

## V. Zusammenfassung

Um einen genaueren Einblick in die Pathogenese der Hypothyreose des Hundes zu erhalten, sollte der TSH-Rezeptor auf seine Beteiligung an der Entstehung der Hypothyreose in Analogie zum Menschen hin überprüft werden. Beim Menschen können Mutationen des Rezeptorgens für einen partiellen oder aber auch vollständigen Verlust der Rezeptoraktivität verantwortlich sein. Klinisch können dabei deutlich erhöhte TSH-Werte mit normalen bis subnormalen T4-Werten beobachtet werden. Ähnliche Hormonverschiebungen können auch beim Hund nachgewiesen werden.

Zur Darstellung des zehnten Exons des caninen TSH-Rezeptorgens wurden anhand der bereits in der Literatur beschriebenen Sequenz verschiedene Primerpaarungen für die Polymerase-Ketten-Reaktion entwickelt. Die dafür notwendige genomische DNA wurde aus 2 ml EDTA-Vollblut mittels phenolfreier Extraktion aufgereinigt. Untersucht wurden verschiedene Wildcaniden (Canadischer Wolf, Rotfuchs, Eisfuchs, Rothund, Mähnenwolf und Marderhund), um einen Überblick über die aufgrund der Phylogenie des Hundes auftretenden Polymorphismen zu erhalten. Zusätzlich wurde die Sequenz bei jeweils einem euthyreoten Hund der Rassen, DSH, Beagle, Rhodesian Ridgeback, Golden Retriever und Labrador Retriever mit der bereits beschriebenen Sequenz verglichen. Außerdem wurden drei hypothyreote Hunde, zwei Golden Retriever und ein Rhodesian Ridgeback, untersucht.

Insgesamt konnten bei den Wildcaniden 16 Änderungen in der Basensequenz gegenüber der veröffentlichten Hundesequenz festgestellt werden. Diese Basenänderungen führten in drei Fällen zu einer Änderung der Aminosäure. Je nach Verwandtschaftsgrad überschritten sich die Änderungen bei den einzelnen Spezies. Wie wichtig die Untersuchung der Wildcaniden für die Beurteilung der Sequenz der Hunde ist, zeigt die Änderung in der Sequenz des Wolfes, die auch eine Aminosäureänderung bewirkte. Die gleiche Änderung konnte auch bei fünf von acht untersuchten Hunden festgestellt werden. Nur der untersuchte Labrador zeigte die gleiche Sequenz wie die bereits veröffentlichte. Zwei der drei Retriever wiesen zwei Änderungen der Basensequenz auf, ohne dass diese zu einer Änderung der Aminosäure führten. Einer dieser beiden Retriever war hypothyreot, so dass sich an diesem Beispiel zeigt, dass noch weitere Auskünfte über die Variabilität der Sequenz innerhalb verschiedener Rassen erlangt werden müssen, um eine Aussage darüber zuzulassen, ob beobachtete Änderungen nur Polymorphismen sind oder wirkliche Mutationen darstellen.

Der erkrankte Rhodesian Ridgeback zeigte eine Mutation in der zweiten zytoplasmatischen Schleife. Die Aminosäure wechselte hierbei von Serin nach Arginin, was einen erheblichen Effekt auf die Sekundärstruktur des Rezeptors haben muss, da sich die Reste doch deutlich voneinander unterscheiden. Außerdem ist von der betroffenen Aminosäureposition beim Menschen bekannt, dass Mutationen an dieser Stelle zu einem deutlichen Abfall der cAMP-Antwort der Zellen führen. Hieraus kann man schließen, dass diese Mutation der Grund für die Hypothyreose des Hundes sein kann. Andererseits sind aber noch weitere Untersuchungen notwendig, um Aussagen darüber machen zu können, ob die veränderte Rezeptorsequenz wirklich zu einer Beeinträchtigung der Rezeptoraktivität führt.

Zusammenfassend läßt sich also sagen, dass die vorliegende Arbeit die Grundlage einer

Diagnostik liefert, mit der man einen genetischen Defekt im Gefüge der Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsenachse erkennen und so zu einem Zuchtein bzw. -ausschluss für das betreffende Tier kommen kann.

## VI. Summary

Mareike Tapper

**Differences in the DNA sequence of the TSH receptor gene in dogs and other canids as possible cause of disturbed thyroid function**

The aim of the present study was to investigate the role of the TSH receptor in the pathogenesis of hypothyroidism in the canine. It is known that the human mutations in the TSH receptor gene result in total or partial loss of the normal receptor function. Clinical signs and hormone values in such patients are similar to those observed in some hypothyroid dogs. Therefore we hypothesise that changes in the canine TSH receptor could be at least partly responsible for disturbed thyroid function in the species.

Exon 10 of the canine TSH receptor was amplified using the polymerase chain reaction (PCR). The necessary primers were constructed in accordance with the sequence of the TSH receptor gene as published in the literature. Genomic DNA was purified from leukocytes isolated from EDTA blood. Various canids (grey wolf, red fox, arctic fox, dhole, maned wolf and racoon dog) were examined in order to get information about natural variation of TSH receptor gene sequence in the canidae family during phylogenesis. In addition the sequence of five euthyroid dogs (German Sheperd, Beagle, Rhodesian Ridgeback, Golden Retriever and Labrador Retriever) and three hypothyroid dogs (1 Rhodesian Ridgeback and 2 Golden Retrievers) was screened. In the wild canids a total of 16 base sequences were found to be different from the published dog sequence, however only in three cases did this result in amino acid changes of the receptor protein. Only the Labrador Retriever had the same sequence as the published data, whereas 5 out of 8 dogs and the grey wolf showed identical changes which differed from the published data. The Golden Retrievers in our study had 3 different base variations in the exon 10 stressing the need for further investigations.

In the hypothyroid Rhodesian Ridgeback a mutation in the second cytoplasmatic loop was found resulting in a substitution of serine by arginine, which has been shown to alter the structure of the mature protein. In the human, mutations in this position result in a reduced cAMP response of thyroid cells. Therefore it seems possible that in the hypothyroid Rhodesian Ridgeback in our study the disease was caused by described mutation in the TSH receptor gene.