden bei. 12-FGF4RG wurde auch mit Bandscheibenerkrankungen (IVDD) in Verbindung gebracht. Es wurde festgestellt, dass diese beiden Retrogene bei Hunderassen mit Allelfrequenzen im Bereich von 0,02 bis 1 weit verbreitet sind. Ihr additiver Beitrag zur Krankheit ist jedoch unbekannt. Chirurgische Fälle von IVDD (n = 569) wurden hinsichtlich des Erkrankungsalters, der Verkalkung der Bandscheibe und der Genotypen für die FGF4-Retrogene bewertet. Eine multivariable lineare Regressionsanalyse identifizierte das Vorhandensein von einer oder zwei Kopien von 12-FGF4RG, die bei der ersten Erkrankung mit Operation in dominanter Weise in einem signifikant jüngeren Alter assoziiert waren. 18-FGF4RG hatte bei Hunden mit **einer Kopie** nur eine geringe Wirkung.

**Multivariable logistische Regression zeigte, dass 12-FGF4RG einen additiven (aneinandergereihten) Effekt auf die Verkalkung der Wirbelsäule bei der Röntgenuntersuchung hatte**, während **18-FGF4RG keinen Effekt hatte**.

Multivariable logistische Regression unter Verwendung von Fällen und Kontrollen gemischter Rassen identifizierte nur **12-FGF4RG** als **dominant** in hohem Maße mit Bandscheibenvorfall assoziiert ( Einhergehend ) wurde.

(Odds Ratio, OR, 18,42, 95% Konfidenzintervall (CI) 7,44 bis 50,26; p <0,001). Das relative Risiko für Bandscheibenoperationen im Zusammenhang mit 12-FGF4RG variierte zwischen 5,5 und 15,1 innerhalb verschiedener Rassen und gemischter Rassen. Das **FGF4-Retrogen auf CFA12 wirkt dominant**, um das Erkrankungsalter zu senken (somit tritt es bei jüngeren Hunden auf) und erhöht das Gesamtrisiko für Bandscheibenerkrankungen bei Hunden. Bei bestimmten Rassen können andere Risikomodifikatoren vorhanden sein, einschließlich des **FGF4-Retrogens auf CFA18**.

### 1. Einleitung

Der Haushund weist eine tiefgreifende phänotypische Größenvielfalt auf. Zwei besondere Zustände, die die Größe beeinflussen und als Chondrodystrophie und Chondrodysplasie bezeichnet werden, sind durch verkürzte Gliedmaßen gekennzeichnet und bei vielen Hunderassen häufig [1,2]. Die Ursachen für Chondrodystrophie und Chondrodysplasie wurden als zwei separate Retrogene des Fibroblasten Wachstumsfaktors 4 (FGF4) auf Chromosom 12 (12-FGF4RG) bzw. Chromosom 18 (18-FGF4RG) identifiziert [1,2]. Die schwerste Form von unverhältnismäßigem Zwergwuchs tritt bei Rassen auf, die beide FGF4-Retrogene tragen, wie Dackel, Basset Hounds und Corgis [1,3]. Die FGF-Signalübertragung ist an der frühen Embryonalentwicklung beteiligt [4,5], und für die normale Bildung von Gliedmaßen sind geeignete FGF4-Spiegel erforderlich [6]. Höhere Spiegel an FGF4-Transkripten wurden bei Hunden mit einer der 12-FGF4RG- oder 18-FGF4RG-Insertionen beobachtet, was zu den Schlussfolgerungen führte, dass die FGF4-Retrogene exprimiert werden und dass der Phänotyp der kurzen Extremitäten während der Entwicklung mit einer Überexpression (Proteindefizid) verbunden ist [1,2]. In ähnlicher Weise wird Achondroplasie, die häufigste Form des Zwergwuchses, beim Menschen durch die Zunahme von Funktionsvarianten im Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor 3 verursacht, die zu einer erhöhten Signalübertragung führen [7,8]. Chondrodystrophische Rassen sind neben verkürzten Gliedmaßen auch durch eine chondroide Metaplasie des Nucleus Pulposus gekennzeichnet, die zu einer vorzeitigen Degeneration und Verkalkung der Bandscheiben führt [9, 10, 11]. Diese Degeneration prädisponiert chondrodystrophische Hunde für Bandscheibenerkrankungen (IVDD), eine schwächende Störung, die mit dem Vorstehen oder Extrudieren von Bandscheibenkomponenten in den Wirbelkanal verbunden ist und zu Schmerzen und / oder neurologischen Funktionsstörungen führt [12]. Die Verkalkung der Bandscheibe kann radiologisch sichtbar gemacht werden, und bei chondrodystrophischen Hunden mit einer erhöhten Anzahl radiologisch sichtbarer

verkalkter Bandscheiben wurde ein höheres Risiko für eine klinische IVDD nachgewiesen [13, 14, 15]. Die Verkalkung des Nucleus Pulposus wurde auch bei älteren, nicht chondrodystrophischen Hunden in den späten Stadien der Degeneration beschrieben. Dieser Prozess tritt jedoch bei chondrodystrophischen Hunderassen im Allgemeinen in einem früheren Alter auf [10, 16, 17].

Während alle Rassen von IVDD betroffen sein können, sind chondrodystrophische Rassen einem besonders hohen Risiko ausgesetzt [9,10,12]. Hansen klassifizierte die IVDD, die bei chondrodystrophischen Hunderassen auftritt, als Typ I, der durch akute Extrusion von degeneriertem, häufig verkalktem Nucleus Pulposus (**Der zentral gelegene Anteil der Zwischenwirbelscheibe (Discus intervertebralis). Er besteht aus einer gallertigen Masse und weist einen hohen Wassergehalt auf.**)

Durch degenerierte Annulusfibrose (**eine Gewebeschicht aus Faserknorpel und kollagenem Bindegewebe, die den Außenrand einer Bandscheibe (Discus intervertebralis) formt.**) in den Wirbelkanal charakterisiert ist [10, 18]. Hansen Typ II IVDD tritt im Allgemeinen in einem späteren Alter bei Hunden größerer Rassen (nicht chondrodystrophisch) auf und beinhaltet häufiger einen chronischen Vorsprung von degenerativem Bandscheibenmaterial. In der Vergangenheit wurde berichtet, dass IVDD vom Typ II eher eine fibröse als eine chondroide Bandscheibendegeneration beinhaltet. Trotz einiger spezifischer Unterschiede in der makro- und mikroskopischen Pathologie sowie im Krankheitsverlauf haben Hansens ursprüngliche Arbeit und neuere Studien gezeigt, dass die Chondroid-Metaplasie ein häufiger zugrunde liegender pathologischer Prozess sowohl bei chondrodystrophischen als auch bei nicht chondrodystrophischen Rassen ist [9,19].

Der derzeitige Konsens unterstützt die Verwendung einer dekompressiven Operation zur Entfernung des auf das Rückenmark einwirkenden Bandscheibenmaterials bei Hunden, die stark von IVDD betroffen sind [12, 17], obwohl die Kosten für eine Operation für viele Besitzer unerschwinglich sein können.

Hunde, die für IVDD anfällig sind, können während ihres gesamten Lebens an verschiedenen Stellen mehrere Bandscheibenvorfälle erleiden [20]. **Während chondrodystrophische Hunderassen mit 12-FGF4RG allein wie die französische Bulldogge und Beagle einem hohen Risiko für IVDD ausgesetzt sind, werden die chondrodysplastischen Rassen mit 18-FGF4RG allein wie der Scottish Terrier und der West Highland White Terrier auf ein hohes Risiko nicht berücksichtigt** [1,10]. Bei Hunden mit beiden FGF4-Retrogenen ist der Beitrag von 18-FGF4RG zur Bandscheibendegeneration und damit zur IVDD **unbekannt**. Es ist auch unklar, ob die FGF4-Retrogene vollständig dominant wirken oder ob eine additive Wirkung vorliegt. Da viele Rassen homozygot für die FGF4-Retrogene sind, ist die Bestimmung des relativen Risikos für einen Bandscheibenvorfall schwierig. Die Trennung von Rassen und Mischlingshunden bietet die Möglichkeit, das Risiko eines Bandscheibenvorfalles in Gegenwart der Retrogene zu bewerten.

Für beide FGF4-Retrogene wurde eine umfassende Analyse der Allelfrequenz über Hunderassen hinweg durchgeführt, wobei Rassen identifiziert wurden, die für eines oder beide Retrogene getrennt oder fixiert sind. Eine Überweisungskrankenhaus-DNA-Datenbank wurde verwendet, um Informationen von Hunden zu erhalten, die wegen IVDD dekompressiv operiert worden waren, und prospektive Proben wurden zwei Jahre lang aus chirurgischen Fällen entnommen, um eine große, rassenübergreifende Stichprobe von 569 Hunden zu erhalten, bei denen IVDD durch Operation definiert wurde.

Diese Proben wurden sowohl für 12-FGF4RG als auch für 18-FGF4RG genotypisiert. Rasse, Gewicht, Geschlecht, Alter zum Zeitpunkt der ersten Operation und das Vorhandensein verkalkter Bandscheiben zum Zeitpunkt der Operation wurden angewendet, um den Beitrag von **12-FGF4RG und 18-FGF4RG** zum Krankheitsphänotyp unter Verwendung einer linearen und logistischen Regression zu bestimmen. Eine separate logistische Regression wurde bei Mischlingshunden durchgeführt, um Merkmale zu bestimmen, die zur IVDD-Operation selbst beitragen, und ein **relatives Risiko für 12-FGF4RG** wurde bei der Trennung von Rassen berechnet.

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1. Proben

Nicht verwendete Blutproben wurden vom 5. November 1999 bis 1. Februar 2016 unabhängig von der IVDD Diagnose zufällig vom Hämatologielabor des Davis Veterinary Medical Teaching Hospital (VMTH) der University of California (UC) entnommen und in ein Repository eingetragen. Nach dem 1. Februar 2016

begann das Bannasch-Labor aktiv mit der Blutentnahme aus IVDD-Fällen, die am VMTH beobachtet wurden. Für die Zwecke dieser Studie wurden Proben, die vor dem 1. Februar 2016 gesammelt wurden, als retrospektiv (rückblicken) markiert, während Proben, die nach dem 1. Februar 2016 gesammelt wurden, als prospektiv (vorausschauend) markiert wurden. Medizinische Aufzeichnungen für alle Proben im DNA Repository wurden aus der VMTH-Datenbank nach Hinweisen auf eine dekompressive Operation abgefragt, und alle chirurgischen Fälle wurden in die Studie aufgenommen. Vom VMTH gesammelte Proben wurden unter den UC Davis IACUC-Protokollen 12693, 15356, 18561 und 20356 erhalten.

Zu den für jeden Fall abgerufenen medizinischen Informationen gehörten Rasse, Geschlecht, Geburtsdatum, Gewicht, Datum des Eingriffs, durchgeführter chirurgischer Eingriff, anatomischer Operationsort sowie eine Zusammenfassung der Ergebnisse aller durchgeführten medizinischen Bildgebung (Myelographie, Computertomographie, CT, Magnetresonanztomographie), MRT oder Radiographie und eine Beschreibung des Bandscheibenmaterials aus dem Operationsbericht. Alle nicht mit der Bandscheibe zusammenhängenden Fälle wurden aufgrund der in den Operationsberichten angegebenen Befunde ausgeschlossen. Alle Rasseninformationen wurden bei der Präsentation auf der VMTH vom Besitzer gemeldet. Alle Zwergudel wurden als eine Rasse behandelt, und alle Dackelarten wurden als eine Rasse behandelt. Bezogen auf das Gewicht waren jedoch alle bis auf zwei Dackel klein. Die Gesamtzahl der Hunde aus den betroffenen Rassen wurde aus dem DNA-Repository gezählt, um die relative Rassendarstellung der chirurgischen Fälle im Repository zu bestimmen.

Die rassenspezifischen Allelfrequenzen für die FGF4-Retrogene wurden unabhängig von der IVDD-Diagnose unter Verwendung von 2333 Proben aus dem UC Davis-DNA-Repository bestimmt. Zusätzliche Proben für rassenspezifische Allelfrequenzen wurden von der Vetsuisse Biobank, DNA-Archiv der Universität Bern, ohne Gesundheitsinformationen entnommen. Zusätzliche Proben für die Dackelrasse im Vereinigten Königreich (UK) wurden aus einer Sammlung des Animal Health Trust genotypisiert.

## 2.2. Phänotypisierung und Genotypisierung

Die Fälle wurden anhand von Informationen aus medizinischen Bildgebungs- und Operationsberichten in eine von drei Kategorien eingeteilt. Wenn das zum Zeitpunkt der Operation entfernte Bandscheibenmaterial als verkalkt, mineralisiert, chondroid oder auf ähnliche Weise beschrieben wurde, wurde der Fall als „Gruppe A“ eingestuft. Der Fall wurde auch als Gruppe A eingestuft, wenn im Röntgenbild oder im CT-Bericht Hinweise auf eine Verkalkung der Bandscheibe vorlagen. Wenn das Bandscheibenmaterial als ringförmig oder faserig beschrieben wurde und es in keiner Bildgebung Hinweise auf eine Verkalkung der Bandscheibe gab oder wenn das Bandscheibenmaterial als hydratisiert oder flüssig beschrieben wurde, wurde der Fall als „Gruppe B“ eingestuft. Wenn aufgrund eines fehlenden oder unscheinbaren Operationsberichts und / oder fehlender Röntgenaufnahmen der Wirbelsäule oder CT-Bildgebung nicht genügend Informationen vorhanden waren, um die Art der IVDD zu bestimmen, wurde der Fall als „unbekannt“ eingestuft. Die Fälle wurden auch separat kategorisiert, basierend auf dem Vorhandensein verkalkter Bandscheiben, die unabhängig vom Operationsbericht auf dem Röntgenbild sichtbar waren. DNA wurde aus Vollblutproben unter Verwendung eines Genra Puregene-DNA-Extraktionskits (Qiagen, Valencia, CA, USA) extrahiert. Die Genotypisierung für 12-FGF4RG und 18-FGF4RG wurde unter Verwendung eines PCR-basierten Assays wie zuvor beschrieben [1] oder durch im Handel erhältliche Genotypisierung im UC Davis Veterinary Genetics Laboratory durchgeführt.

## 2.3. Statistische Analyse

Beschreibende Statistiken, einschließlich Interquartilbereiche, Median und 95% -Konfidenzintervalle für Gewicht und Alter bei der Operation, wurden unter Verwendung von GraphPad Prism 7.03 für Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)) erhalten. Der Mann-Whitney-U-Test wurde verwendet, um Gewichte über Genotypstatus und zwischen Gruppen A und B hinweg zu vergleichen. Ein Chi-Quadrat-Test wurde verwendet, um signifikante Unterschiede in den Allelfrequenzen zwischen Gruppen A und B zu testen. Diese Analysen wurden auch unter Verwendung von GraphPad Prism durchgeführt 7.03 für Windows.

Eine multivariable lineare Regressionsanalyse wurde verwendet, um Merkmale zu identifizieren, die mit dem Alter zum Zeitpunkt der Operation verbunden sind. Zur Bewertung des Rassenbeitrags wurden die drei häufigsten Rassenvertreter herangezogen und mit et al. verglichen. (Tabelle 1). Das Alter war die abhängige

Variable und das Geschlecht, der Fortpflanzungsstatus (kastriert oder kastriert gegen intakt), das Körpergewicht, die Rasse (französische Bulldogge, Dackel, Mischling, andere reine Rasse), der 12-FGF4RG-Status (null Kopien, eine Kopie, zwei Kopien) ) und 18-FGF4RG-Status (null Kopien, eine Kopie, zwei Kopien) waren unabhängige Variablen. Referenzkategorien für kategoriale Variablen waren Mischlinge für Rassen und Nullkopien für Retrogenvariablen. Das Gewicht wurde auf das mittlere Körpergewicht der Population (13,0 kg) zentriert. Die Differenzspalte gibt den geschätzten Altersunterschied bei der Operation für jede weiteren 5 kg Körpergewicht an. Zuerst wurden univariable Analysen durchgeführt und alle unabhängigen Variablen mit Wald  $p < 0,2$  auf Aufnahme in das multivariable Modell getestet. Es wurde ein Rückwärtseliminierungsansatz für die Modellbildung verwendet, wobei Variablen im endgültigen Modell beibehalten wurden, wenn  $p < 0,05$  war oder wenn sie als verwirrende Variablen identifiziert wurden (definiert als  $> 15\%$  Koeffizientendifferenz). Die Wechselwirkungen zwischen den Haupteffekten wurden getestet. Die Ergebnisse wurden als Unterschiede im Durchschnittsalter bei der Operation und in den umgebenden 95% -Konfidenzintervallen (CI) angegeben.