

7 Zusammenfassung

Um die genomische Struktur des Protein C-Gens des Hundes aufzuklären zu können, wurde eine canine genomische Phagen-Genbank durchmustert. Dazu wurden 1×10^6 pfu (plaque forming units) auf 20 pools aufgeteilt.

Zur Durchmusterung der Phagen-Genbank wurde ein PCR-gestütztes Verfahren und ein Hybridisierungsverfahren eingesetzt. Es wurden drei genomische λ -Phagenklone aus der Phagen-Genbank isoliert. Diese Klone hatten Größen von 12000 bp, 14000bp und 15000 bp. Zwei der isolierten Klone enthielten das vollständige canine Protein C-Gen.

Durch die Analyse der isolierten Klone konnte die Struktur des caninen PC-Gens ermittelt werden. Es besteht aus 9 Exons und 8 Introns, wobei die Größe der Exons zwischen 25 bp und 578 bp (bis zum Stop-Codon) und die der Introns zwischen 105 bp und 1939 bp liegt. Die Verteilung der Exons über das Gen zeigt keinerlei Auffälligkeiten, sie gleicht der des humanen Protein C-Gens. Auch die Größen der Exons und Introns des caninen PC-Gens sind sehr ähnlich wie im humanen PC-Gen. Alle Exon/Intron-Übergänge innerhalb des caninen PC-Gens entsprechen den Konsensussequenzen für Spleißstellen eukaryontischer Gene.

Ein Phagenklon wurde dazu verwendet, die chromosomale Lokalisation des caninen PC-Gens auf Chromosom 19q21-q22 zu bestimmen.

Die DNA-Sequenzanalyse des PC-Gens von Hunden, die an der LEGG-CALVÉ-PERTHES-Krankheit litten, zeigte keine Auffälligkeit im Vergleich zum normalen PC-Gen des Hundes.

Im Protein C-Gen wurden 6 Polymorphismen ermittelt. Diese stehen aber in keinem Zusammenhang mit der LEGG-CALVÉ-PERTHES-Krankheit. Sie treten auch bei klinisch gesunden Hunden auf. Die ermittelten Polymorphismen im PC-Gen führen zu keinem Aminosäureaustausch im Genprodukt.

Von 18 Hunden, die an der LEGG-CALVÉ-PERTHES-Krankheit erkrankten, wurden die Aktivitäten von Protein C, Protein S, aktiviertem Protein C, Antithrombin III (AT III) sowie den Gerinnungsfaktoren II, V und VIII:C im Blutplasma bestimmt. Aus einem Hundeplasmapool von 36 klinisch gesunden Hunden unterschiedlichen Alters, Geschlechts und verschiedener Rassen wurden Referenzbereiche für die Aktivität von Protein C, freiem Protein S sowie von aktiviertem Protein C (APC) erstellt.

Hunde, die an der LEGG-CALVÉ-PERTHES-Krankheit litten, zeigten keine Unterschiede in den genannten Blutparametern im Vergleich zu klinisch gesunden Hunden. Die molekularbiologischen Befunde LEGG-CALVÉ-PERTHES kranker Hunde wurden damit auch auf blutchemischer Ebene bestätigt.

Aufgrund der molekularbiologischen und blutchemischen Untersuchungen an Hunden, die an der LEGG-CALVÉ-PERTHES-Krankheit erkrankten, kann eine Protein C-Defizienz als ätiologischer Faktor für das Entstehen der LEGG-CALVÉ-PERTHES-Krankheit ausgeschlossen werden.

Thorsten Kopp

Isolation and characterisation of the canine protein C gene

8 Summary

A canine genomic phage library was screened to isolate and determine the architecture of the canine protein C (PC) gene. The library consisted of 1×10^6 pfu (plaque forming units) in 20 pools. A PCR-based and a hybridisation-based protocol was used to screen the phage library.

Three genomic λ -phage clones were isolated and sequenced. The insert sizes were 12000 bp, 14000 bp, and 15000 bp, respectively. Two of the phage clones harboured the complete canine PC gene.

DNA sequence-analysis of the isolated phage clones showed that the canine PC gene consists of 9 exons and 8 introns with sizes ranging from 25 bp to 578 bp (until the stop-codon) for the exons and 105 bp to 1939 bp for the introns. The distribution and sizes of the exons and introns of the canine PC gene are similar to those of the human PC gene. The exon/intron boundaries of the canine PC gene confirm to the consensus sequences of splice sites of eukaryotic genes.

One phage clone was used to determine the chromosomal localisation of the PC gene on canine chromosome 19q21-q22.

The DNA sequence-analysis of the PC gene of dogs with LEGG-CALVÉ-PERTHES disease did not reveal any difference to the PC gene of unaffected dogs with respect to the amino acid sequence of protein C.

Six polymorphisms were found in the PC gene. They were not causative for the LEGG-CALVÉ-PERTHES disease. They were also found in unaffected dogs. None of these polymorphisms resulted in an amino acid exchange.

The activity of protein C, free protein S, activated protein C, antithrombin III, and the coagulation factors II, V and VIII:C was measured in plasmas of 18 dogs with LEGG-CALVÉ-PERTHES disease.

To get a canine reference curve for the activity of protein C, free protein S, and activated protein C, the activity of these parameters was measured in plasmas of 36 healthy dogs of different age, sexes and breeds. There were no differences in the blood parameters measured between dogs with LEGG-CALVÉ-PERTHES disease and healthy dogs.

Thus, the molecular biological data of dogs suffering from LEGG-CALVÉ-PERTHES disease corresponded with the blood coagulation data.

Based on the genetic and blood coagulation data obtained from dogs with LEGG-CALVÉ-PERTHES disease, a protein C deficiency can be excluded as aetiologic factor for the LEGG-CALVÉ-PERTHES disease.