

Feinkartierung eines QTL für die somatische Zellzahl auf
BTA02 und molekulargenetische Charakterisierung
positioneller und funktioneller Kandidatengene für
Mastitisresistenz in der Rasse Dt. Holstein

INES GÖRTZ



INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2012

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2012

© 2012 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Tierzucht und Haustiergenetik
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Georg Erhardt

**Feinkartierung eines QTL für die somatische Zellzahl auf
BTA02 und molekulargenetische Charakterisierung
positioneller und funktioneller Kandidatengene für
Mastitisresistenz in der Rasse Dt. Holstein**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Ines Görtz

Tierärztin aus Remscheid

Gießen, 2011

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter:

Prof. Dr. Georg Erhardt
Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Hartwig Bostedt

Tag der Disputation: 19. Dezember 2011

MEINER FAMILIE
UND
DRES. DAUBENBÜCHEL

Teile dieser Arbeit sind Bestandteil folgender Publikationen:

Görtz, I., Baes, C., Weimann, C., Reinsch, N. and Erhardt, G. (2009): Association between single nucleotide polymorphisms in the CXCR1 gene and somatic cell score in Holstein dairy cattle. *J Dairy Sci* 92: 4018-4022

Baes, C., Görtz, I., Mayer, M., Weimann, C., Liu, Z., Reinhardt, F., Erhardt, G. and Reinsch, N. (2010): Refined mapping of quantitative trait loci for somatic cell score on BTA02 in the German Holstein. *J Anim Breed Genet* 127: 180-188.

Diese Arbeit wurde im Rahmen des Projektes FUGATO - M.A.S.-Net "Funktionelle Analyse der genetischen Mechanismen, welche die Variabilität der Erregerabwehr in der Milchdrüse des Rindes determinieren"; Teilprojekt 2: Feinkartierung der QTL-Region von Chromosom 2 angefertigt.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis.....	XIII
Tabellenverzeichnis Anhang	XV
Abkürzungsverzeichnis	XVI
1 Einleitung	1
2 Literatur.....	3
2.1 Genomanalyse Rind	3
2.1.1 Strukturelle Genomanalyse beim Rind	3
2.1.1.1 QTL-Kartierung	4
2.1.1.2 QTL-Feinkartierung	6
2.1.1.3 Marker-gestützte Selektion	7
2.1.2 Funktionelle Genomanalyse.....	8
2.1.3 Identifizierung von Kandidatengenem	9
2.1.3.1 Auswahl von Polymorphismen für Assoziationsstudien.....	11
2.2 Mastitis Rind	13
2.3 Funktion der somatischen Zellen	15
2.4 Genetische Parameter der Mastitis und der SCC	17
2.4.1 Heritabilität Mastitis / SCC.....	17
2.4.2 Genetische Korrelationen zwischen Mastitis und SCC sowie dieser mit anderen Merkmalen.....	20
2.5 SCC als indirektes Merkmal für die Eutergesundheit.....	23
2.6 Zucht auf Eutergesundheit	25
2.6.1.1 Merkmalerfassung und Zuchtfortschritt	25
2.6.1.2 Derzeit realisierte Zuchtstrategien	26
2.7 QTL für die somatische Zellzahl und Mastitis.....	28
2.8 Mit der Eutergesundheit zusammenhängende QTL auf BTA02.....	29
2.9 Kandidatengene für die SCC auf BTA02.....	30
2.9.1 Signal Transducer and Activator of Transcription 1	30
2.9.2 Interleukin-8-Rezeptor A	31
2.9.3 Insulin-Like-Grow-Factor -Bindungsprotein-2.....	33

INHALTSVERZEICHNIS

2.9.4	Phosphatidylinositol-3-Phosphate /Phosphatidylinositol 5-Kinase, Type III ...	34
3	Material und Methoden	36
3.1	Material	36
3.1.1	Tiermaterial, Familienstruktur und Datenmaterial.....	36
3.1.1.1	QTL-Studie.....	36
3.1.1.2	Kandidatengenansatz.....	37
3.1.2	Verbrauchsmaterialien	38
3.1.3	Chemikalien	39
3.1.4	Reaktionskits	41
3.1.5	Größenstandards	41
3.1.5.1	Größenstandards für die Polyacrylamidgelelektrophorese mit dem ABI PRISM [®] 377 DNA Sequencer.....	41
3.1.5.2	Größenstandards zur Agarosegelelektrophorese	41
3.1.6	Enzyme.....	41
3.1.7	Oligonukleotide	42
3.1.8	Geräte	42
3.1.9	Referenzsequenzen.....	44
3.1.10	Computerprogramme	45
3.1.11	Datenbanken.....	45
3.2	Molekulargenetische Methoden	47
3.2.1	Kandidatengenauswahl.....	47
3.2.2	Auswahl der SNPs für Assoziationsanalysen.....	48
3.2.3	Gewinnung von Leukozyten aus Vollblut.....	49
3.2.4	Extraktion genomischer DNA aus Leukozyten.....	49
3.2.5	Extraktion genomischer DNA aus Tiefgefriersperma.....	49
3.2.6	Extraktion von mRNA aus Leukozyten	50
3.2.7	Reverse Transkription (cDNA-Synthese)	50
3.2.8	Amplifizierung ausgewählter Genbereiche mittels Polymerasekettenreaktion	50
3.2.8.1	Einzel-PCR.....	51
3.2.8.1.1	Primerauswahl	51
3.2.8.1.2	PCR-Bedingungen.....	54
	Tetra-Primer ARMS-PCR-Bedingungen	57
3.2.9	Amplifizierung von Mikrosatelliten.....	60
3.2.9.1	Mikrosatelliten- und Primerauswahl	60

INHALTSVERZEICHNIS

3.2.9.2	Bedingungen Multiplex-PCR.....	62
3.2.10	Sequenzanalyse	65
3.2.10.1	Aufreinigung der PCR-Produkte.....	65
3.2.10.2	Sequenzierung spezifischer Genbereiche.....	65
3.2.11	Restriktionsspaltung	66
3.2.12	Gelelektrophorese.....	67
3.2.12.1	Agarosegelelektrophorese	67
3.2.12.2	Polyacrylamidgelelektrophorese	68
3.2.13	Statistische Methoden	69
3.2.13.1	Genotypen	69
3.2.13.2	Allel- und Genotypfrequenz.....	69
3.2.13.3	Markerkarte	69
3.2.13.4	QTL-Analyse.....	69
3.2.13.4.1	Kopplungsgleichgewicht.....	69
3.2.13.4.2	Kopplungsungleichgewicht.....	70
3.2.13.5	Assoziationsanalyse	70
3.2.13.5.1	Assoziationsanalyse in einem 20 cM großen, den SNP umschließenden, Fenster	70
3.2.13.5.2	Einfluss des Genotyps nach Laktationen getrennt	71
3.2.13.5.3	Interaktion zwischen Genotyp und Familie in den heterozygoten Familien.....	71
4	Ergebnisse	72
4.1	Mikrosatellitenanalyse	72
4.1.1	Typisierbarkeit der Mikrosatelliten.....	72
4.1.2	Allelfrequenz der Mikrosatelliten	73
4.1.3	Genotypen der Väter	73
4.1.4	Karten- und Markerinformation	73
4.1.5	QTL-Analyse.....	75
4.1.5.1	Kopplungsgleichgewicht mittels Varianzkomponentenschätzung.....	75
4.1.5.2	Kopplungsungleichgewicht mittels Varianzkomponentenschätzung.....	75
4.1.5.3	Kombinierte LDLA-Varianzanalyse	75
4.1.5.4	Kombinierte LDLA-Regressionsanalyse	77
4.2	Kandidatengene	79
4.2.1	STAT1	79

INHALTSVERZEICHNIS

4.2.1.1	PCR und Sequenzierung.....	79
4.2.1.2	Darstellung des SNPs <i>STAT1/3`UTR</i> mittels RFLP.....	79
4.2.2	<i>CXCR1</i>	81
4.2.2.1	PCR und Sequenzierung.....	81
4.2.2.2	Darstellung des SNPs <i>CXCR1/5`UTR/-96</i> mittels RFLP	82
4.2.2.3	Darstellung des SNPs <i>CXCR1/5`UTR/-1768</i> mittels Tetra-Primer ARMS PCR.....	83
4.2.2.4	Darstellung des SNPs <i>CXCR1/Ex1/+199</i> mittels RFLP	85
4.2.2.5	Darstellung des SNPs <i>CXCR1/+777</i> mittels RFLP	86
4.2.3	<i>IGFBP2</i>	87
4.2.3.1	Sequenzierung	87
4.2.3.2	Darstellung des SNPs <i>IGFBP2/Int1/+55</i> mittels Tetra-Primer ARMS PCR.....	91
4.2.4	<i>PIP5K3</i>	93
4.2.4.1	Sequenzierung	93
4.2.4.2	Darstellung des SNPs <i>PIP5K3/Int18/-112</i> und des SNPs <i>PIP5K3/Ex19/+58</i> mittels Doppel-RFLP	94
4.2.4.3	Darstellung des SNPs <i>PIP5K3/Ex19/ +792</i>	96
4.2.4.4	Darstellung des SNPs <i>PIP5K3/Ex26/+69</i>	98
4.2.5	Ergebnisse der Auswahlkriterien für die SNPs	99
4.2.5.1	Allelfrequenzen im unverwandten Material.....	99
4.2.5.2	Lage und Scores der SNPs	100
4.2.5.2.1	<i>CXCR1</i>	100
4.2.5.2.2	<i>IGFBP2</i>	100
4.2.5.2.3	<i>PIP5K3</i>	102
4.3	Genotyp- und Allelfrequenzen	103
4.4	Assoziationsanalyse	104
5	Diskussion	108
5.1	Tiermaterial	108
5.2	Nutzung der DYDs für SCC als Merkmal	108
5.3	QTL-Kartierung	109
5.4	Auswahl und Untersuchung der Kandidatengene	113
5.5	Assoziationsanalyse der Kandidatengene	119
6	Zusammenfassung	128

7	Summary	130
8	Literatur	132
9	Anhang	152

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vorgeschlagene Vorgehensweise bei der Auswahl von Kandidatengen (modifiziert nach Ron und Weller, 2007)	10
Abbildung 2: Lineare Beziehung der Relativzuchtwerte für somatische Zellzahl und der Relativzuchtwerte für klinische Mastitis (kM) bei Schwedisch Rotbunt (SRB) und Schwedisch Friesian Bullen (SLB) (Philipsson et al., 1995)	25
Abbildung 3: Vorläufiges Profil des QTL für SCS auf BTA02 berechnet mit insgesamt 22 Markern. Je 2 Marker bilden ein Intervall. Die putative QTL-Position innerhalb eines Markerintervalls ist jeweils mit einem (•) angegeben Die X-Achse gibt die Position in cM bezogen auf den QTL-Bereich an, wobei die Lage des 1. Markers 50,87 cM entspricht. Unterhalb der X-Achse sind die einzelnen Marker, sowie schematisch ihre Position auf BTA02 angegeben. Stand Juni 2007	47
Abbildung 4: Erzeugung einer künstlichen Schnittstelle an den Polymorphismen <i>CXCR1/5`UTR/-96</i> und <i>PIP5K3/Int18/-112</i> durch Basenaustausch im Vorwärtsprimer. Die zur Erzeugung einer künstlichen Schnittstelle ausgetauschten Basen sind unterstrichen. Die Stelle des Polymorphismus ist jeweils fett gedruckt. R = G/A	52
Abbildung 5 a) und b): Restricted log-likelihood ratio der Kopplungsanalyse mit Kopplungsgleichgewicht (a) und Kopplungsungleichgewicht (b). Die putative QTL- Position innerhalb eines Markerintervalls ist jeweils mit einem (♦) angegeben. Die obere gestrichelte horizontale Linie gibt den genomweit-signifikanten, die untere den chromosomweit-signifikanten Schwellenwert an.	76
Abbildung 6: Restricted log-likelihood ratio der Kopplungsanalyse mit kombiniertem Kopplungsgleich- und -ungleichgewicht. Die putative QTL-Position innerhalb eines Markerintervalls ist jeweils mit einem (♦) angegeben. Die obere gestrichelte horizontale Linie gibt den genomweit-signifikanten, die untere den chromosomweit- signifikanten Schwellenwert an.	77
Abbildung 7: Restricted log-likelihood Profile der Kopplungsanalyse mit Regression des additiven Markereffektes in den Familien: <i>ILSTS098</i> (a) and <i>BMS778</i> (b). Die grauen Kurven zeigen die Kopplungsanalyse ohne Markerregression zur Verdeutlichung der Auswirkung des jeweiligen Markers auf die QTL-Varianz. Die putative QTL-Position innerhalb eines Markerintervalls ist jeweils mit einem (♦) angegeben. Die obere	

gestrichelte horizontale Line gibt den genomweit-signifikanten, die untere den chromosomweit-signifikanten Schwellenwert an. 78

Abbildung 8: Sequenz des PCR-Produktes *STAT1_3`UTR* mit der Base C an Stelle des Polymorphismus *STAT1/3`UTR*. Die Position des Polymorphismus ist grau hinterlegt. Die Primersequenzen sind fettgedruckt. Die Erkennungssequenzen des Enzyms *PagI* sind unterstrichen und die Schnittstellen des Enzyms mit einem Pfeil markiert. 80

Abbildung 9: Darstellung der Genotypen TT, CC und TC des SNPs *STAT1/3`UTR* mittels PCR-RFLP-Analyse mit dem Enzym *PagI* und anschließender Agarosegelelektrophorese 80

Abbildung 10: Darstellung des Polymorphismus *CXCR1/5`UTR/-96* mittels eines Sequenzausschnitts des PCR-Produkts *CXCR1_Ex1* 81

Abbildung 11: Ansicht des Polymorphismus *CXCR1/Ex1/+199* mittels eines Sequenzausschnitts des PCR-Produkts *CXCR1_Ex1* 81

Abbildung 12: Sequenz des PCR-Produktes *CXCR1_5`UTR_-96* mit der Base A an Stelle des Polymorphismus *CXCR1/5`UTR/-96*. Die Position des Polymorphismus ist grau hinterlegt. Die Erkennungssequenz des Enzyms *TaqI* ist unterstrichen, die Schnittstelle des Enzyms ist mit einem Pfeil markiert. Die Primersequenzen sind fettgedruckt. Letzte Base des Vorwärtsprimers ist die mit Hilfe des Primers eingebaute Base zur Erschaffung der künstlichen Schnittstelle (Kapitel 2.2.8.1.1)..... 82

Abbildung 13: Nachweis der Genotypen AA, GG und GA des SNPs *CXCR1/5`UTR/-96* durch PCR-RFLP-Analyse mit dem Enzym *TaqI* und anschließender Agarosegelelektrophorese 82

Abbildung 14: Primer der Tetra-Primer ARMS-PCR zur Darstellung des SNPs *CXCR1/5`UTR/-1768*, sowie Produktgrößen der PCR-Produkte. Unterstrichen sind die beiden Mismatchstellen der inneren Primer, fettgedruckt die beiden allelspezifischen Basen am 3`-Ende der inneren Primer. Alle Primer sind vom 5`- zum 3`-Ende angegeben..... 83

Abbildung 15: Sequenz des Kontrollfragments der äußeren Primer von *CXCR1/5`UTR/-1768*. Die über bzw. unter der Sequenz angegebenen Oligonukleotidesequenzen stellen die für die allelspezifische PCR ausgewählten Primer dar (siehe auch Abbildung 14). Die Stelle des Polymorphismus ist in der Sequenz grau hinterlegt. In den Oligonukleotiden ist die jeweilige Base, durch die es an der Position des Polymorphismus zu einer allelspezifischen Bindung des entsprechenden Primers kommt, grau hinterlegt. Unterstrichen sind die für eine Verbesserung der

Bindungsspezifität sorgenden Mismatchstellen drei Basen vor dem 3` bzw. 5`-Ende der Primer. 1) = äußerer Vorwärtsprimer, 2) = innerer Vorwärtsprimer, 3) = innerer Rückwärtsprimer reverse und complement und 4) = äußerer Rückwärtsprimer reverse und complement	84
Abbildung 16: Darstellung der Genotypen AA, TT und AT des SNPs <i>CXCR1/5`UTR/-1768</i> mittels Tetra-Primer ARMS-PCR und anschließender Agarosegelelektrophorese ...	84
Abbildung 17: Sequenz des PCR-Produkts <i>CXCR1_Ex1_+199</i> . Die Position des Polymorphismus <i>CXCR1/Ex1/+199</i> ist grau hinterlegt. Erkennungssequenzen des Enzyms <i>MnII</i> sind unterstrichen, Schnittstellen des Enzyms sind mit einem Pfeil markiert. Die Primersequenzen sind fettgedruckt.....	85
Abbildung 18: Darstellung Genotypen CC, TT, TC des SNPs <i>CXCR1/Ex1/+199</i> durch PCR-RFLP-Analyse mit dem Enzym <i>MnII</i> und anschließender Agarosegelelektrophorese	86
Abbildung 19: Sequenz des PCR-Produktes <i>CXCR1_Ex1_+199</i> . Die Position des Polymorphismus <i>CXCR1/Ex1/+199</i> ist grau hinterlegt. Erkennungssequenzen des Enzyms <i>BspI268I</i> sind unterstrichen, Schnittstellen des Enzyms sind mit einem Pfeil markiert. Die Primersequenzen sind fettgedruckt.....	86
Abbildung 20: PCR-RFLP-Analyse der Genotypen GG, CC und GC des SNPs <i>CXCR1/+777</i> mit dem Enzym <i>BspI268I</i> und anschließender Agarosegelelektrophorese .	87
Abbildung 21: Darstellung der Sequenziererergebnisse des in der Sequenz NC_007300 fehlenden Sequenzabschnitts von <i>IGFBP2</i> . Hellgrau hinterlegt ist der dem Exon I (Großbuchstaben) zugeordnete, dunkelgrau der dem Intron 1 (Kleinbuchstaben) zugeteilte Sequenzabschnitt. NP = Nukleotidposition in der Referenzsequenz NC_007300 des <i>IGFBP2</i>	89
Abbildung 22: Ansicht des Polymorphismus <i>IGFBP2/Int1/+55</i> mittels eines Sequenzausschnitts des PCR-Produkts <i>IGFBP2/Int1/+55</i> . Identische Nukleotide werden durch Punkte dargestellt.	89
Abbildung 23: Sequenzausschnitt des Introns 3 von <i>IGFBP2</i> zur Darstellung der Polymorphismen <i>IGFBP2/Int3/+146insG</i> , <i>IGFBP2/Int3/+167</i> und <i>IGFBP2/Int3/+193</i> . Die Nukleotidpositionen der Polymorphismen sind oberhalb der Sequenzen im Bezug auf die Position im Intron 3 angegeben. Identische Nukleotide werden durch Punkte, fehlende Nukleotide durch Striche dargestellt.	90
Abbildung 24: Kurvendarstellung der Insertion im Intron 3 des <i>IGFBP2</i> und der nachfolgenden Sequenziererergebnisse. Die obere Basenabfolge gibt die Sequenz um	

den Insertionsbereich an, die untere zeigt die Sequenzverschiebung durch die Insertion der Base G (grau hinterlegt). In der Kurvendarstellung ist ab diesem Punkt die Verschiebung der Sequenz durch zwei übereinander liegende Kurven sichtbar. 90

Abbildung 25: Primer der Tetra-Primer ARMS-PCR zur Darstellung des SNPs *IGFBP2/Int1/+55* sowie Produktgrößen der PCR-Produkte. Unterstrichen sind die beiden Mismatchstellen der inneren Primer, fettgedruckt die beiden allelspezifischen Basen am 3'-Ende der inneren Primer. Alle Primer sind vom 5'- zum 3'-Ende angegeben..... 91

Abbildung 26: Sequenz des Kontrollfragments der äußeren Primer von *IGFBP2/Int1/+55*. Die über bzw. unter der Sequenz angegebenen Oligonukleotidesequenzen stellen die für die allelspezifische PCR ausgewählten Primer dar (siehe auch Abbildung 25). Die Stelle des Polymorphismus ist in der Sequenz grau hinterlegt. In den Oligonukleotiden ist die jeweilige Base grau hinterlegt, durch welche es an der Position des Polymorphismus zu einer allelspezifischen Bindung des entsprechenden Primers kommt. Unterstrichen sind die für eine Verbesserung der Bindungsspezifität sorgenden Mismatchstellen 3 Basen vor dem 3'- bzw. 5'-Ende der Primer. Die Rückwärtsprimer sind reverse und complement angegeben. 1) = äußerer Vorwärtsprimer, 2) = innerer Vorwärtsprimer, 3) = innerer Rückwärtsprimer und 4) = äußerer Rückwärtsprimer 92

Abbildung 27: Tetra-Primer ARMS-PCR für den SNP *IGFBP2/Int1/+55* mit anschließender Agarosegelelektrophorese zur Darstellung der Genotypen AA, GG und GA 92

Abbildung 28: Darstellung der Polymorphismen a) *PIP5K3/Int18/-112* und b) *PIP5K3/Ex19/+58*. Die angegebenen Positionen sind im Bezug auf die Position im jeweiligen Exon bzw. Intron angegeben. Identische Nukleotide werden durch Punkte dargestellt. 93

Abbildung 29: Darstellung des Polymorphismus *PIP5K3/Ex26/+69*. Die angegebene Position ist im Bezug auf die Position im Exon angegeben. Identische Nukleotide werden durch Punkte dargestellt. 94

Abbildung 30: Sequenz des PCR-Produktes *PIP5K3_Int18-Ex19*. Die Position der Polymorphismen *PIP5K3/Int18/-112* (1) und *PIP5K3/Ex19/+58* (2) sind grau hinterlegt. Die Sequenzanteile des Introns sind in Kleinbuchstaben, die des Exons in Großbuchstaben dargestellt. Die Erkennungssequenzen des Enzyms *TaaI* sind unterstrichen, Schnittstellen des Enzyms sind mit einem Pfeil markiert. Die Primersequenzen sind fettgedruckt. Letzte Base des Vorwärtsprimers ist die mit Hilfe

des Primers eingebaute Base zur Erzeugung der künstlichen Schnittstelle im Intron18 (Kapitel 3.2.8.1.1).	94
Abbildung 31: Gelbild des Doppelverdaus von PIP5K3/Int18Ex19 mit dem Enzym TaaI zum Nachweis der SNPs PIP5K3/Int18/-112 und PIP5K3/Ex19/+58.	95
Abbildung 32: Mögliche Diplotypen der SNPs <i>PIP5K3/Int18/ -112</i> (Int18) und <i>PIP5K3/Ex19/+58</i> (Ex19) sowie die aus diesen durch einen Doppelverdau mit dem Enzym <i>TaaI</i> resultierenden Fragmentlängen in Basenpaaren. Fett gedruckt sind die im Probenmaterial gefundenen Diplotypen. Senkrechte Striche geben den Schnitt des Enzyms bei Vorhandensein der Base G an beiden Polymorphismen an. In den Kästchen sind die jeweiligen Fragmentgrößen in Anlehnung an ihre Auftrennung bei einer Agarosegelelektrophorese schematisch dargestellt. H = Haplotyp.....	96
Abbildung 33: Sequenz des PCR-Produktes <i>PIP5K3_Ex19_2</i> . Die Position des Polymorphismus <i>PIP5K3/Ex19/+792</i> ist grau hinterlegt. Die Erkennungssequenz des Enzyms <i>BveI</i> ist unterstrichen, die Schnittstelle des Enzyms mit einem Pfeil markiert. Fett gedruckt sind die Primersequenzen.....	97
Abbildung 34: Darstellung der Genotypen GG, AA und GA des SNPs <i>PIP5K3/Ex19/+792</i> mit dem Enzym <i>BciVI</i> mittels PCR-RFLP-Analyse und anschließender Agarosegelelektrophorese	98
Abbildung 35: Sequenz des PCR-Produktes <i>PIP5K3_Ex26</i> . Die Position des Polymorphismus <i>PIP5K3/Ex26/+69</i> ist grau hinterlegt. Die Erkennungssequenz des Enzyms <i>BfuI</i> ist unterstrichen, die Schnittstelle des Enzyms ist mit einem Pfeil markiert. Fett gedruckt sind die Primersequenzen.	98
Abbildung 36: Abbildung der Genotypen TT, GG und GT des SNPs <i>PIP5K3/Ex26/+69</i> . Dargestellt mittels PCR-RFLP-Analyse mit dem Enzym <i>BveI</i> und anschließender Agarosegelelektrophorese.	99
Abbildung 37: Die bovine Sequenz um den Polymorphismus <i>CXCR1/5`UTR/-96</i> wurde mittels des Programms TFSEARCH 1.3 auf das Vorhandensein von Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren untersucht. In der Abbildung sind die gefundenen Bindungsstellen des funktionell plausiblen Transkriptionsfaktors C/EBP (Entry) als Pfeile unterhalb der Sequenz dargestellt. Der Score gibt den Grad der Übereinstimmung der gefundenen Bindungsstelle mit der optimalen Konsensussequenz der TRANSFAC-Datenbank für Transkriptionsfaktoren an und wurde für beide Allele des Polymorphismus ermittelt. Die Position des Polymorphismus ist grau hinterlegt.....	100

- Abbildung 38: Die bovine (a) und humane (b) Sequenz um den Polymorphismus *IGFBP2/Int1/+55* wurde mittels des Programms TFSEARCH 1.3 auf das Vorhandensein von Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren untersucht. In der Abbildung sind die gefundenen Bindungsstellen des funktionell plausiblen Transkriptionsfaktors NF-kappaB als Pfeile unterhalb der Sequenz dargestellt. Der Score gibt den Grad der Übereinstimmung der gefundenen Bindungsstelle mit der optimalen Konsensussequenz der TRANSFAC-Datenbank für Transkriptionsfaktoren an und wurde für beide Allele des Polymorphismus ermittelt. Grau hinterlegt sind die Positionen des Polymorphismus..... 101
- Abbildung 39: Ausschnitt eines Sequenzvergleichs mit dem Programm VISTA Browser zur Feststellung der Konservierung des Genbereiches. Dargestellt ist die Region um den SNP *IGFB2/Int1/+55* welcher mit einem Pfeil markiert ist. Verglichen wurden die Sequenzen von Mensch (Human), Affe (Rhesus), Hund (Dog), Pferd (Horse), Maus (Mouse) und Ratte (Rat). Identische Basen haben eine identische Hintergrundfarbe. Punkte geben an, dass in der jeweiligen Spezies Basen bzw. Bereiche im Vergleich zu anderen Spezies nicht vorhanden sind. N gibt an, dass die Basenabfolge nicht bekannt ist. 102
- Abbildung 40: Die bovine Sequenz um den Polymorphismus *PIP5K3/Int18/-112* wurde mittels des Programms TFSEARCH auf das Vorhandensein von Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren untersucht. In der Abbildung sind die gefundenen Bindungsstellen des funktionell plausiblen Transkriptionsfaktors Oct-1 (Entry) als Pfeile unterhalb der Sequenz dargestellt. Der Score gibt den Grad der Übereinstimmung der gefundenen Bindungsstelle mit der optimalen Konsensussequenz der TRANSFAC-Datenbank für Transkriptionsfaktoren an und wurde für beide Allele des Polymorphismus ermittelt. Die Position des Polymorphismus ist grau hinterlegt..... 103
- Abbildung 41: Mittelwerte der DYDs in der 1. Laktation für die Genotypen des SNPs *IGFBP2/Int1/+55* innerhalb der typisierten heterozygoten Familien 107
- Abbildung 42: Mittelwerte der DYDs in der 1. Laktation für die Genotypen des SNPs *STAT1/3`UTR* innerhalb der typisierten heterozygoten Familien 107
- Abbildung 43: Kurve der Kopplungsanalyse auf BTA02. Eingezeichnet sind das 38 cM große Konfidenzintervall des vorderen QTL-Peaks sowie die ungefähre Lage der untersuchten Kandidatengene. Die durchgezogene Linie gibt die Begrenzung des

Konfidenzintervalls an, die gestrichelte Linie die genomweite Signifikanzgrenze sowie die gepunktete Linie die chromosomweite Signifikanzgrenze. 115

Abbildung 44: Mittelwerte der DYDs für die Genotypen des SNPs *CXCR1/5`UTR/-1768* in der 1. (DYD1); 2. (DYD2) und 3. Laktation (DYD3). Eingeflossen sind die Daten der 3 für diesen SNP heterozygoten Familien ADR-MAS 2, 5 und 6. 121

Abbildung 45: DYD-Mittelwerte der 1. Laktation für die Genotypen des SNPs *CXCR1/5`UTR/-1768* in den für diesen SNP heterozygoten Familien ADR-MAS 2, 5 und 6. 122

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auswahlkriterien für SNPs für Assoziationsanalysen (Tabor et al. 2002)	13
Tabelle 2: Beurteilung zytologisch-mikrobieller Befunde (DVG, 1994)	14
Tabelle 3: Geschätzte Heritabilitäten für die somatische Zellzahl bei Milchkühen	19
Tabelle 4: Genetische Korrelationen (r_g) zwischen somatischer Zellzahl (SCC) und klinischer Mastitis	21
Tabelle 5: Genetische Korrelation von Milchleistung (ML) mit klinischer Mastitis (kM) und somatischer Zellzahl (SCC)	22
Tabelle 6: Anzahl der Söhne in den einzelnen Familien und Verfügbarkeit der DNA der Väter	37
Tabelle 7: Methoden zur Untersuchung der Kandidatengene und die hierfür verwendete DNA sowie deren Ursprung	38
Tabelle 8: Referenzsequenzen der untersuchten Genregionen aus der GenBank	44
Tabelle 9 : PCR-Primer für die Gene <i>CXCR1</i> , <i>IGFBP2</i> , <i>PIP5K3</i> und <i>STAT1</i> sowie die PCR- Produktgrößen in bp	53
Tabelle 10: Ansätze der PCR für <i>CXCR1_Ex1_1P</i> , <i>CXCR1_+777</i> , <i>CXCR1_Ex1_+199</i> , <i>IGFBP2_Prom1/2</i> , <i>IGFBP2_Ex6</i> , <i>PIP5K3_Ex19_1/2</i> , <i>PIP5K3_Ex19_2N</i> und <i>STAT_3`UTR</i> , sowie den Mikrosatelliten <i>MNB48</i>	56
Tabelle 11: Ansätze der PCR für <i>IGFBP2_Ex2/3/4/5</i> , <i>CXCR1_5`UT_-96</i> und <i>PIP5K3_Ex26</i> mit 1,5 mM MgCl ₂	56
Tabelle 12: Ansatz der PCR für <i>IGFBP2_Ex1</i>	56
Tabelle 13: PCR-Ansatz für <i>PIP5K3_Ex5-9</i> , <i>PIP5K3_Ex12-18</i> , <i>PIP5K3_Ex23-28</i> und <i>PIP5K3_Ex28-33</i>	57
Tabelle 14: PCR-Ansatz für <i>CXCR1_5`UTR_-1768</i>	57
Tabelle 15: PCR-Ansatz für <i>IGFBP2_Int1_+55</i>	57
Tabelle 16: Standard-PCR-Protokoll zur Amplifikation von PCR-Produkten	58
Tabelle 17: PCR-Protokoll zur Amplifikation von PCR-Produkten aus cDNA	58
Tabelle 18: PCR-Produkte mit Annealingtemperatur, MgCl ₂ -Konzentration (in Puffer von ABgene und Roche enthalten), Elongationszeit und Zyklenanzahl sowie Verwendung der PCR-Produkte.	59
Tabelle 19: Auflistung der in der jeweiligen Multiplex-PCR enthaltenen Mikrosatelliten	60

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 20: Allelgröße, Primersequenzen und Label der Rückwärtsprimer der 24 untersuchten Mikrosatelliten	61
Tabelle 21: Multiplex Nr. 1, 10x Primermix der Mikrosatelliten (BMS353, DIK4726, MM8D3, BM1223)	63
Tabelle 22: Multiplex Nr. 2, 10x Primermix der Mikrosatelliten TGLA226, DIK4025, DIK2729, ILSTS82, BMS778, BMS1987, DIK5023).....	63
Tabelle 23: Multiplex Nr. 3, 10x Primermix der Mikrosatelliten TGLA110, ILSTS98 bzw. ILSTS98_neu, DIK1155, CSSM53, BMS1837	64
Tabelle 24: Multiplex Nr. 4, 10x Primermix der Mikrosatelliten DIK4880, DIK4676, DIK5133, DIK2862, DIK4972.....	64
Tabelle 25: Multiplex Nr. 5, 10x Primermix DIK4369, BMS1264, DIK4673	64
Tabelle 26: Reaktionsansatz für die Multiplex-PCR 1-5	64
Tabelle 27: PCR-Programm zur Durchführung der Multiplex-PCR	65
Tabelle 28: Mittels RFLP untersuchte SNPs sowie verwendete PCR-Produkte und RFLP-Bedingungen.....	67
Tabelle 29: Typisierungsergebnisse der untersuchten Mikrosatelliten	72
Tabelle 30: Markerinformation der untersuchten Mikrosatelliten sowie der SNPs <i>STAT1/3`UTR</i> und <i>CXCR1/+777</i> . Die Marker sind in ihrer berechneten Reihenfolge angegeben. Die Markerposition ist im Bezug auf die Position im untersuchten QTL-Bereich angegeben.	74
Tabelle 31: In den untersuchten Genen <i>CXCR1</i> , <i>IGFBP2</i> und <i>PIP5K3</i> durch Sequenzierung nachgewiesene SNPs	79
Tabelle 32: Allelfrequenzen der untersuchten SNPs in Dt. Holstein Tieren	99
Tabelle 33: F- und p-Werte der putativen QTL-Positionen in einem 20 cM großen den SNP umschließenden Fenster	104
Tabelle 34: Signifikanzwerte der Genotypeffekte und der Interaktion zwischen Genotyp und Vater auf die DYD für SCS in der 1. (DYD1), 2. (DYD2) und 3. (DYD3) Laktation. Kursiv sind die signifikanten Ergebnisse dargestellt.....	106

Tabellenverzeichnis Anhang

Tabelle A 1: Publierte QTL für die somatische Zellzahl bei Milchkühen.....	152
Tabelle A 2: DNA-Proben von Rindern verschiedener Rassen, die zur Polymorphismen- suche eingesetzt wurden.....	155
Tabelle A 3: Genutzte Marker für die vorläufige QTL-Berechnung auf BTA02. Die Posi- tion in cM gibt die Lage der Marker in der gesamten Kopplungskarte des MARC_USDA von BTA02 wieder, wobei 0 cM dem Beginn des Chromosoms entspricht.....	156
Tabelle A 4: Allele und Allelfrequenzen der untersuchten Mikrosatelliten.....	157
Tabelle A 5: Genotypen der Väter bezüglich aller 25 untersuchten Mikrosatelliten.....	162
Tabelle A 6: SNP-Allelfrequenz in den einzelnen Familien und im gesamten Proben- material	165
Tabelle A 7: Genotypfrequenzen im gesamten Probenmaterial und in den heterozygoten Familien.....	166
Tabelle A 8: Allel- und Genotypfrequenzen für den SNP <i>PIP5K3/Ex26/+69</i> in den hetero- zygoten Familien.....	167
Tabelle A 9: Ergebnisse der Assoziationsanalyse in einem 20 cm großen den jeweiligen SNP umschließenden Fenster.....	167

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
ACRS	Amplification created restriction sites
ADR	Arbeitsgemeinschaft deutscher Rinderzüchter
ARMS	Tetra-primer amplification refractory mutation system
AS	Aminosäure
Bp	Basenpaare
BTA	Bos taurus Autosom
bzw.	beziehungsweise
ca.	Circa
Ca ²⁺	Kalzium-Ionen
cDNA	Copy desoxyribonucleic acid
CLC	Chloride channel
cM	Centimorgan
CXCR	Chemokine receptor
dGW	direkter genomischer Zuchtwert
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonucleic acid
DMSO	Dimethylsulfoxid
Dt.	Deutsch
DYD	Daughter yield deviation
EBV	Estimated breeding value
Ex	Exon
IGFB	Insulin-like-growth-factor-Bindungsproteine
IL	Interleukin
Int	Intron
DGAT	Diacylglycerol acyltransferase
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ENA	Epithelial neutrophil-activating peptide
et. al.	et alii
GCP	Granulocyte chemotactic protein
GRO	Growth related oncogene
gZW	genomisch unterstützter Zuchtwert
h ²	Heritabilität
HZ	Heterozygotie
IFN	Interferon
INRA	Institut national de la recherche agronomique
kM	klinische Mastitis
LA	Linkage analysis
LD	Linkage disequilibrium
LDL	Linkage disequilibrium and linkage
LOD	Logarithm of the odds
LSCS	Lactation mean of SCS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

M	Marker
MAS	Marker assisted selection
MHC	Major histocompatibility complex
Mg ²⁺	Magnesium-Ionen
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
ML	Milchleistung
mA	Milliampere
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mRNA	Messenger ribonucleic acid
NF	Nuclear factor
neg.	negativ
ng	Nanogramm
NK	Natürliche Killerzelle
nm	Nanometer
QTL	Quantitative trait locus
QTN	Quantitative trait nucleotide
p.a.	zur Analyse
PCR	Polymerase chain reaction
PIC	Polymorphism information content
r _g	Genetische Korrelation
pH	pH-Wert
pmol	Pikomol
rpm	Umdrehungen per Minute
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RZG	Relativzuchtwert Gesamt
RZS	Relativzuchtwert Zellzahl
SCC	Somatic cell count
SCS	Somatic cell score
SDS	Sodium dodecyl sulfate
Seq.	Sequenz
SNP	Single nucleotide polymorphism
Staph. aureus	Staphylococcus aureus
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TFB	Transkriptionsfaktorbindungsstelle
TNF	Tumornekrosefaktor
UTR	Untranslated region
V	Volt
v.a.	vor allem
V-ATP	Vacuolar-type H ⁺ -adenosine triphosphate
VIT	Vereinigte Informationssysteme Tierhaltung
W	Watt

1 Einleitung

In den vergangenen Jahrzehnten konnte bei Milchkühen ein enormer Anstieg in der Milchleistung erreicht werden. Dieser Trend wird jedoch von einer deutlich sinkenden Nutzungsdauer bzw. vorzeitigen Abgängen auf Grund von Krankheiten begleitet (Dürr et al., 1997; Essl, 1998; Royal et al., 2000; Brade, 2005). Neben Fruchtbarkeitsproblemen steht hierbei als Ursache unter anderem die Euterentzündung (Mastitis) im Vordergrund, an der jährlich durchschnittlich ca. 30% aller in Deutschland gehaltenen Kühe erkranken. Die hierbei entstehenden Kosten werden auf rund 150 €/Kuh/Jahr geschätzt (DVG, 2002), wodurch alleine in Deutschland jährliche Verluste von rund 1 Milliarde Euro entstehen. Mit über 50 % spielen hierbei neben den Kosten, die durch die Behandlung der Tiere anfallen, vor allem die Einbußen durch eine verminderte Milchproduktion eine große Rolle. Zusätzlich kommt es zu einer verminderten Käseeritauglichkeit der Milch. Neben den hohen finanziellen Verlusten hat die Mastitis durch eventuelle Rückstände in der Milch und die Humanpathogenität einiger Mastitiserreger auch eine große Bedeutung für die lebensmittelhygienische Wertigkeit der Milch. Aber auch Aspekte des Tierschutzes dürfen bei der Betrachtung des Problems Mastitis nicht außer Acht gelassen werden.

Der in den letzten Jahrzehnten verzeichnete negative Trend in Bezug auf die Nutzungsdauer und Krankheitsanfälligkeit bei Milchrindern lässt sich durch die genetische Korrelation zwischen Leistungsmerkmalen und funktionellen Merkmalen, insbesondere Gesundheitsmerkmalen, erklären. Durch eine effiziente, auf Produktivität basierende Selektion und den genetischen Antagonismus zwischen Milchleistung und klinischer Mastitis steigt indirekt die Mastitisfrequenz (Strandberg und Shook, 1989; Heringstad et al., 2007).

Bemühungen mittels züchterischer Methoden eine verbesserte Eutergesundheit bei Milchkühen zu erreichen, werden durch den Fakt erschwert, dass es sich bei der Mastitis um eine multifaktorielle Erkrankung handelt, bei deren Entstehung neben der Genetik des Tieres und der Erregerpathogenität in erster Linie die Umwelt eine wichtige Rolle spielt. Die geringe Heritabilität und die schwierige Erfassung des Merkmals Mastitis begrenzen daher die Erfolge bei der Züchtung auf Mastitisresistenz mit dem direkten Merkmal Mastitis.

Seit 1990 wird diesem Problem durch die Aufnahme der somatischen Zellzahl (SCC) als Teilzuchtwert (RZS) in den Gesamtzuchtwert (RZG) Rechnung getragen. Die SCC zeichnet sich als indirektes Merkmal dadurch aus, dass sie eine relativ hohe genetische Korrelation mit Mastitis aufweist, leichter zu erfassen ist und eine höhere Heritabilität als diese hat (Schutz,

1994). Da die Heritabilität der SCC, wenn auch höher als die der Mastitis, mit durchschnittlich 0,12 (Schutz, 1994) für die züchterische Nutzung immer noch relativ gering ist, wird die Zucht auf der Basis von Phänotypen alleine nicht ausreichend sein, um Kühe zu erhalten, die neben einer guten bzw. sehr guten Milchleistung auch eine gute Eutergesundheit aufweisen.

Neuere Ansätze bestehen darin, die konventionellen tierzüchterischen Methoden durch molekulargenetische Methoden zu ergänzen. Sowohl in der Pflanzen- als auch in der Tierzucht wird die Marker-Assisted-Selection (MAS) eingesetzt. Vorteile ergeben sich unter anderem daraus, dass bei der MAS im Gegensatz zu konventionellen Methoden eine frühere Selektion auch bei geschlechtsgebundenen Merkmalen wie Mastitis bzw. SCC möglich ist und dadurch der Züchterfolg beschleunigt werden kann. Neben der Selektion mit Hilfe von indirekten Markern verspricht die Selektion auf der Basis von direkten Markern, d.h. mit kausalen Genvarianten einen noch größeren Erfolg.

Im Rahmen des nationalen Projektes „Genomanalyse Rind“ der ADR konnte auf BTA02 ein Quantitative Trait Locus (QTL) identifiziert werden, welcher mit der Ausprägung des quantitativen Merkmales SCC in Zusammenhang steht (Bennewitz et al., 2003). Innerhalb dieses Bereichs befinden sich Gene, deren Varianten mit den für die QTL-Analyse genutzten Markern gekoppelt und ursächlich für die Ausprägung dieses Merkmales sind (Georges et al., 1995; Olsen et al., 2004).

Der Nutzen eines solchen QTL für die Züchtung hängt jedoch vor allem von der Genauigkeit der Lokalisation des QTL und der Genauigkeit des geschätzten Einflusses auf das assoziierte Merkmal ab. Aus diesem Grund sind die Bestätigung gefundener QTL und ihre weitere Eingrenzung von wesentlicher Bedeutung für die Nutzung in Zuchtprogrammen (Spelman und Bovenhuis, 1998). Die Identifikation von Kandidatengenen in einem solchen QTL wird bei komplexen Vererbungsgängen durch das relativ große Intervall erschwert, in welchem sich eine Vielzahl möglicher Kandidatengene befinden kann (Georges, 2007).

Ziel dieser Arbeit ist es daher, den auf BTA02 gefundenen QTL für die somatische Zellzahl beim Rind mittels weiterer Marker zu validieren und den Bereich einzugrenzen. Im Anschluss an diese Feinkartierung sollen in dem QTL-Bereich, unter Einbezug von Expressionsdaten aus Partnerprojekten, positionelle und funktionelle Kandidatengene ausgewählt werden. Diese Gene sollen mit Hilfe molekulargenetischer Verfahren auf Mutationen hin untersucht und diese genetischen Varianten auf eine Assoziation mit der Höhe der somatischen Zellzahl in der Rasse Deutsch Holstein überprüft werden.

2 Literatur

2.1 Genomanalyse Rind

Das primäre Ziel der Genomanalyse bei landwirtschaftlichen Nutztieren ist die Klärung der Ursachen phänotypischer Variationen auf genetischer Ebene.

Im Bereich der strukturellen Genomanalyse, welche dem Nachweis merkmalsassoziierter Genvarianten dient, hat es beim Rind seit Ende der 1980er Jahre enorme Fortschritte gegeben. Die funktionelle Genomanalyse stellt hingegen, unter anderem durch den Nachweis unterschiedlicher Genexpressionsmuster, eine Möglichkeit zum besseren Verständnis der den Merkmalsausprägungen zugrunde liegenden Mechanismen dar.

Die Kombination beider Ansätze bietet in der quantitativen Genetik einen wesentlichen Vorteil, da durch die Kenntnis der der Merkmalsausprägung zugrunde liegenden Mechanismen eine effektivere Suche nach krankheits- und leistungsassozierten Genen und deren Varianten möglich ist.

2.1.1 Strukturelle Genomanalyse beim Rind

Beim Rind sind vor allem funktionelle Merkmale wie Konstitutionsparameter, Langlebigkeit und Fruchtbarkeit von züchterischem Interesse. Es handelt sich hierbei um quantitative Merkmale, d.h. Merkmale, welche eine kontinuierliche Variabilität aufweisen. Ihre Ausprägung ist neben genetischen Faktoren auch von Umwelteinflüssen abhängig (Mackay, 2001). Sie sind polygener Natur und werden von einer Vielzahl von Genen bzw. Genloci kontrolliert (Barton und Turelli, 1989; Schnabel et al., 2005). Die Mitglieder des „Complex Trait Consortiums“ definierten sie als Merkmale mit einer messbaren phänotypischen Variation infolge genetischer und/oder umweltbedingter Einflüsse (Abiola et al., 2003). Im Gegensatz zu dem Anfang des 20. Jahrhunderts von Fisher (1918) postulierten infinitesimalen Modell nimmt man heutzutage an, dass es neben vielen Genen mit sehr geringem Effekt bei den meisten quantitativen Merkmalen Hauptgene gibt, die einen größeren Einfluss ausüben (Farrall, 2004; Fries und Pausch, 2011). Chromosomale Bereiche in denen solche Gene liegen und für welche eine Assoziation mit einem quantitativen Merkmal festgestellt wurde, bezeichnet man als *Quantitative Trait Loci* (QTL) (Geldermann, 1975). Der Merkmalsausprägung zugrunde liegende Genvarianten werden *Quantitative Trait Nucleotide* (QTN) genannt (Long et al., 1998; Phillips, 1999).

Je mehr Loci an der Merkmalsausprägung beteiligt sind, umso schwieriger ist es, alle ursächlichen QTL zu identifizieren, da der einzelne Effekt, den ein QTL auf ein Merkmal ausübt, umso geringer ist, je mehr Loci involviert sind (Abiola et al., 2003). Auf Grund der Komplexität der quantitativen Merkmale ist der Nachweis eines einzelnen QTL daher relativ schwierig. Zur Realisierung dieses Ziels werden vor allem zwei Ansätze verfolgt. Ein Ansatz basiert auf Assoziationsstudien von funktionellen Kandidatengen, der andere auf Kopplungsanalysen mit anonymen Markern in Form eines *Whole Genome Scans* (Andersson, 2001).

Der Vorteil beim Kandidatengenansatz liegt darin, dass kein Familienmaterial nötig ist und auch Loci mit nur sehr geringem Effekt gefunden werden können (Risch und Merikangas, 1996b). Um die Effizienz des Kandidatengenansatzes zu steigern und seine Kosten möglichst gering zu halten, werden aus der Vielzahl von Genen solche ausgesucht, welche auf Grund ihrer Funktion wahrscheinlich im Zusammenhang mit der Merkmalsausprägung stehen. Die Auswahl aus den bis zu mehreren hundert in Frage kommenden Genen ist bei dieser Vorgehensweise subjektiv (Zhu und Zhao, 2007). Außerdem ist bei einigen Genen die Funktion nicht oder nur unzureichend bekannt. Dies kann dazu führen, dass die Relevanz von Genen, deren merkmalsbezogene Funktion nicht offensichtlich ist, falsch eingeschätzt wird und Gene trotz deren Beteiligung an der Merkmalsausprägung nicht ausgewählt und analysiert werden (Andersson, 2001; Tabor et al., 2002; Vink und Boomsma, 2002; Zhu und Zhao, 2007).

Bei Kopplungsanalysen ist hingegen die Möglichkeit alle der Merkmalsausprägung zugrunde liegenden genetischen Ursachen identifizieren zu können eingeschränkt, da sie nicht genügend statistische Power zur Detektierung von QTL mit sehr geringen Effekten besitzen (Andersson, 2001). Basierend auf der Annahme, dass QTL mit geringen Effekten fast vollständig die genetische Varianz eines quantitativen Merkmals ausmachen, geht Georges (2007) sogar davon aus, dass bei alleiniger Anwendung von Kopplungsanalysen ein Großteil dieser Varianz weiterhin ungeklärt bleibt.

2.1.1.1 QTL-Kartierung

Häufig werden – wie in Kapitel 2.1.1 bereits erwähnt – zur Kartierung, d.h. Identifizierung der QTL Kopplungsanalysen über das gesamte Genom in Form eines *Whole Genome Scans* vorgenommen.

Das Genom wird mit anonymen Markern, z.B. Mikrosatelliten, abgedeckt, diese typisiert und eine anschließende Kopplungsanalyse durchgeführt (Olsen et al., 2004). Auch SNPs, welche in einer wesentlich größeren Anzahl im Genom vorhanden sind, werden seit ein paar Jahren als Marker für QTL-Studien genutzt (Georges, 2007; Kolbehdari et al., 2008; Kolbehdari et al., 2009; Matukumalli et al., 2009; Stoop et al., 2009). Durch die Entwicklung der SNP-Chips stehen derzeit für die Genotypisierung insgesamt 3 Chips mit bis zu 777.962 SNP zur Verfügung (Fries und Pausch, 2011).

Bei Milchrindern kann das - für den Nachweis eines QTLs wichtige (Andersson, 2001) - Kopplungsungleichgewicht (*Linkage Disequilibrium*, LD) zwischen QTL und einem der untersuchten Marker auch zwischen voneinander weiter entfernten Marker- und QTL-Allelen in der kommerziellen Zuchtpopulation durch Anwendung eines *Daughter-* oder *Granddaughter Designs* gefunden werden (Weller et al., 1990).

Die familienbasierende Kopplungsanalyse kann daher als ein spezieller Fall der LD-Kartierung angesehen werden, in welcher das LD durch die Erstellung einer Population aus einer kleinen Anzahl von Vorfahren erzeugt wird (Mackay und Powell, 2007). Da dieses LD jedoch familienspezifisch ist und die Kopplungsphase benachbarter Marker zwischen Familien variieren kann, können die Marker nur für die Selektion innerhalb bestimmter Familien genutzt werden (Sahana et al., 2008).

Gehen in die Kopplungsanalyse lediglich die Daten von zwei bis drei Generationen ein, erhöht sich der Informationsgehalt bezüglich der exakten QTL-Position nur gering, da in diesen nur wenige Rekombinationen zwischen benachbarten Markern stattgefunden haben (Darvasi et al., 1993; Meuwissen und Goddard, 2000). Vielmehr ist für die Eingrenzung des Konfidenzintervalls die Größe des QTL-Effektes und vor allem der Umfang der einbezogenen Population von Bedeutung (Darvasi et al., 1993; Abiola et al., 2003). Im Rahmen der von Bennewitz et al. (2003) durchgeführten Joint-Analyse zweier *Granddaughter Designs* konnte dies bestätigt werden. In dieser erhielt ein chromosomweit- signifikanter QTL für den SCS auf BTA02, der auf den Berechnungen mit deutschen Bullen basierte, durch die Kombination deutscher und französischer Nachkommen eine genomweite Signifikanz. In Populationen mit einem relativ hohen Inzuchtkoeffizient bieten viele kleine Familien außerdem einen noch höheren Informationsgehalt als wenige Familien mit vielen Nachkommen (Lee und van der Werf, 2006).

Auch bei QTLs mit einem großen Effekt, vielen typisierten Individuen und einer unendlich hohen Anzahl von Markern wird das Konfidenzintervall mittels der Kopplungsanalyse jedoch

nicht kleiner als 10 cM (Darvasi et al., 1993), weshalb sich diese Methode nicht für eine Feinkartierung eignet (Meuwissen und Goddard, 2000; Olsen et al., 2004).

2.1.1.2 QTL-Feinkartierung

Um den QTL-Bereich und damit die Anzahl der in Frage kommenden Gene einzugrenzen, wird in den meisten Fällen im Anschluss an einen *Genome Scan* eine Feinkartierung durchgeführt. Der Einbezug des populationsweiten LD in die Berechnung kann hierbei die Präzision der Positionsschätzung eines QTLs erhöhen, da alle Rekombinationen, welche seit Entstehung der Mutationen aufgetreten sind, genutzt werden (Meuwissen und Goddard, 2000; Abdallah et al., 2003).

Farnir et al. (2000) wiesen bei Milchrindern ein starkes Kopplungsungleichgewicht benachbarter Loci nach und schlussfolgerten, dass die Aussichten einer Identifizierung von QTLs mit Hilfe der LD-Kartierung in dieser Population äußerst vielversprechend sei. Im gleichen Jahr beschrieben Meuwissen und Goddard (2000) erstmals die LD-Kartierung als Mittel zur Feinkartierung bei Nutztieren. Die in dieser Arbeit eingesetzte statistische Methode schätzt die Effekte von Markerhaplotypen dicht platzierter Marker auf ein quantitatives Merkmal. Sie basiert auf einer Regressionsanalyse, mit der das Kopplungsungleichgewicht zwischen einem Marker und dem QTL gemessen werden kann. Durch den Einbezug von Markerhaplotypen können hierbei gleichzeitig mehrere Markerloci untersucht werden (Meuwissen und Goddard, 2000). In dem Markerintervall, dessen Haplotypen den größten Effekt auf das Merkmal ausüben, befindet sich der QTL. Voraussetzung für diese Methode ist die Annahme, dass Markerhaplotypen, welche identische Markerallele in der den QTL umschließenden Region besitzen, die gleichen Haplotypeneffekte zeigen, da die identischen Marker darauf hindeuten, dass die Region identical-by-descent ist und die Haplotypen daher wahrscheinlich die gleichen QTL-Allele tragen (Meuwissen und Goddard, 2000; Meuwissen und Goddard, 2001). Gleiche Haplotypeneffekte werden durch eine hohe Kovarianz ausgedrückt. Da die Position des QTLs darüber bestimmt, ob zwei Markerhaplotypen identische QTL-Allele haben, beeinflusst die Position des QTLs rückfolgendernd auch die Kovarianz zwischen den Haplotypeneffekten. Aus diesem Grund kann die Höhe der Kovarianz zwischen Haplotypeneffekten genutzt werden, um die Position des QTLs feiner zu bestimmen (Meuwissen und Goddard, 2000; Meuwissen und Goddard, 2001; Meuwissen et al., 2002).

Durch das häufige Auftreten von gametischen Assoziationen zwischen nicht syntenischen Loci kann es bei der LD-Kartierung zu falsch positiven Ergebnissen kommen. Durch eine

kombinierte Kopplungsgleich- und -ungleichgewichtskartierung (LDL-Kartierung) können diese jedoch vermieden werden (Farnir et al., 2000), da in dieser die Kopplungsinformationen der genotypisierten Generationen und das LD „historischer“ Rekombinationen der nicht genotypisierten Generationen kombiniert werden (Meuwissen et al., 2002; Lee und van der Werf, 2005).

2.1.1.3 Marker-gestützte Selektion

Die Marker-gestützte Selektion (MAS) nutzt Informationen über Marker, für die innerhalb von QTL-Studien eine signifikante Assoziation mit einem Leistungs- oder Gesundheitsmerkmal gefunden werden konnte. Mit Hilfe dieser Marker können Individuen identifiziert werden, die für die Zucht günstige Kombinationen der QTLs aufweisen (Davis und DeNise, 1998). Genetische Marker in QTL-Regionen machen es hierbei möglich, markergestützte Zuchtwerte zu berechnen. Diese können für die Identifizierung von Tieren herangezogen werden, welche eine erwünschte oder unerwünschte Disposition im Bezug auf das genutzte Merkmal aufweisen (Kühn et al., 2008).

Das Maß des Zuchtfortschritts durch Selektion ist von vier wesentlichen Faktoren abhängig: der genetischen Variation, der Selektionsgenauigkeit, der Selektionsintensität und dem Generationsintervall (Falconer, 1960; Georges, 2001). Durch DNA-Marker-gestützte Selektionstechniken ist eine exakte Charakterisierung der genetischen Anlagen gegeben. Es kann eine sichere Erkennung auch rezessiver Anlageträger erfolgen, die Diagnose ist unabhängig von der Merkmalsausprägung, vom Alter und vom Geschlecht möglich und das Selektionsintervall kann verringert werden (Schwerin et al., 2006; Weller, 2007). Die markergestützte Vorhersage kann daher die nur auf phänotypischen Daten basierende Selektion verbessern (Kalm, 2002). Es wird davon ausgegangen, dass im Vergleich zu traditionellen Zuchtprogrammen durch die MAS der Zuchtfortschritt um 5 bis 20% erhöht werden kann (Georges, 2001). Für die somatische Zellzahl (SCC) konnte gezeigt werden, dass im Vergleich zur Standardselektionsstrategie, die ausschließlich konventionellen Zuchtwerte verwendet, der Einbezug von Markerinformationen aus einem auf BTA18 befindlichen QTL für SCC eine stärkere Diskriminierung zwischen und eine größere Homogenität innerhalb der, nach ihrer vorhergesagten Empfänglichkeit eingeteilten, Gruppen erzielt werden konnte (Kühn et al., 2008).

Die MAS kann sowohl mit direkten als auch mit indirekten Markern durchgeführt werden. Überwiegend werden jedoch indirekte Marker eingesetzt (Davis und DeNise, 1998), die mit

dem QTL nur gekoppelt sind und im Gegensatz zu direkten Markern keine funktionelle Genvariante darstellen.

Nachteile der indirekten Gentests im Gegensatz zur Selektion mit kausalen Genvarianten (direkte Marker) sind eine geringere Genauigkeit und die Tatsache, dass die assoziierten QTL-Marker-Haplotypen und ihre Kopplung familien- bzw. populationspezifisch sind (Schwerin et al., 2006). In den für die Selektion bzw. Züchtung genutzten Familien muss daher theoretisch die Assoziation der Marker mit dem Merkmal verifiziert werden. Es kann jedoch davon ausgegangen werden, dass bei einem QTL, welcher feinkartiert wurde, die Assoziation zwischen spezifischen Markerhaplotypen und QTL-Allelen in der Population stabil ist und in diesen Fällen keiner erneuten Feststellung bedarf (Khatkar et al., 2004). Dennoch bleiben direkte Marker die effektivsten Marker für den Einsatz in Zuchtprogrammen (Williams, 2005) und ihre Feststellung bleibt auch trotz Einsatzes der genomischen Selektion mit Hilfe von SNP-Chips das Ziel in Forschung und Züchtung (Fries und Pausch, 2011)

2.1.2 Funktionelle Genomanalyse

Um die genauen Hintergründe der Gen- bzw. Proteinfunktion zu verstehen reicht die Kenntnis des Genoms alleine nicht aus. Die funktionelle Genomanalyse leistet zur Klärung dieser Hintergründe einen wesentlichen Beitrag. Unter anderem werden Analysen der dynamischen Prozesse wie Transkription, Translation und Protein-Protein-Interaktionen durchgeführt. Die für die funktionelle Genomanalyse angewandten Methoden sind der Zusammenfassung von Hiendleder et al. (2005) zu entnehmen.

Einen bedeutenden Hinweis auf die Funktion eines Gens können die Umstände geben, unter denen ein Gen exprimiert wird. Vor allem die Untersuchung gewebe- bzw. krankheitsspezifischer Genexpression kann Hinweise über die Beteiligung von Genen an Krankheitsgeschehen geben. Mit Expressionsprofilen einer ausreichend großen Zahl von Geweben können statistisch signifikante Korrelationen zwischen gewebespezifischen Informationen (wie Krankheitsstatus, Behandlungs- oder Umwelteffekte oder Genotypen) und dem Expressionsniveau von ausgewählten Genen oder Gruppen von Genen abgeleitet werden (Boguski und Schuler, 1995).

Ergebnisse aus vergleichenden Transkriptom-Analysen können z.B. im Rahmen von Resistenzstudien weitere Informationen liefern. Für ein solche Studie wurden resistente und empfängliche Schaflinien der Rasse Perendale, welche basierend auf ihrer Eiausscheidungsrate nach Nematodeninfektion seit 1986 selektiert wurden, genutzt. Zwischen den in empfänglich und resistent eingeteilten Gruppen konnte eine unterschiedliche

Genexpression sowohl vor als auch nach Infektion nachgewiesen und als Ergebnis immunrelevante Gene näher bestimmt werden (Keane et al., 2006; Keane et al., 2008).

Für die Expressionsanalyse von Genen innerhalb einer QTL-Region können zur Untersuchung auch Tiere herangezogen werden, deren Markerinformation auf eine genetisch bedingt unterschiedliche Abwehrfähigkeit hinweist (Seyfert et al., 2008).

2.1.3 Identifizierung von Kandidatengen

Das Auffinden kausaler Genvarianten ist das eigentliche Ziel der strukturellen Genomanalyse. Um dieses Ziel zu erreichen werden Kandidatengene ausgewählt, deren Varianten auf eine mögliche Assoziation mit dem Merkmal untersucht werden. Kandidatengene im eigentlichen Sinn sind Gene mit bekannter biologischer Funktion, die direkt oder indirekt den Entwicklungsprozess des untersuchten Merkmals beeinflussen (Zhu und Zhao, 2007).

Auswahlkriterien für Kandidatengene können die Lage in einer das Merkmal beeinflussenden Region (QTL) oder die Zugehörigkeit eines Gens zu einem merkmalbeeinflussenden physiologischen System sein (Vink und Boomsma, 2002). Je nach Ansatz spricht man bei den zur weiteren Analyse ausgewählten Genen von positionellen bzw. funktionellen Kandidatengen.

Positionelle Kandidatengene (QTL-Studien)

Unter positionellen Kandidatengen versteht man Gene, die in einem bereits identifizierten QTL-Bereich liegen. Die Auswahl basiert auf der physikalischen Kopplungsinformation (Zhu und Zhao, 2007). Über die Funktionen des Genproduktes müssen bei diesem Ansatz keine Erkenntnisse vorhanden sein.

Funktionelle Kandidatengene (Kandidatengenansatz)

Bei funktionellen Kandidatengen handelt es sich um Gene, deren Funktion bekannt ist und die im Zusammenhang mit dem untersuchten Merkmal stehen.

Um die in Kapitel 1.1.1 beschriebenen Nachteile der jeweiligen Ansätze zu minimieren, wird zur Klärung der den quantitativen Merkmalen zugrunde liegenden genetischen Faktoren häufig eine Kombination des funktionellen und positionellen Ansatzes verfolgt (Abbildung 1). Hierbei wird zur Ermittlung assoziierter Chromosomenregionen eine QTL-Kartierung mit Mikrosatelliten durchgeführt, an welche sich dann die Analyse von Kandidatengen in diesem Bereich anschließt (Andersson, 2001). Die Kombination von Genexpressionsdaten

über die in einem Konfidenzintervall befindlichen Gene kann hierbei die Lücke zwischen Feinkartierung und QTN-Identifizierung schließen (Ron et al., 2007). Bei den ausgewählten Genen handelt es sich demnach sowohl um positionelle als auch funktionelle Kandidatengene. Außerdem steht die Möglichkeit einer vergleichenden Kartierung zur Verfügung, bei der identische Chromosomenregionen verschiedener Spezies unter anderem mit Hilfe der Reihenfolge genetischer Marker verglichen werden (Andersson und Georges, 2004). Informationen (sowohl positionelle als auch funktionelle) über Gene in Chromosomenregionen, die mittels QTL-Kartierung in einer Spezies gefunden wurden, stehen hierdurch von einer anderen Spezies zur Verfügung. Dies ist vor allem dann sinnvoll, wenn bei der untersuchten Spezies nicht alle in dem QTL-Bereich befindlichen Gene identifiziert und charakterisiert wurden und in anderen Spezies mehr Informationen vorhanden sind (O'Brien, 1991; Weikard et al., 2006).

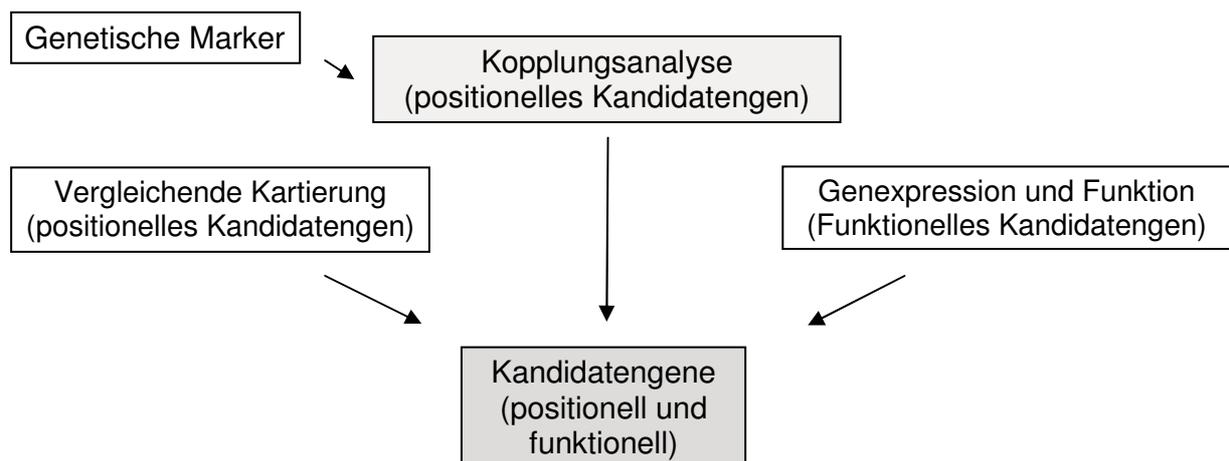


Abbildung 1: Vorgeschlagene Vorgehensweise bei der Auswahl von Kandidatengenen (modifiziert nach Ron und Weller, 2007)

Für die Auswahl von Kandidatengenen in einem QTL legen Ron und Weller (2007) folgende Kriterien zugrunde.

- Das Gen spielt eine bekannte physiologische Rolle bei der Ausprägung des untersuchten Phänotyps,
- basierend auf Knock-Out-Tieren, Tieren mit bestimmten Mutationen oder transgenen Tieren konnte bei anderen Spezies herausgefunden werden, dass das Gen das Merkmal beeinflusst,
- die Expression des Gens findet vor allem in mit dem Merkmal assoziierten Organen statt,
- das Gen wird in Entwicklungsstadien exprimiert, welche mit dem Merkmal in Verbindung stehen.

Die Mitglieder des *Complex Trait Consortiums* (Abiola et al., 2003) geben als zusätzliches Kriterium das Vorhandensein von Polymorphismen in kodierenden bzw. regulatorischen Regionen an.

2.1.3.1 Auswahl von Polymorphismen für Assoziationsstudien

Die Kriterien für die Auswahl von Polymorphismen bestehen in vielen Studien alleine darin, dass die Polymorphismen die einzigen sind, die in einem Kandidatengen gefunden wurden bzw. sie leichter zu typisieren sind als andere Polymorphismen des Gens (Tabor et al., 2002). Um die Chance zu erhöhen, biologisch wichtige Assoziationen zu finden, ist es jedoch essentiell, bei der Auswahl der zu untersuchenden Varianten gewisse Kriterien zu beachten. Diese sollen im Weiteren näher beschrieben werden.

Generell sind vor allem Polymorphismen in kodierenden Bereichen interessant, die zu einer Veränderung der AS-Sequenz (nicht-synonyme Polymorphismen) und dadurch möglichst zu einer veränderten Proteinfunktion führen (Risch, 2000; Ron und Weller, 2007). Aber auch Polymorphismen in nicht-kodierenden Bereichen können eine große biologische Rolle spielen (Wang et al., 2007). Anders als in kodierenden Regionen ist es hier jedoch schwieriger eine neutrale von einer funktionell relevanten Mutation zu unterscheiden (Tabor et al., 2002; Boffelli et al., 2004). Zur Einschätzung der Relevanz nicht-kodierender Mutationen kann der Sequenzvergleich zwischen Spezies dienen. Bei dieser Vorgehensweise - welche auch unter dem Namen *Comparative Genomics* bekannt ist - wird festgestellt, ob eine Sequenz in zwei oder mehr Spezies über die normale Erwartung hinaus konserviert ist (Ellegren, 2008). Stark konservierte Regionen stehen auf Grund ihrer funktionellen Rolle unter einer sogenannten *Purifying Selection*, der natürlichen Selektion gegen Basenmutationen (Thomas et al., 2003). Aus diesem Grund sind Mutationen in Bereichen, welche sich über verschiedene Spezies hinweg als hochkonserviert darstellen, von besonderem Interesse. Die Wahrscheinlichkeit, dass diese Bereiche und damit die Polymorphismen eine funktionelle Rolle spielen, ist dabei umso größer je stärker der Bereich auch bei weiter entfernten Spezies konserviert ist. Im Zusammenhang hiermit steht die Identifikation möglicher Transkriptionsfaktorbindungsstellen (TFBs) wie Promotoren, Enhancer und Locus-Kontrollregionen, in denen die Mutation liegt. SNPs in TFBs können durch eine veränderte Bindung der Transkriptionsfaktoren zu einer differentiellen Genexpression führen und so die Empfänglichkeit für umweltinduzierte Krankheiten verändern (Wang et al., 2007). Auch Flint und Mott (2001) sehen in QTN, die in solchen regulatorischen Genbereichen liegen, eine große Bedeutung. Polymorphismen in kodierenden Bereichen, die nicht zu einem AS-Austausch führen (synonym), wurden lange

Zeit als unwichtig angesehen. Auch sie können jedoch die Genfunktion durch Veränderung der Stabilität, des Splicings oder Lokalisation der mRNA verändern (Cartegni et al., 2002). Zur Änderung der mRNA-Stabilität können letztendlich auch Polymorphismen führen, welche weder in kodierenden Bereichen noch in TFBS, sondern in nicht-kodierenden Regionen liegen. Hierbei kommen vor allem solche Polymorphismen in Frage, welche in Intron-Exon-Grenzbereichen und nicht inmitten von Introns liegen (Risch, 2000).

In Tabelle 1 sind Kriterien für die Auswahl von Polymorphismen für Assoziationsstudien, abhängig von der Wahrscheinlichkeit, dass sie zu einer Veränderung des Phänotyps führen, angegeben. Nonsense-Mutationen werden in dieser Tabelle die höchste Bedeutung beigemessen. Aber auch nicht konservierende Mutationen beeinflussen mit hoher Wahrscheinlichkeit die Proteinfunktion. Ein Beispiel für eine solche Mutation ist die von Grisart et al. (2002) gefundene und mit dem Milchfettgehalt in Verbindung gebrachte nicht konservierende *K232A* Substitution in *DGATI*. Diese Mutation wird als direkter Marker in der kommerziellen Zucht eingesetzt (Dekkers, 2004). In den Rassen Jersey und Holstein-Friesian wurde jüngst ein QTN für die Körpergröße identifiziert (Karim et al., 2011).

Für die Auswahl von SNPs zur Erklärung der genetischen Varianz von quantitativen Merkmalen spielt auch die Allelfrequenz eine wichtige Rolle (Risch, 2000). Statistisch gesehen kann für SNPs mit einer sehr geringen Frequenz nur dann eine Assoziation gefunden werden, wenn sie einen sehr großen Effekt auf das Merkmal ausüben. Da bei quantitativen Merkmalen jedoch vermutet wird, dass viele Mutationen mit geringem Effekt das Merkmal prägen (Abiola et al., 2003), ist ein Polymorphismus mit einer Frequenz von mindestens 5% für Kandidatengenstudien höchstwahrscheinlich nützlicher als eine Mutation mit einer niedrigeren Frequenz (Risch, 2000). Für die Detektion einer Assoziation mit Hilfe eines bestimmten Tiermaterials ist es nach Tabor et al. (2002) bei Polymorphismen, denen auf Grund ihrer Position und des Effekts bezüglich des Gens eine hohe Priorität gegeben wurde, sinnvoll, vor Beginn der Arbeiten die Allelfrequenz in dem untersuchten Tiermaterial zu bestimmen.

LITERATUR

Tabelle 1: Auswahlkriterien für SNPs für Assoziationsanalysen (Tabor et al. 2002)

Typ	Lokalisation	Funktioneller Effekt	Frequenz im Genom	Wahrscheinlichkeit der Beeinflussung des Phänotyps
Nonsense	Kodierende Seq.	Vorzeitiges Ende der AS-Sequenz	Sehr niedrig	Sehr hoch
Missense/ nicht synonym (keine Konservierung)	Kodierende Seq.	Veränderte Protein- funktion durch AS- Austausch	Niedrig	Moderat bis sehr hoch, abhängig von Position
Missense/ nicht synonym (Konservierung)	Kodierende Seq.	Proteinfunktion bleibt Unverändert	Niedrig	Gering bis sehr hoch, abhängig von Position
Insertion/ Deletion (Rasterverschiebung)	Kodierende Seq.	Ändert Leseraster der protein-kodierenden Region (neg. Konsequenz)	Niedrig	Sehr hoch, abhängig von Position
Insertion/ Deletion (ohne Rasterver- schiebung)	Kodierende oder nicht- kodierende Seq.	Änderung der AS-Sequenz	Niedrig	Gering bis sehr Hoch
Sense/ synonym	Kodierende Seq.	Keine Veränderung in AS-Sequenz, aber ggf. modifiziertes Splicing	Mittel	Gering bis hoch
Promotor/ regulatorische Region	Promotor, 5`UTR, 3`UTR	Keine Veränderung in AS-Sequenz, kann aber Genexpression verändern	Niedrig bis mittel	Gering bis hoch
Splicing-Seite/ Intron-Exon- Grenze	In den ersten 10 bp des Exons	Kann Spliceverhalten oder Spliceeffizienz der Introns verändern	Niedrig	Gering bis hoch
Intron	Tief im Intron	Keine bekannte Funktion, kann aber Expression oder mRNA-Stabilität beeinflussen	Mittel	Sehr gering
Intergen	Nicht-kodierende Region zw. Gene	Keine bekannte Funktion, kann aber Expression durch Enhancer oder andere Fkt.beinflussen	Hoch	Sehr gering

2.2 Mastitis Rind

Als Mastitis wird die entzündliche Reaktion des Eutergewebes auf mikrobielle, thermische, chemische oder physikalische Verletzungen bezeichnet, die durch die Migration von Leukozyten in das Gewebe entsteht (Hospido und Sonesson, 2005; National Mastitis Council, 1996). Beim Rind wird die Mastitis zum größten Teil durch infektiöse Erreger, die auf Grund ihrer Vermehrung oder ihrer Toxine zur Schädigung des Gewebes führen, hervorgerufen (Jones und Bailey, 1998). Für die Entstehung von klinischen Mastitiden sind vor allem coliforme Keime, Streptokokken, Staphylokokken und Arcanobacterium pyogenes

verantwortlich, wohingegen subklinische Mastitiden durch Staphylokokken und Streptokokken verursacht werden (Wiesner und Ribbeck, 2000).

Als Indikator für Mastitis wird häufig die Anzahl der somatischen Zellen (SCC) in der Milch genutzt. Zur Berechnung des somatischen Zellscores (SCS) werden die Daten der SCC logarithmiert. Die Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft (DVG) definierte in Anlehnung an die Vorgaben der International Dairy Federation verschiedene Kategorien der Eutergesundheit basierend auf der SCC und dem bakteriologischen Befund in der Milch (2002). Diese Kategorien werden wie folgt charakterisiert (siehe auch Tabelle 2):

Normale Sekretion: Hierbei liegen keine äußerlichen pathologischen Veränderungen vor. Es sind keine euterpathogenen Erreger nachzuweisen und der Zellgehalt liegt im Normalbereich.

Latente Infektion: Bei der latenten Infektion eines Viertels sind Keime im Gemelk nachweisbar, der Zellgehalt ist jedoch nicht erhöht. Es kann auf Grund der Probennahme allerdings nicht unterschieden werden, ob die Erreger wegen einer Besiedlung des Zitzenkanals oder in Folge einer Infektion des Eutergewebes nachzuweisen sind.

Unspezifische Mastitis: Die unspezifische Mastitis ist durch eine erhöhte Zellzahl (> 100.000 Zellen/ml) und subklinische oder klinische Entzündungssymptome des Euters gekennzeichnet. Euterpathogene Erreger können in der Milch der betroffenen Viertel jedoch nicht festgestellt werden.

Mastitis: Sowohl eine erhöhte Zellzahl als auch euterpathogene Erreger können im Viertelanfangsgemelk nachgewiesen werden.

Tabelle 2: Beurteilung zytologisch-mikrobieller Befunde (DVG, 1994)

ZELLZAHL /ml MILCH	BAKTERIOLOGISCHER BEFUND	
	Nein	Ja
< 100.000	Normale Sekretion	Latente Infektion
> 100.000	Unspezifische Mastitis	Mastitis

Diese Definition gilt für die Untersuchung von Viertelanfangsgemelkproben die zur üblichen Melkzeit von Kühen in normaler Laktation entnommen werden.

Zudem können Mastitiden auf Grund ihrer unterschiedlichen Verlaufsformen und ihrer verschiedenartigen klinischen Symptome unterschieden werden. Hierbei erfolgt eine Einteilung in subklinische, klinische und chronische Mastitis.

Leukozyten zählen zu den somatischen Zellen der Milch, welche auch bei gesunden Eutern in der Milch zu finden sind und aus Makrophagen, Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten (PMN) sowie Epithelzellen bestehen. Selten sind auch eosinophile und basophile Granulozyten zu finden.

Da die somatischen Zellen mit dem immunologischen Status des Euters in Verbindung stehen, führt ein entzündlicher Stimulus zur Erhöhung der SCC (Leitner et al., 2000).

Aus diesem Grund dient die somatische Zellzahl als ein Maßstab für die Eutergesundheit des Einzeltiers und der ganzen Herde (Dosogne et al., 2003; Sarikaya et al., 2006) und wird routinemäßig im Rahmen der Milchleistungsprüfung erfasst.

Ab einem Schwellenwert von 100.000 Zellen/ml Milch (DVG, 2002), kann davon ausgegangen werden, dass die normale zelluläre Abwehr in eine entzündliche Reaktion überzugehen beginnt.

Physiologische Faktoren, die zu einer erhöhten SCC führen können, sind Stress und die ersten 5 bis 14 Tage nach der Kalbung (Bodoh et al., 1976; Kay et al., 1977). Jedoch sehen Sobiraj et al. (1988) gerade im Ausmaß der Streßexposition und der individuellen Streßanfälligkeit sub partum eine Erklärung für das Auftreten und den Schweregrad von Colimastitiden bei Kalbinnen. Laevens et al. (1997) bewiesen, dass sowohl der Anstieg der SCC bei steigender Laktationsnummer als auch späterem Laktationsstadium nicht wie bislang angenommen (Bodoh et al., 1976; Sheldrake et al., 1983; Harmon, 1994) physiologisch ist, sondern durch eine erhöhte Prävalenz für intramammäre Infektionen zu begründen ist.

2.3 Funktion der somatischen Zellen

Somatische Zellen in der Milch zählen, mit Ausnahme der Epithelzellen, zum zellulären Teil des Abwehrsystems der Milchdrüse und übernehmen eine schützende Rolle gegen Infektionen derselben (Kehrli und Shuster, 1994; Paape et al., 2000). Beeinflusst wird die Abwehr der Milchdrüse durch einen Wechsel der Konzentration und der Funktion der somatischen Zellen (Paape et al., 2002; Burvenich et al., 2003; Mehrzad et al., 2004; Mehrzad et al., 2005)

Makrophagen stellen den dominanten Zelltyp in der Milch gesunder Euter dar (Paape et al., 2002; Sarikaya et al., 2006). Während einer bakteriellen Infektion unterstützen Makrophagen

sowohl die unspezifische als auch die spezifische Immunantwort. Bei der spezifischen Immunantwort spielen Makrophagen eine Rolle in der Antigenpräsentation (Politis et al., 1992). Im Rahmen der unspezifischen Immunantwort zerstören und phagozytieren Makrophagen Bakterien. Ihre weitaus größere Aufgabe in der Milch ist jedoch die Unterstützung der Migration sowie der bakteriziden Wirkung neutrophiler Granulozyten (Paape et al., 2002; Sordillo und Streicher, 2002). Nach erstem Kontakt mit einem Pathogen sezernieren sie Zytokine (TNF- α und IL-1 β) (Hoeben et al., 2000; Wittmann et al., 2002), was zur Migration der neutrophilen Granulozyten aus dem Blut in die Milchdrüse führt (Paape et al., 2000).

Beteiligt an der Migration der neutrophilen Granulozyten sind außerdem die von eindringenden Mikroorganismen produzierten chemische Stoffe (Saad und Ostensson, 1990; Zeconi et al., 1994). Aus diesem Grund bilden neutrophile Granulozyten in der frühen Phase des Infektionsgeschehens die größte Einheit an immunkompetenten Zellen. Ihre Migration stellt die erste immunologische Abwehrlinie gegen Bakterien dar (Paape et al., 2003a) und ist für die Effizienz der angeborenen Immunantwort entscheidend (Burvenich et al., 2003; Mehrzad et al., 2004; Mehrzad et al., 2005). Um die Etablierung einer Mastitis zu verhindern ist hierbei eine schnelle Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten in die Milchdrüse (Burvenich et al., 2003; Mehrzad et al., 2004; Mehrzad et al., 2005) und deren erhöhte Phagozytose zu Beginn der Infektion ausschlaggebend (Paape et al., 2003a).

Auf Grund ihrer Aufgabe, der Phagozytose und dem intrazellulären Abtöten von Bakterien sowie der Sekretion von antibakteriellen Faktoren, sind sie jedoch auch für die Schwellung des Gewebes, die Verschorfung der sekretorischen Zellen und verringerte sekretorische Aktivität verantwortlich (Paape et al., 2000).

Lymphozyten sind ein wichtiger Teil der erworbenen Immunantwort. Sie sind in der Lage, Antigene durch spezifische Membranrezeptoren zu erkennen (Sordillo und Streicher, 2002).

Die Lymphozyten werden in T- und B-Lymphozyten unterteilt, welche sich in ihrer Funktion unterscheiden (Paape et al., 2000).

B-Lymphozyten können aufgenommene Antigene mit Hilfe von MHC-II-Molekülen den T-Helferzellen präsentieren, die danach zur Zytokinausschüttung angeregt werden. Durch diese Zytokine wandeln sich die B-Lymphozyten entweder zu Plasmazellen, die Antikörper produzieren, oder zu Gedächtniszellen um. Natürliche Killerzellen (NK) erkennen mit Hilfe von Fc-Rezeptoren – unabhängig vom MHC – Zellen oder Bakterien, die mit Antikörpern opsonisiert sind, und töten diese ab (Sordillo und Streicher, 2002).

Aus der Gruppe der T-Zellen enthält bovine Milch CD4+- (T-Helferzellen) und CD8+-Zellen (Asai et al., 1998). Die Gruppe der CD8+-Zellen kann wiederum in zytotoxische T-Zellen bzw. T-Supressorzellen unterteilt werden. Sie stellen die prädominanten Zellen in der gesunden Milchdrüse dar (Taylor et al., 1994; Harp et al., 2004).

Im Verlauf einer Mastitis dienen CD4+-T-Zellen durch die Sekretion von Zytokinen der Aktivierung von Lymphozyten und Makrophagen.

CD8+-T-Zellen haben hingegen eine zytotoxische oder unterdrückende Funktion. Sie eliminieren entweder Wirtszellen, die fremden Antigene exprimieren, oder verhindern die Aktivierung anderer immunkompetenter Zellen und kontrollieren dadurch die Immunantwort. Targoswski (1983) vermutete, dass CD8+-Zellen im Laufe einer Entzündung als so genannte Müllmänner fungieren, indem sie alte oder kaputte sekretorische Zellen eliminieren, welche ansonsten zu einer erhöhten Empfänglichkeit von Euterentzündungen führen könnten (Taylor et al., 1994).

Die Beteiligung von CD4+-Helferzellen ist für eine effektive Immunantwort essentiell (Shafer-Weaver et al., 1999). Die Feststellung einer erhöhten CD4+/CD8+-Rate innerhalb der ersten Tage einer durch *Staph. aureus* induzierten Mastitis läßt die Vermutung zu, dass CD4+-Zellen eine protektive Rolle in der frühen Phase der *Staph. aureus* induzierten Mastitis spielt (Rivas et al., 2000). Auch Mehrzad et al. (2008) verzeichneten eine 2-fach höhere CD4+/CD8+-Rate 72 Stunden nach Infektion mit *E. coli*. Allerdings zeigte sich auch, dass bis zu diesem Zeitpunkt eine Erhöhung der CD8+-Zellen in der Milch zu einer Abnahme der Rate führte. Gleiches beobachteten Riollet et al. (2000) 12 h bzw. 96 Stunden nach Immunisierung von Kühen mit *Staph. aureus* α -Toxin. Durch Betrachtung dieser Tatsachen wird die große Bedeutung der CD8+-Zellen innerhalb der ersten Stunden bei der Entstehung von Mastitiden deutlich (Mehrzad et al., 2008).

2.4 Genetische Parameter der Mastitis und der somatischen Zellzahl

2.4.1 Heritabilität Mastitis / somatische Zellzahl

Die Tatsache, dass die Mastitis einen genetischen Hintergrund hat, ist schon lange bekannt. Erste Veröffentlichungen hierzu finden sich Ende der 1930er Jahre (Ward, 1938). Im Laufe der Jahre wurden verschiedene Studien zur Schätzung der Heritabilität und genetischer Korrelationen zwischen verschiedenen Merkmalen bei Milchkühen durchgeführt.

In den meisten Studien wird eine klinische Mastitis durch Präsenz bzw. Absenz einer Mastitis während der Laktationen charakterisiert (Rupp und Boichard, 1999). Es handelt sich um ein so genanntes „Alles oder Nichts-Merkmal“ (Heringstad et al., 2000).

In einem Review von Heringstad et al. (2000) wurden die an skandinavischen Milchkühen geschätzten Heritabilitäten für klinische Mastitis zwischen 0,001 und 0,06 angegeben, wobei sich die meisten Werte in einem Intervall zwischen 0,02 und 0,03 befanden. Diese Schätzungen konnte in einer groß angelegten Studie von Carlén et al. (2004) an 200.000 Schwedisch Holstein Kühen (0,01-0,03) sowie von Bloemhof et al. (2009) bei Niederländischen Holstein Friesian (0,03) bestätigt werden. In einer Untersuchung, welche auf den Daten von drei großen deutschen Milchviehbetrieben mit insgesamt 3.200 Kühen basierte, lagen die geschätzten Heritabilitäten für Eutererkrankungen bei Kühen der Rasse Dt. Holstein hingegen zwischen 0,06 und 0,08 (Harder et al., 2006). Abweichungen in den Ergebnissen können nach Heringstad et al. (2000) bei Alles-oder-Nichts-Merkmalen durch verschiedene Faktoren entstehen. Wirkliche Unterschiede zwischen Populationen und Ländern, aber auch unterschiedliche Definitionen des Merkmals können zu unterschiedlichen Schätzungen führen. Aus diesem Grund sollten Heritabilitäten immer in den Ländern geschätzt werden, in welchen sie auch eingesetzt werden (Heringstad et al., 2000).

Da außer in skandinavischen Ländern Daten für klinische Mastitis nicht routinemäßig erhoben werden, ist es schwierig, verlässliche Daten für die Berechnung der genetischen Grundlage der Mastitis in anderen Ländern zu erhalten. Aus diesem Grund muss von einer gewissen Ungenauigkeit der ohnehin geringen Ergebnisse in nicht skandinavischen Ländern ausgegangen werden (Rupp und Boichard, 1999).

Angaben über den Einfluss der Laktationen auf die genetische Varianz der Mastitis sind nicht konstant. So konnten Pösö und Mäntysaari (1996) höhere Heritabilitäten für die zweite und dritte im Vergleich zur ersten Laktation finden, wohingegen Carlén et al. (2004) eine Abnahme der Heritabilität mit zunehmender Laktationsnummer beschrieben. Andere Studien konnten wiederum keine Unterschiede der Heritabilität in unterschiedlichen Laktationen feststellen (Nielsen et al., 1997; Bloemhof et al., 2009).

Eher selten sind Schätzungen der Heritabilität für das Merkmal subklinische Mastitis. In einer von de Haas et al. (2007) durchgeführten Studie an 30145 Kühen aus 272 Betrieben wurde sie jedoch bei niederländischen Holstein Friesian auf 0,03 geschätzt.

Die Schätzungen der Heritabilität für die SCC liegen im Durchschnitt über denen der klinischen Mastitis, wobei auch bei diesem Merkmal je nach verwendetem Tiermaterial sowie

LITERATUR

den genutzten statistischen Modellen und Methoden, die für die Kombination der Testtags-Messungen eingesetzt wurden, unterschiedliche Werte ermittelt werden konnten.

Colleau und le Bihan-Duval (1995) gaben, basierend auf 39 Literaturangaben, eine geschätzte Heritabilität für den SCS von 0,09 an. Auch in neueren Studien wurden vergleichbare Werte geschätzt (Tabelle 3). Bei der Verwendung des LSCS wurde in 3 unabhängigen Studien und an unterschiedlichen Populationen von Milchkühen eine Heritabilität von 0,11 geschätzt (Castillo-Juarez et al., 2002; Odegard et al., 2004; Evans und Berry, 2006). Auffällig bei der Arbeit von Castillo-Juarez et al. (2002) ist allerdings, dass die geschätzte Korrelation für den LSCS nur innerhalb einer Gruppe galt, welche aus einer Umwelt stammten, die einen niedrigen Ertrag brachte, die geschätzte Korrelation innerhalb der Gruppe aus einer höheren Ertrag fördernden Umwelt jedoch nur bei 0,09 lag. Die Autoren schlussfolgerten, dass Unterschiede im Management zwischen den beiden Gruppen die genetische Expression des Merkmals und dessen genetische Assoziation beeinflussen.

Die im Vergleich zur Heritabilität des LSCS geringer geschätzte Heritabilität des „Erstertag“ SCS ist nach Heringstad (2006) dadurch begründet, dass es sich bei dem LSCS um einen Laktationsdurchschnitt des SCS handelt. Desweiteren konnte Heringstad (2006) zeigen, dass das Merkmal SCS bei Kühen mit klinischer Mastitis eine wesentlich geringere Heritabilität aufweist, als bei Tieren ohne Mastitis.

Tabelle 3: Geschätzte Heritabilitäten für die somatische Zellzahl bei Milchkühen

Zellzahlindex	h^2	Material	Autor/Jahr
LSCS	0,11	IFR, 1. Laktation	Evans und Berry (2006)
LSCS	0,11	NFR, 1.Laktation	Ødegård et al. (2004)
LSCS	0,11	HF*, 1.Laktation	Castillo-Juarez et al. (2002)
	0,09	HF **, 1.Laktation	
SCS _{mast}	0,03	NFR, 1.Laktation	Heringstad et al. (2006)
SCS _{ges}	0,08		
1. SCS	0,07		

SCS_{mast} = SCS kranker Kühe

SCS_{ges} = SCS gesunder Kühe

* Umwelt fördert niedrigen Ertrag, ** Umwelt fördert hohen Ertrag

Bei der Heritabilität für SCC einzelner Laktationen kann kein einheitlicher Trend verzeichnet werden. Carlén et al. (2004) registrierten eine Abnahme mit zunehmender Laktationsnummer von 0,14 auf 0,10. Haile-Mariam et al. (2001) gaben hingegen einen Anstieg der Heritabilität von 0,07 auf 0,11 von der ersten zur dritten Parität an.

Zudem beschrieben Letztere, dass Unterschiede zwischen den Heritabilitäten der SCC im Laktationsdurchschnitt und einzelnen Werten der SCC bestehen.

Ein ganz neuer Ansatz zur Schätzung der Heritabilität für SCC basiert auf dem Einbezug verschiedener Merkmalsgruppen. De Haas et al. (2008) bildeten drei verschiedene Gruppen, die den Laktationsdurchschnitt für die SCC, die SCC des Testtags als binäres Merkmal mit $1 \triangleq > 150.000$ Zellen/ml Milch und $0 \triangleq < 150.000$ Zellen/ml Milch und das Muster der SCC-Peaks umfassten. Bei den SCC-Peaks konnten wiederum zwei Kategorien unterschieden werden: 1) Ein schneller Anstieg, gefolgt von einem direkten Abfall und 2) ein langsamerer Anstieg, welcher innerhalb von zwei weiteren Prüftagen nicht abfiel.

Innerhalb dieser Gruppen konnten Heritabilitäten zwischen 0,01 und 0,13 geschätzt werden, wobei die geringste Heritabilität für die Kurvenverläufe der SCC-Peaks und die höchste für den Laktationsdurchschnitt der SCC angegeben wurden.

Die Ergebnisse der besprochenen Studien zeigen, dass der Laktationsdurchschnitt des SCS im Vergleich zu anderen Merkmalerfassungen der SCC die höchste Heritabilität aufweist.

2.4.2 Genetische Korrelationen zwischen Mastitis und somatischer Zellzahl sowie dieser mit anderen Merkmalen

In unterschiedlichen Studien (Tabelle 4 und Tabelle 5) wurden genetische Korrelationen sowohl zwischen klinischer Mastitis und SCC als auch für beide Merkmale mit anderen Nutzungsmerkmalen, Produktionsmerkmalen und Exterieurmerkmalen geschätzt.

Die genetische Korrelation zwischen klinischer Mastitis und SCC ist positiver Natur und liegt durchschnittlich bei 0,62 (Shook und Schutz, 1994). Dies konnten, wie aus Tabelle 4 zu entnehmen ist, auch weitere Studien belegen.

Geschätzte Korrelationen für den SCS mit klinischer Mastitis bei finnischen Ayrshire lagen in der ersten Laktation bei 0,37 und mit steigender Tendenz bis zur dritten Laktation bei 0,68 (Pösö und Mäntysaari, 1996). Der SCS wurde aus dem zweimonatlich gemessenen SCC als geometrisches Mittel berechnet. Ein ähnlicher Trend zeigte sich auch in der Studie von Carlén et al. (2004) bei Nutzung des Laktationsdurchschnitts für SCS. Weller et al. (1992) fanden eine niedrigere Korrelation von 0,30, schrieben dies jedoch der ungenauen Felddatenerhebung

LITERATUR

zu. Es konnte zudem gezeigt werden, dass die durchschnittliche SCC in der ersten Hälfte der Laktation eine höhere genetische Korrelation mit klinischer Mastitis hat als die durchschnittliche Zellzahl in der zweiten Hälfte der Laktation (Bloemhof et al., 2009).

Tabelle 4: Genetische Korrelationen (r_g) zwischen somatischer Zellzahl (SCC) bzw. somatischem Zellcount (SCS) und klinischer Mastitis

Zellzahlindex	r_g	Material	Autor/Jahr
SCC	0,30	k.D.	Weller et al. (1992)
SCC	0,37	FA, 1. Laktation	Pösö und Mäntysaari (1996)
	0,61	FA, 2. Laktation	
	0,68	FA, 3. Laktation	
LSCS	0,68 _(0,05)	HF, 1. Laktation	Carlén et al. (2004)
	0,66 _(0,09)	HF, 2. Laktation	
	0,77 _(0,15)	HF, 3. Laktation	
LSCS	0,53 _(0,03)	NRF, 1. Laktation	Ødegård et al. (2004)
LSCS	0,72	HF, 1. Laktation	Rupp und Boichard (1999)
SCS	0,78	NRF, früh in 1. Laktation	Heringstad et al. (2006)
SCS	0,65 _(0,11)	5-150 d 1. Laktation, NH	Bloemhof et al. (2009)
	0,50 _(0,15)	151-335 d 1. Laktation, NH	Bloemhof et al. (2009)

In Klammern ist der Standardfehler angegeben

k.D. = keine Definition

Die genetische Korrelation der Milchmenge mit klinischer Mastitis und der SCC ist positiv und daher aus ökonomischer Sicht ungünstig. Allgemein liegen die geschätzten Korrelationen zwischen Milchmenge und klinischer Mastitis höher als die mit der SCC (Tabelle 5).

Milchleistungsmerkmale wie Proteinmenge und Fettgehalt sind im Durchschnitt positiv mit beiden Merkmalen der Eutergesundheit korreliert. In seinem Review gab Schutz (1994) einen durchschnittlichen Wert von 0,2 für die genetische Korrelation der SCC mit dem Fettgehalt und von 0,17 mit dem Proteingehalt an. Dieser Trend konnte von Castillo-Juarez et al. (2002)

LITERATUR

sowohl für Tiere aus Herden mit einem hohen als auch mit einem niedrigen Umweltniveau bestätigt werden.

Tabelle 5: Genetische Korrelation von Milchleistung (ML) mit klinischer Mastitis (kM) und somatischer Zellzahl (SCC)

r_g kM	r_g SCC	Material	Autor/Jahr
0,47		k.D.	Simianer et al. (1991)
0,45	0,15	HF, 1. Laktation	Rupp und Boichard (1999)
0,32 _(0,06)	0,22 _(0,04)	HF, 1. Laktation	Carlén et al. (2004)
0,45 _(0,11)	0,13 _(0,06)	HF, 2. Laktation	
0,26 _(0,20)	0,13 _(0,11)	HF, 3. Laktation	
	0,22 _(0,03)	HF, 1. Laktation	Castillo-Juarez et al. (2002)
	0,34 _(0,03)	HF, 1. – 3. Laktation	Søndergard et al. (2002)

In Klammern ist der Standardfehler angegeben

k.D. = keine Definition

Bei der phänotypischen Korrelation der beiden Merkmale mit Milchleistungsmerkmalen handelt es sich hingegen um eine negative Korrelation. Die Inzidenz einer klinischen bzw. subklinischen Mastitis reduziert folglich die Milchmenge und den Proteingehalt, die erhöhte Anfälligkeit für Mastitis ist jedoch nicht mit einer geringeren genetischen Leistungsfähigkeit assoziiert (Schutz, 1994).

Die genetischen Beziehungen von Exterieurmerkmalen mit der SCC sind negativer Natur (Rogers et al., 1991; Rupp und Boichard, 1999). Rogers et al. (1991) fanden genetische Korrelationen des LSCS (Laktationsdurchschnitt der SCC) mit der Eutertiefe, der vorderen Euteraufhängung und der vorderen Zitzenplatzierung von $-0,35$, $-0,32$ und $-0,22$. Auch die Ergebnisse von Rupp und Boichard (1999) zeigten dies, sie lagen für die Eutertiefe, die Vordereuteraufhängung und die Euterausgeglichenheit bei $-0,29$ bis $-0,49$. Eine geringere Korrelation wurde jedoch für die Zitzenlänge gefunden. Die Auswertung der Ergebnisse von Seykora und McDaniel (1986) ergab, dass Kühe mit einer geringen Eutertiefe, einem starken Zentralband, einem geringen Zitzenzwischenabstand und einem geringen Zitzendurchmesser eine niedrigere somatische Zellzahl hatten.

Diese Ergebnisse machen deutlich, dass die Anatomie des Euters einen deutlichen Einfluss auf die SCC hat.

Nur wenige Studien haben sich bisher mit der Korrelation zwischen Eutermerkmalen und klinischer Mastitis befasst. Daten hierüber sind bei Rupp und Boichard (1999) zusammengefasst.

Des Weiteren wurden genetische Korrelationen zwischen der SCC und der Melkgeschwindigkeit geschätzt. Boettcher et al. (1998) gaben eine Korrelationen von 0,14 bis 0,16 in unterschiedlichen Laktationen an. Einfluss auf die Geschwindigkeit der Milchabgabe nehmen unter anderem die Strichkanallänge und die Zitzenwanddicke (Gulyas und Iváncsics, 2001). Aber auch ein verringerter Sphinctertonus kann eine erhöhte Melkgeschwindigkeit und damit eine geringere Restistenz des Euters gegenüber Infektion mit Pathogenen als Resultat haben (Boettcher et al., 1998). Dennoch konnten Rupp und Boichard (1999) zwar bestätigen, dass die SCC ungünstig mit der durch den Besitzer eingeschätzten Leichtigkeit des Milchentzugs (ML) korreliert war (genetische Korrelation 0,44), sie konnten jedoch keine genetische Beziehung dieser zu klinischer Mastitis finden (genetische Korrelation 0,06).

2.5 Somatische Zellzahl als indirektes Merkmal für die Eutergesundheit

Die klinische Mastitis hat nur eine geringe Heritabilität. Philipsson et al. (1995) sehen hierin die Erklärung dafür, dass die Effizienz der indirekten Selektion mittels SCC auf eine bessere Eutergesundheit bei Bullen mit einer geringen Töchterzahl höher ist als die direkte Selektion mit dem Merkmal klinische Mastitis. Ferner wird der direkte Nachweis einer Mastitis mittels bakterieller Kultur von einigen Autoren mit einem verhältnismäßig hohen Arbeits- und Kostenaufwand in Verbindung gebracht (Rupp und Boichard, 2003).

Die SCC erfüllt sowohl die Anforderung einer hohen genetischen Korrelation mit Mastitis als auch die einer einfachen und – im Vergleich zum Erregernachweis – kostengünstigen Datenerhebung, sofern sie routinemäßig z.B. bei der Milchleistungsprüfung durchgeführt wird. Zusätzlich hat sie eine höhere Heritabilität als Mastitis und im Rahmen ihrer Erfassung werden auch subklinische Mastitisfälle detektiert. Alle diese Voraussetzungen führen nach Schutz (1994) offensichtlich dazu, dass eine Selektion auf eine niedrige SCC zu einer Reduzierung klinischer und subklinischer Mastitiden führt. Aus diesem Grund wird die SCC von mehreren Wissenschaftlern für ein sinnvolles Merkmal bei der indirekten Selektion auf Mastitisresistenz gehalten (Mrode und Swanson, 1996; Heringstad et al., 2000; Bloemhof et

al., 2009). Beachten muss man jedoch, dass trotz der relativ hohen genetischen Korrelation der beiden Merkmale Mastitis und SCC nicht als die Expression des gleichen Merkmals angesehen werden können (Rupp und Boichard, 1999).

Einige Arbeiten deuten an, dass Tiere mit einer sehr geringen initialen SCC empfänglicher für Infektionen sein könnten als solche mit hoher SCC (Kehrli und Shuster, 1994; Suriyasathaporn et al., 2000; Beaudeau et al., 2002). Dies konnten Koivula et al. (2005) jedoch nicht bestätigen. Auch die Überprüfung der Frage, ob Kühe mit einer initial geringeren SCC eine erhöhte Mastitisanfälligkeit besitzen als solche mit einer hohen SCC, ergab keinen Hinweis darauf, dass eine anfänglich geringe Zellzahl ein höheres Risiko für eine spätere Euterentzündung beinhaltet (Vecht et al., 1985; Coffey et al., 1986).

Die Vermutung einer linearen genetischen Beziehung zwischen den Relativzuchtwerten für SCC und denen für klinische Mastitis wurde durch Philipsson et al. (1995) und Rogers et al. (1995) bestätigt (Abbildung 2: Philipsson et al., 1995). Hieraus folgerten die Autoren, dass auf Grund der Größe und Linearität der genetischen Beziehung eine Selektion auf eine niedrigere SCC erstrebenswert ist und eher die Inzidenz von Infektionen reduziert, als die Abwehr schwächt (Philipsson et al., 1995; Rogers et al., 1995a). Eine Analyse norwegischer Daten, bei der gezeigt wurde, dass seit 1994 sowohl die Anzahl somatischer Zellen im Tank als auch die Inzidenz für klinische Mastitis abgenommen haben (Plym Forshell und Osteras, 2001), spricht für diese Annahme.

Durch den Aufbau der derzeitigen Zuchtwertschätzung (VIT, 2011) würde die Nutzung des Merkmals jedoch auch dann kein Problem darstellen, wenn eine extrem geringe SCC mit einer verminderten Resistenz einhergehen würde, da nur solche Bullen diskriminiert werden, die eine sehr hohe somatische Zellzahl vererben (Philipsson und Lindhé, 2003). Dies wird durch das Untersuchungsergebnis bestätigt, dass Bullen mit den niedrigsten *Predicted Transmitting Abilities* für SCC, Töchter mit der geringsten Inzidenz für Mastitis in allen Pathogengruppen haben (Rogers et al., 1995b).

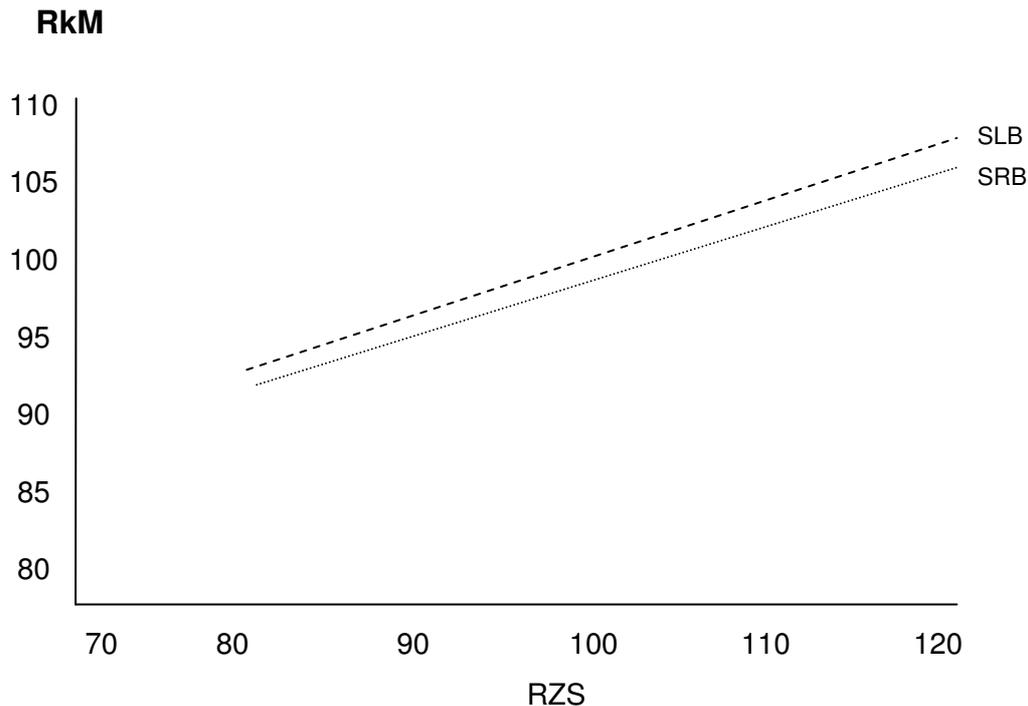


Abbildung 2: Lineare Beziehung der Relativzuchtwerte für somatische Zellzahl (RZS) und der Relativzuchtwerte für klinische Mastitis (RkM) bei Schwedisch Rotbunt (SRB) und Schwedisch Friesian Bullen (SLB) (modifiziert nach Philipsson et al., 1995)

2.6 Zucht auf Eutergesundheit

2.6.1.1 Merkmalerfassung und Zuchtfortschritt

Generell kann davon ausgegangen werden, dass durch die Kombination der Daten internationaler Evaluierungen von Zuchtwerten eine höhere Selektionsdifferenz in den einzelnen Ländern erzielt werden kann (Mark et al., 2002).

Da die genetische Korrelation zwischen Mastitis und SCC unter 1 liegt und beide demnach nicht als ein und dasselbe Merkmal aufgefasst werden können, stellt sich jedoch die Frage nach der bestmöglichen Merkmalerfassung zur Nutzung in der Zuchtwertschätzung.

Viele Autoren gehen davon aus, dass die gleichzeitige Verwendung von Mastitisdaten und Daten über die SCC die Effizienz der Selektion für Eutergesundheit erhöhen würde (Lund et al., 1994; Colleau und Le Bihan-Duval, 1995). Auch Mrode und Swanson (1996) nehmen an, dass der züchterische Fortschritt davon abhängt, inwieweit das Merkmal SCC mit anderen Merkmalen (Exterieurmerkmale, Melkgeschwindigkeit) in einem Index zusammengefasst wird.

Durch die Kombination von US-amerikanischen und skandinavischen Daten für die Merkmale Mastitis, SCC und Exterieur konnten Rogers et al. (1998) belegen, dass eine

multiple Merkmalerfassung bzw. eine Kombination der Merkmalsdaten verschiedener Länder zu einer moderaten Genauigkeit in der Zuchtwertschätzung in Ländern ohne Merkmalerfassung Mastitis führen kann.

Aber auch die Kombination von Mastitisdaten und den Daten über SCC kann durch das Beachten unterschiedlicher Korrelationen zwischen Mastitis und SCC-Merkmalen verbessert werden. Bloemhof et al. (2009) zeigten bei niederländischen Holstein, dass der größte Fortschritt durch die Verwendung von Daten des SCS zwischen 5. bis 150. Laktationstag und denen über klinischen Mastitisfälle der ersten drei Laktationen erreicht werden kann, wobei die Mastitiden der jeweiligen Laktation als unterschiedliche Merkmale behandeln wurden. Letzteres erklärten sie damit, dass sich z.B. die Mastitiden bei Färsen genetisch von denen älterer Kühe unterscheiden.

Eine Kombination der beiden Merkmale ist nach de Haas et al. (2008) jedoch nicht unbedingt nötig, solange man bei der Auswahl unterschiedlicher Messdaten für SCC auf solche zurückgreift, bei denen eine hohe Korrelation mit klinischer Mastitis nachgewiesen werden konnte. Mit diesen Daten ist eine effektive Zucht auf Mastitisresistenz auch mit der SCC als alleinigem Merkmal möglich. Als Beispiel hierfür sind Peaks der SCC im Laufe der Laktation mit einer genetischen Korrelation zur klinischen Mastitis von 0,93 zu nennen. Um hingegen die Inzidenz subklinischer Mastitiden zu verringern, müsste laut den Autoren die durchschnittliche Zellzahl über einen langen Laktationszeitraum (151. – 400. Tag in Milch) herangezogen werden.

Koivula et al. (2005) verglichen die genetischen Korrelationen der SCC und der Milchmenge in unterschiedlichen Laktationen und fanden heraus, dass die Beziehung in späteren Laktationen nahe Null geht. Hieraus schlussfolgerten sie, dass die Verwendung von Daten aus späteren Laktationen die Züchtung auf Mastitisresistenz vorantreiben kann, ohne die Milchleistung zu beeinflussen. Die daraus resultierende Verzögerung der Selektionsentscheidung stellt den Sinn einer solchen Vorgehensweise jedoch in Frage.

2.6.1.2 Derzeit realisierte Zuchtstrategien

In den meisten Ländern werden Eutergesundheitsdaten nur in Form der SCC als Hilfsmerkmal bei der Zucht berücksichtigt (Egger-Danner, 2008; Interbull, 2009). Daneben beziehen skandinavische Länder (Schweden, Norwegen, Finnland) auch Daten über klinische Mastitiden in ihre Zuchtwertschätzung mit ein. Dafür werden zusätzlich zu den Daten der somatischen Zellzahl aus den ersten drei Laktationen (5. - 170. Laktationstag) die Daten über klinische Mastitis der 1. bis 3. Laktationsperiode aufgenommen (Interbull, 2009). In allen drei

Ländern existieren Erfassungssysteme für die Tiergesundheit, in denen u.a. Informationen über klinische Mastitiden des einzelnen Tieres durch den Tierarzt gesammelt werden und für die Schätzung des Zuchtwerts Mastitis zur Verfügung stehen (*Swedish Animal Disease Recording System, Finnish System for Recording Health Data*). In Finnland und Dänemark ist dieses Erfassungssystem freiwillig, wohingegen in Schweden die Verpflichtung besteht, Krankheitsfälle zu erfassen (Olsson et al., 2001)

Zuchtwertschätzung in Deutschland

- Konventionelle Zuchtwertschätzung

In Deutschland wird die SCC als Hilfsmerkmal in der Zucht auf Eutergesundheit eingesetzt. Seit 1996 werden hierfür durch das VIT Verden für die Rasse Dt. Holstein bei der Milchleistungsprüfung anfallenden Daten logarithmiert und als SCS mit Hilfe eines Testtagsmodells verarbeitet. Als Datengrundlage dienen Einzelkontrollergebnisse (Laktationstag 5 bis 365) der ersten 3 Laktationen ab dem Erstkalbejahr 1990. Die mittels eines Random-Regression-Modells geschätzten Zuchtwerte auf Tagesbasis werden im Anschluss zu 305-Tage-Laktationszuchtwerten gemittelt. Die sich ergebenden Laktationszuchtwerte für die 1. bis 3. Laktation werden mit einer Gewichtung von 0,26, 0,37 und 0,37 zum veröffentlichten Relativzuchtwert Zellzahl (RZS) kombiniert (VIT, 2011). In den Relativzuchtwert Gesamt (RZG) fließt der RZS mit 7 % Gewichtung ein. Da Eutergesundheitsprobleme jedoch einen großen Einfluss auf die Nutzungsdauer ausüben und der Relativzuchtwert Nutzungsdauer mit derzeit 25 % im RZG gewichtet wird, ist der effektive Einfluss des RZS bei der Selektion deutlich größer als es sein direktes Gewicht im Gesamtzuchtwert ausdrückt (www.holstein-dhv.de / Stand Juli 2009).

- Genomischer Zuchtwert

Seit August 2010 sind genomische Informationen von Bullen und weiblichen Tieren als Teilinformationen in die offiziellen Zuchtwerte über die direkten genomischen Zuchtwerte (dGW) integriert (Reinhardt et al., 2011; VIT, 2011). Somit löst der dGW die seit 2005 durchgeführte markergestützte Zuchtwertschätzung ab. Der dGW wird anhand von ca 50.000 über das gesamte Genom verteilte SNP-Marker berechnet. Zur Schätzung welche Markerausprägung dabei für welche Höhe der genetischen Leistungsausprägung verantwortlich ist, wird für alle Merkmale ein Vergleich der SNP-Muster von möglichst sicher geprüften Tieren mit deren klassischen Zuchtwerten durchgeführt. Seit August 2011 beruhen die hierfür verwendeten genomischen Schätzungen in Deutschland durch die

Kombination der Daten mit denen aus Frankreich, den Niederlanden sowie Dänemark, Schweden und Finnland auf 19.736 Bullen. Diese als Lernstichprobe bezeichnete Gruppe ist nicht nur die weltweit größte, sondern präsentiert auch die gesamte europäische und nordamerikanische Holsteingenetik (Reinhardt et al., 2011; VIT, 2011). Der gZW (genomisch unterstützter Zuchtwert) setzt sich demnach aus dem klassischen Zuchtwert aufgrund Eigen- und/oder Nachkommenleistung und dem dGW zusammen. Die Gewichtung des klassischen Zuchtwertes und des dZW im kombinierten gZW erfolgt mit einem Indexverfahren anhand der jeweiligen Sicherheit der beiden Informationsquellen (VIT, 2011).

2.7 QTL für die somatische Zellzahl und Mastitis

Auf der Basis der Studien von Gomez-Raya et al. (1998) konnte gezeigt werden, dass die statistische Power, einen QTL (mit gegebenem Effekt) zu finden, für Merkmale mit geringer Heritabilität höher ist als für Merkmale mit hoher Heritabilität. Bei Studien, die Merkmale mit geringer Heritabilität untersuchen, ist jedoch auch die Anzahl falsch positiver Ergebnisse erhöht (Sahana et al., 2006). Für die SCC wurden bisher auf fast allen Chromosomen des Rindes QTL detektiert. Die QTL auf BTA01, 05, 08, 15, 18, 21, 22, 23 und 27 konnten in voneinander unabhängigen Studien in unterschiedlichem Tiermaterial bestätigt werden. Die im Anhang befindliche Tabelle A 1 gibt einen großen Teil der beim Rind für die SCS gefundenen QTL, das eingesetzte Design sowie die angewandten statistischen Verfahren wieder.

Die Anzahl der für klinische Mastitis gefundenen QTL ist im Vergleich zu denen für die SCC wesentlich geringer. Ein Grund hierfür ist die Tatsache, dass in den meisten Ländern die Mastitis nicht routinemäßig erfasst wird. QTL-Studien mit dem Merkmal Mastitis sind deshalb bisher vor allem in skandinavischen Ländern durchgeführt worden. Detektierte QTL liegen auf dem Chromosomen 3, 4, 5, 6, 9, 11, 14, 15, 18, 19, 26 und 27 (Elo et al., 1998; Klungland et al., 2001; Schulman et al., 2002; Lund et al., 2008). Der QTL auf Chromosom 14 konnte in zwei voneinander unabhängigen Studien bestätigt werden (Klungland et al., 2001; Schulman et al., 2002). Einen klaren Beitrag leistete die Veröffentlichung von Lund et al. (2008), in welcher die QTL für das Merkmal Mastitis in der ersten, zweiten und dritten Laktation einzeln bestimmt wurden. Hierbei konnten nur auf BTA05 nah beieinander liegende QTL für Mastitis in der zweiten und dritten Laktation kartiert werden. Für alle anderen QTL konnte nur innerhalb einer Laktation eine Signifikanz gefunden werden.

Es ist weiterhin auffällig, dass nur einige Chromosomen (BTA03, 04, 05, 06, 09, 11, 18 und 27) QTL sowohl für SCC als auch klinische Mastitis aufweisen und diese meist nur in

voneinander unabhängigen Studien und nicht im gleichen Tiermaterial gefunden werden konnten. Im gleichen Tiermaterial mit genau der selben Lokalisation konnten nur die QTL auf Chromosom 18 kartiert werden (Schulman et al., 2002).

Auf BTA05 und 06 konnten hingegen nur QTL für die SCS und Mastitis mit nah beieinander liegenden Positionen (BTA5: SCS = 52,7 cM und CM2 = 57,8 cM, BTA6: CM2 = 116,9 cM und SCS: 125,9 cM) kartiert werden (Lund et al., 2008).

Bei zwei der von Lund et al. (2008) gefundenen QTL für die SCC und mehreren QTL für Mastitis in der 1., 2. bzw. 3. Laktation konnten pathogenspezifische Effekte nachgewiesen werden (Sorensen et al., 2008). Die Autoren schlussfolgerten hieraus, dass vor allem QTL für Mastitis mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Pathogenspezifität aufweisen.

2.8 Mit der Eutergesundheit zusammenhängende QTL auf BTA02

Der QTL für den SCS auf BTA02 wurde 2003 von Bennewitz et al. in einem Gemeinschaftsprojekt der ADR und INRA detektiert. In diesem Projekt wurden die Typisierungsdaten von insgesamt 5 Halbgeschwister-Familien in zwei *Granddaughter Designs* (ADR- oder INRA-Design) einzeln und zusammen in einer Joint-Analyse untersucht. In dem ADR-Design (Thomsen et al., 2000) konnte der QTL auf BTA02 mit einer chromosomweiten Signifikanz kartiert werden, wohingegen das INRA-Design nur einen Effekt mit $p = 0,1$ zeigte. Mit Hilfe des Joint-Designs konnte für den QTL hingegen eine genomweite Signifikanz geschätzt werden. Das von Bennewitz et al. (2003) gefundene Konfidenzintervall für den QTL erfasste etwa 80 % (128 cM) des gesamten Chromosoms in dem von Thomsen et al. (2000) angewandten Design sowie circa 96 % (151 cM) des Chromosoms im Joint-Design. Die gesamte Kartenlänge betrug 158 cM.

Im selben Bereich konnte mit dem ADR-Design auch für die funktionelle Nutzungsdauer ein QTL identifiziert werden (Kühn et al., 2003). Er liegt zwischen den Markern ILSTS098 und BMS778 bei 79 cM auf dem Chromosom.

Der 1997 von Ashwell et al. publizierte QTL auf BTA02 für die Vordereuteraufhängung erreichte in weiterführenden Analysen die Signifikanzgrenze nicht mehr (Ashwell et al., 2005). Kolbehdari et al. (2008) sehen in dieser Region jedoch weiterhin Potential für weitere QTL-Studien bezüglich des Zentralbands und der Vordereuteraufhängung, da sie für einen SNP innerhalb dieser Region eine chromosomweite Signifikanz nachweisen konnten.

2.9 Kandidatengene für die SCC auf BTA02

Die im Weiteren beschriebenen Kandidatengene liegen in dem von Bennewitz et al. (2003) auf BTA02 detektierten QTL für SCS. Es handelt sich dementsprechend um positionelle Kandidatengene. Durch ihre Funktion, auf die weiter unten näher eingegangen werden soll, stellen sie außerdem funktionelle Kandidatengene für die Eutergesundheit beim Rind dar.

2.9.1 Signal Transducer and Activator of Transcription 1

STAT1 kodiert für den *Signal Transducer and Activator of Transcription 1*. Dieser ist ein Mitglied des *Janus Kinase-Signal-Transducer and Activator of Transcription (JAK-STAT)* – Signalwegs, welcher die Signalübertragung verschiedener Zytokine und Hormone von der Zellmembran zum Nukleus ermöglicht. Die wichtige Rolle, die *STAT1* in der Abwehr von Bakterien und Viren spielt, konnte bei Mäusen gezeigt werden, welche einen Defekt im *STAT1*-Signalweg aufwiesen. Diese Tiere hatten eine extreme Empfänglichkeit gegenüber bakteriellen und viralen Infektionen (Durbin et al., 1996; Meraz et al., 1996). Die Liganden, welche *STAT1* aktivieren, sind alle Typen von Interferonen sowie Interleukin 6 (IL-6) (Darnell et al., 1994; Yuan et al., 1994; Schindler und Strehlow, 2000), welche eine wichtige Rolle in der Regulation der Immunantwort spielen.

Es ist nachgewiesen, dass *IFN- γ* die Differenzierung von T-Helferzellen sowie die Aktivierung von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten über *STAT1* reguliert und eine wichtige Rolle bei der angeborenen Immunantwort spielt (Nacy und Meltzer, 1991; Kovarik et al., 1998; Shtrichman und Samuel, 2001; Decker et al., 2002; Paape et al., 2003b).

IL-6 ist ein von Makrophagen produziertes proinflammatorisches Zytokin, welches einen wichtigen Mediator von Fieber und der Akuten-Phase-Antwort darstellt. Auch an der Entwicklung von Mastitiden scheinen *IFN- γ* und IL-6 beteiligt zu sein. Ein Anstieg beider Zytokine konnte bei bakteriell bedingten Mastitiden nachgewiesen werden (Taylor et al., 1997; Paape et al., 2003c). Hisaeda et al. (2001) wiesen ebenfalls bei infizierten Kühen, verglichen mit Kontrolltieren, eine wesentlich höhere Konzentration von *IFN- γ* im Serum und in der Milch nach. Eine weitere Studie konnte die Relevanz von *IFN- γ* bei der Mastitisentstehung nach Infektion mit *E. coli* darstellen. Tiere, die mit *IFN- γ* behandelt wurden, hatten weniger entzündete Euterviertel, erholten sich schneller und die Überlebensrate in dieser Gruppe war höher als in der Placebogruppe (Sordillo und Babiuk,

1991). IL-6, welches von Makrophagen sezerniert wird und ein Mediator der Akute-Phase-Antwort ist, kommt in der Milch natürlich infizierter Kühe in einer bis zu 20fach höheren Konzentration als in der Milch gesunder Tiere vor (Nakajima et al., 1997). Auch die Expression dieses Gens in somatischen Zellen der Milch zeigte Unterschiede. In Zellen von Tieren mit Infektion konnte ein höheres Expressionslevel nachgewiesen werden als in solchen ohne Infektion (Taylor et al., 1997). Die Funktion von IL-6 besteht darin, den Influx von Monozyten in das Euter zu begünstigen und somit den Austausch von neutrophilen Granulozyten zu Monozyten zu unterstützen (Oviedo-Boyso et al., 2007). Dieser Schritt ist wichtig, um den zerstörerischen Effekt der neutrophilen Granulozyten zu reduzieren.

2.9.2 Interleukin-8-Rezeptor A

Die Gene *CXCR1* (*Interleukin-8-Rezeptor A*) und *CXCR2* (*Interleukin-8-Rezeptor B*) wurden von Grosse et al. (1999) anhand der für den Interleukin-8-Rezeptor B (IL8RB/CXCR2) veröffentlichten Sequenz bei 90,3 cM auf dem bovinen Chromosom 2 (BTA02) kartiert. Das zunächst beim Rind als *CXCR2* publizierte Gen (Grosse et al., 1999; Youngerman et al., 2004a; Youngerman et al., 2004b) konnte 2007 (Rambeaud und Pighetti) durch den Vergleich von öffentlich verfügbaren Sequenzen des Menschen als Gen für CXCR1 identifiziert werden. Bei beiden Genen handelt es sich um Gene für G-Protein-gekoppelte Transmembranrezeptoren, die auf neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Mastzellen sowie auf manchen T-Zellen und natürlichen Killerzellen beim Menschen nachgewiesen wurden (Murdoch und Finn, 2000). Die Rezeptoren sind strukturell gleich und unterscheiden sich lediglich in ihrer Bindungseigenschaft. Während CXCR1 eine hohe Spezifität zeigt und nur IL-8 sowie GCP-2 bindet (Lee et al., 1992), hat CXCR2 neben IL-8 verschiedene Liganden. Hierzu zählen unter anderem ENA-78, GCP-2, GRO α sowie GRO β und GRO γ (Lee et al., 1992; Ahuja und Murphy, 1996). In einer Studie von Li et al. (2002) konnte gezeigt werden, dass bovine neutrophile Granulozyten sowohl humane CXCR1- als auch humane CXCR2-Antikörper binden, was zu der Vermutung führt, dass beide Rezeptoren auch auf bovinen neutrophilen Granulozyten exprimiert werden. IL-8 und seine Rezeptoren CXCR1 und CXCR2 spielen eine wichtige Rolle in der Immunantwort. Murphy (1997) konnte nachweisen, dass die Bindung von IL-8 an seine Rezeptoren die Chemotaxis und Migration neutrophiler Granulozyten induziert. Auch in diesen Vorgang sind beide Rezeptoren involviert. So löst eine unabhängige Aktivierung sowohl von CXCR1 als auch von CXCR2

die Chemotaxis aus und eine simultane Aktivierung führt zu einer additiven Antwort (Gordon et al., 2005).

Grosse et al. (1999) fanden in der Sequenz von *CXCR1* (ursprünglich *CXCR2*) fünf SNPs. Bei einem dieser Polymorphismen handelt es sich um einen nicht-synonymen Polymorphismus (G→C) an Stelle +777 im 3. Exon des Gens. Durch diesen Polymorphismus kommt es zu einem Aminosäure (AS)-Austausch an Position 245 im 3. intrazellulären Loop des Rezeptors (Youngerman et al., 2004a). AS-Austausche in dieser Region spielen in der G-Proteinbindung und in der intrazellulären Ca²⁺-Mobilisierung eine wesentliche Rolle (Damaj et al., 1996). Dies wird durch eine Studie bestätigt, in welcher zwischen der Stärke der Ca²⁺-Mobilisierung und dem Genotyp des oben beschriebenen Polymorphismus eine Beziehung festgestellt werden konnte (Rambeaud und Pighetti, 2007).

Es wurden verschiedene Studien durchgeführt, um eine mögliche Assoziation dieses SNPs mit Mastitis bzw. mit der SCC als Indikator für Mastitis beim Rind nachzuweisen (Youngerman et al., 2004a; Leyva-Baca et al., 2007; Leyva-Baca et al., 2008b).

Die Analyse von Youngerman et al. (2004a) an amerikanischen Holstein Friesian ergab eine signifikante Assoziation ($p < 0,05$) zwischen dem Genotyp an Position +777 in *CXCR1* und subklinischer Mastitis. Tiere, die den Genotyp CC besaßen, hatten in dieser Studie eine höhere Mastitisinzidenz als Tiere mit dem Genotyp GG. Die Autoren fanden außerdem eine signifikante Assoziation zwischen dem SNP und dem SCS in demselben Tiermaterial ($p < 0,001$). Kühe mit den Genotypen GG und GC hatten einen höheren SCS als solche mit dem Genotyp CC, wobei jedoch nur der Unterschied zwischen den Genotypen CC und GC signifikant war. Im Gegensatz hierzu konnten Leyva-Baca et al. (2007; 2008b) keine Assoziation zwischen demselben SNP und dem SCS in kanadischen Holstein Friesian finden. Trotzdem kann eine funktionelle Korrelation zwischen dem SNP an Position +777 und der Immunantwort nicht missachtet werden. So konnte gezeigt werden, dass der Genotyp CC zu einer beschränkten Migration neutrophiler Granulozyten, einer verminderten Hochregulierung von Adhäsionsmolekülen und durch die Suppression der Apoptose zu einer erhöhten Überlebensrate der Granulozyten führt (Rambeaud und Pighetti, 2005; Rambeaud et al., 2006). Die Hypothese, dass je nach Genotyp eine unterschiedliche Ligandenbindungsaffinität besteht, konnte jedoch nicht verifiziert werden. Vielmehr wurde eine um die Hälfte verringerte Rezeptordichte auf neutrophilen Granulozyten für den Genotyp CC im Vergleich zum Genotyp GG festgestellt.

Für einen SNP an Position -1768 in der 5'UTR in *CXCR1* konnte in der kanadischen Holstein Friesian Population eine signifikante Assoziation mit den DYDs für SCC gefunden werden

(Leyva-Baca et al., 2008b). Die gleiche Arbeitsgruppe wies für diesen SNP außerdem eine Genotyp-spezifische Genexpression neutrophiler Granulozyten als Reaktion auf eine *E. coli*-Exposition nach (Leyva-Baca et al., 2008a).

2.9.3 Insulin-Like-Grow-Factor -Bindungsprotein-2

Insulin-Like-Grow-Factor-Bindungsproteine (IGFBP) gehören zu dem komplexen System insulinartiger Wachstumsfaktoren (IGF-System). Das IGF-System spielt eine wichtige Rolle bei der Regulierung von somatischem Wachstum. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* konnte eine Beteiligung dieses Systems an der Proliferation von Zellen nachgewiesen werden. Es besteht aus zwei dem Insulin ähnlichen Wachstumsfaktoren IGF-I und IGF-II, sechs verschiedenen IGFBP sowie den zwei IGF-Rezeptoren IGF-R1 und IGF-R2. Durch die Bindung des Wachstumshormons GH an Rezeptoren in der Leber oder in Zielorganen selbst wird IGF-I freigesetzt. Sowohl für GH als auch für IGF-I wurden spezifische Interaktionen mit dem Immunsystem beschrieben (Auernhammer und Strasburger, 1995; Kooijman et al., 1996). Beide Faktoren modulieren humorale und zelluläre Immunfunktionen und werden unter anderem auch durch immunkompetente Zellen produziert, deren Proliferation sie stimulieren. Auch für IGF-II wurden Immunzellen-betreffende Funktionen nachgewiesen. Neben der Expression von IGF-II in T-Lymphozyten (Van der Ven et al., 1997) wurden auch Hinweise auf seine Funktion in der Entwicklung dieser Zellen gefunden. Van Buul-Offers und Kooijman (1998) postulierten, dass GH und IGF-II bei diesem Prozess eine synergistische Wirkung ausüben.

Durch die Bindung der IGF beeinflussen die IGFBP die Bioverfügbarkeit und die Verteilung dieser in der extrazellulären Matrix und greifen infolgedessen indirekt in Mitose, Zelldifferenzierung und Zellregulation ein. Außerdem haben IGFBP auch IGF-unabhängige Zellfunktionen (Jones und Clemmons, 1995). Beim Huhn konnten Polymorphismen in unkodierenden Bereichen des Gens mit dem Größenwachstum und der Körperzusammensetzung sowie dem Anteil des abdominalen Fetts assoziiert werden (Li et al., 2006; Leng et al., 2009).

Die Funktion des IGF-Systems in der Milch ist noch nicht intensiv erforscht. Untersuchungen beziehen sich auf die Entwicklung der Milchdrüse und des Neugeborenen (Blum und Baumrucker, 2008; Milsom et al., 2008). In der Milch des Rinds kommen vier der sechs Bindungsproteine (IGFBP2, -3, -4 und -5) vor (Gibson et al., 1999). Es wird vermutet, dass

die IGFBP in der Milch dem Abbau des IGF-I entgegenwirken, bzw. dass sie lokale mitogene Aktivitäten der IGF modulieren (Rajaram et al., 1997).

IGFBP2 bindet mit wesentlich höherer Affinität IGF-II als IGF-I. Dennoch reguliert es auch die Bioverfügbarkeit des Wachstumsfaktors IGF-I (Jones und Clemmons, 1995). Über die genaue Funktion von IGFBP2 ist noch relativ wenig bekannt. Diverse Effekte auf die Proliferation, die Adhäsion, Migration und Invasion humaner Zellen wurden *in vitro* belegt (Hoeflich et al., 2001b). Für die Wirkung von IGFBP2 auf IGF-I konnten sowohl steigernde als auch hemmende Effekte nachgewiesen werden (Bar et al., 1989; Ross et al., 1989; Bourner et al., 1992). Neben diesen wurde auch eine Wirkung von IGFBP2 auf das GH-stimulierte Wachstum aufgezeigt werden (Hoeflich et al., 2001a). Da IGFBP2 wie angeführt in der so genannten GH-IGF-Achse eine Rolle spielt, liegt die Vermutung nahe, dass es auch bei immunologischen Vorgängen in Aktion tritt. Um die Relevanz von IGFBP2 auf die Aktivierung und Proliferation von T-Zellen zu untersuchen, wurde der Effekt auf mit Antikörpern aktivierten mononukleären Blutzellen getestet. Nach Aktivierung der Zellen konnte eine erhöhte IGFBP2-Sekretion beobachtet werden, was die Annahme zulässt, dass IGFBP2 als lokaler Wachstumsfaktor bei der Proliferation und Aktivierung mononukleärer Zellen fungiert (Föll et al., 1998; Hettmer et al., 2005).

Einen weiteren Hinweis auf die Beteiligung von IGFBP2 im Immungeschehen gibt die Arbeit von Lang et al. (1997). In dieser konnte ein Anstieg der IGFBP2-Konzentration nach der Injektion von Lipopolysaccharid des Bakteriums *E. coli* gemessen werden.

Bei der Untersuchung von Zusammenhängen zwischen IGFBP2 und Mastitiden konnte ein eindeutiger Einfluss von IGFBP2 festgestellt werden (Meyer, 2006). So war bei erhöhter Zellzahl gleichzeitig die IGFBP2-Konzentration vor allem bei solchen Tieren signifikant erhöht, bei welchen auf Grund der Höhe der SCC von einer Euterenzündung ausgegangen werden konnte. Auch Burvenich et al. (1999) und Shuster et al. (1995) konnten einen Anstieg von Bindungsproteinen in infizierten Milchdrüsen nachweisen. Erstere definierten die Bindungsproteine nicht genauer, Shuster et al. (1995) wiesen hingegen unter anderem IGFBP2 nach.

2.9.4 Phosphatidylinositol-3-Phosphate /Phosphatidylinositol 5-Kinase, Type III

Über die Funktion der *Phosphatidylinositol-3-Phosphate /Phosphatidylinositol 5-Kinase, Type III* (PIP5K3) ist bei Säugetieren bisher noch wenig bekannt. Beim Menschen konnte sie jedoch mit einigen Krankheiten in Verbindung gebracht werden (Li et al., 2005; Nicot und

Laporte, 2008). Untersuchungen bezüglich der Rolle von PIP5K3 in der Größenregulation von Vakuolen, der Proteinsortierung am *Multivesicular Body* und der Vakuolenansäuerung wurde mit Hilfe von FAB1, einem PIP5K3 Ortholog in der Hefe, untersucht. Die Vakuole von Hefen hat viele Gemeinsamkeiten mit den Lysosomen von Säugetieren und es konnten analoge Funktionen von PIP5K3 und FAB1 gefunden werden (Nicot und Laporte, 2008). Bei Expressionsstudien konnte PIP5K3 mit einem 10fach über dem Median liegenden Expressionswert in T- und B-Lymphozyten nachgewiesen werden (Su et al., 2004). Ausgehend von diesen Kenntnissen lassen die im Folgenden besprochenen Aspekte einen Zusammenhang zwischen PIP5K3 und der Funktion bzw. dem Überleben von CD8-T-Lymphozyten vermuten.

Durch die Phosphorylierung des Phosphatidyl-Inositol-(3)-Phosphats mittels PIP5K3 entsteht Phosphatidyl-Inositol-(3,5)-Bisphosphat (PtdIns-(3,5)-P₂) (Toker und Cantley, 1997), welches – vermutlich über die Aktivierung der V-ATPase-Protonenpumpe – für die Säuerung von Vakuolen zuständig ist (Efe et al., 2005). Auch bei Säugetieren unterstützt die V-ATPase durch die Ansäuerung von Lysosomen und dem Golgi-Apparat viele für die Zelle wichtigen Funktionen (Mellman et al., 1986; Forgac, 1998). *In vitro* Experimente weisen darauf hin, dass die V-ATPase-Aktivität für das Überleben von aktivierten zytotoxischen CD8⁺-T-Zellen essentiell ist (Togashi et al., 1997). Auch in neutrophilen Granulozyten und Makrophagen konnte die V-ATPase-Aktivität mit der Aktivierung der Zellen während Infektion und Entzündungsgeschehnissen bzw. der Ansäuerung des Phagosoms nach der Ingestion von *Staph. aureus* in Verbindung gebracht werden (Lukacs et al., 1990; Swallow et al., 1990a; Swallow et al., 1990b; Nanda et al., 1992). Eine weitere Funktion auf Lymphozyten scheint PIP5K3 über die Regulation des Chloridkanals CLC-2 auszuüben. CLC-2 konnte auf T- und B-Lymphozyten sowie auf neturophilen Granulozyten nachgewiesen werden (Jiang et al., 2002). Klaus et al. (2009) zeigten, dass PIP5K3 als potenter Stimulator dieses Chloridkanals agiert. Die Relevanz von Chloridkanälen für die Funktion von Leukozyten wurde im Rahmen der Volumenregulation (Cahalan und Lewis, 1988), der Zellproliferation (Phipps et al., 1996), der Zytokinproduktion (Ikejima et al., 1997), der Apoptose (Maeno et al., 2000) und dem *Oxidative Burst* (Menegazzi et al., 1999) dieser Zellen bestätigt.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Tiermaterial, Familienstruktur und Datenmaterial

3.1.1.1 QTL-Studie

Für die Untersuchung standen zehn paternale Halbgeschwisterfamilien der Rasse Dt. Holstein mit 1121 Tieren im *Granddaughter-Design* (Geldermann, 1975; Weller et al., 1990) zur Verfügung.

Drei dieser Familien (Familien BC, BD, DA) wurden basierend auf den Ergebnissen einer *Joint-Analyse* zweier *Granddaughter-Designs* für fünf Milchproduktionsmerkmale inklusive des SCS ausgewählt (Bennewitz et al., 2003), da sich diese Familien für den innerhalb dieser Analyse gefundenen genomweit-signifikanten QTL für SCS auf BTA02 als informativ erwiesen. Das erste *Granddaughter-Modell* war Teil des nationalen QTL-Kartierungsprojekts „Genomanalyse Rind“ des Förderverein Biotechnologieforschung e.V. (FBF) mit der Beteiligung der Arbeitsgemeinschaft Deutscher Rinderzüchter (ADR) (Thomsen *et al.*, 2000). Zusätzlich flossen in die *Joint-Analyse* die Daten des *Genome-Mapping*-Projekts des Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) und mehrerer französischer Züchterorganisationen ein (Boichard *et al.*, 2003). Die weiteren sieben Familien wurden bereits im Rahmen des deutschen MAS-Zuchtprogramms (ADR-MAS) genutzt.

Die Anzahl der Söhne pro Familie reichte von 45 Tieren bis zu 351 Tieren, mit einem Durchschnitt von 121,1 Tieren pro Familie. Die Größe der einzelnen Familien ist Tabelle 6 zu entnehmen.

DNA stand von allen Söhnen sowie von sieben der zehn Väter in der DNA-Bank des Instituts für Tierzucht und Haustiergenetik der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Verfügung (Tabelle 6). Von den untersuchten Bullen der 7 Familien des ADR-MAS-Projekts existierte zusätzlich tiefgefrorenes Sperma als Reserve.

Das gesamte Pedigree, welches auf bis zu drei Generationen nicht-typisierter Vorfahren der genotypisierten Bullen basierte, bestand aus insgesamt 8073 Tieren.

Als Merkmal wurde der SCS verwendet, welcher mittels der SCC berechnet wurde ($SCS = \log \text{ base } 2 (SCC / 100.000) + 3$).

Für die im Anschluss an die Genotypisierung stattfindenden statistischen Analysen wurden die Daughter Yield Deviations (DYD) für den SCS der genotypisierten Bullen aus der Zuchtwertschätzung von Januar 2008 durch das VIT Verden bereitgestellt. Diese DYDs basierten auf den Daten von 833.336 Töchtern in der 1. Laktation, 616.303 Töchtern in der 2. Laktation und 404.832 Töchtern in der 3. Laktation. Vorläufige Berechnungen des QTLs fanden mit den DYDs aus dem Jahr 2007 statt.

Tabelle 6: Anzahl der Söhne in den einzelnen Familien und Verfügbarkeit der DNA der Väter

Familie Fugato	DNA-Vater	Söhne
ADR II - BC	X	125
ADR II - BD	X	274
ADR II - DA	X	351
ADR-MAS 1	X	64
ADR-MAS 2	X	52
ADR-MAS 3	X	53
ADR-MAS 4	X	45
ADR-MAS 5	-	59
ADR-MAS 6	-	53
ADR-MAS 7	-	45
alle Familien		1121

X = DNA vorhanden

- = keine DNA vorhanden

3.1.1.2 Kandidatengenansatz

In Tabelle 7 sind die für die einzelnen Methoden verwendeten DNA und deren Ursprung zusammengefasst wiedergegeben.

Polymorphismensuche

Für die Polymorphismensuche in dem Gen *PIP5K3* wurden 17 unverwandte Tiere der Rasse Dt. Holstein der Lehr- und Forschungsstation „Oberer Hardthof“ der JLU Gießen ausgewählt.

Die DNA von Dt. Holstein Kühen für die Suche nach Polymorphismen in den Genen *CXCR1* und *IGFBP2* sowie des Exon XIX von *PIP5K3* und die Untersuchung der Allelfrequenz (je 40 Tiere) in der Rasse Dt. Holstein bei allen Genen stammten aus der DNA-Bank des Instituts

für Tierzucht und Haustiergenetik der JLU Gießen. Ausgewählt wurden möglichst unverwandte Tiere. (Tabelle A 2)

Die Exons des Gens *IGFBP2* wurden zusätzlich mit je 4 Tieren der Rassen Dt. Fleckvieh, Dt. Angus sowie *Bos indicus* Rinder (2 Tiere White Fulani/Cameroon und 2 Tiere Bunaji/White Fulani/Nigeria) sequenziert, deren DNA in der DNA-Bank des Instituts für Tierzucht und Haustiergenetik zur Verfügung stand.(Tabelle A 2)

Assoziationsanalyse

Für die Assoziationsanalyse der Polymorphismen mit dem SCS wurden die in Kapitel 3.1.1.1 beschriebenen ADR-MAS-Familien sowie je 25 Tiere mit hohem, mittlerem und niedrigem RZS für den SCS aus den 3 ADR II-Familien eingesetzt.

Tabelle 7: Methoden zur Untersuchung der Kandidatengene und die hierfür verwendete DNA sowie deren Ursprung

Methoden	<i>CXCR1</i>	<i>IGFBP2</i>	<i>PIP5K3</i> (excl. Ex XIX)	<i>PIP5K3</i> Ex XIX
Sequenzierung	DNA (unverwandte Dt. Holstein)	DNA (unverwandte Dt. Holstein, Fleckvieh, Dt. Angus, White Fulani)	cDNA (unverwandte Dt. Holstein)	DNA (unverwandte Dt. Holstein)
Allelfrequenz	DNA (unverwandte Dt. Holstein)	DNA (unverwandte Dt. Holstein)	DNA (unverwandte Dt. Holstein)	DNA (unverwandte Dt. Holstein)
Assoziations- analyse	DNA (ADR-Familien)	DNA (ADR-Familien)	DNA (ADR-Familien)	nicht untersucht

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Biosphere [®] Filter Tips 100 µl	<i>Sarstedt AG&Co.</i> , Nümbrecht
Combitips 0,05 ml	<i>Eppendorf AG</i> , Hamburg
Distritips Micro, Mini, Maxi	<i>Gilson International B.V.</i> , Bad Camberg
EDTA Monovetten 9 ml	<i>Sarstedt AG&Co.</i> , Nümbrecht
Filter Tips 10 µl, 1000 µl	<i>nerbe plus GmbH</i> , Winsen/Luhe
Filter Tips 20 µl, 200 µl	<i>Peqlab</i> , Erlangen
Kimwipes [®]	<i>Kimberly-Clark</i> , Roswell, Georgia, USA

Latexhandschuhe	<i>G. Kisker GbR, Steinfurt</i>
MultiPLY [®] -µ Strips 0,2 ml 8er Kette mit MultiPLY [®] Deckelkette 8er Kette	<i>Sarstedt AG&Co., Nümbrecht</i>
Nitrilhandschuhe latexfrei	<i>MAGV, Rabenau-Londorf</i>
PCR-Cups Soft Tubes [®] mit Deckel Soft Strips [®]	<i>Biozym Scientific GmbH, Hess. Olden- dorf</i>
PCR-Gefäße in Streifen mit 0,2 ml Kappen streifen	<i>VWR International GmbH, Darmstadt</i>
PCR-Platte PP 96well mit Kappenstreifen	<i>nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe</i>
Photopapier Type V UPP-110HG	<i>Sony, Tokyo, Japan, Vertrieb in Deutsch- land über MS Laborgeräte Schröder, Wiesloch</i>
Reagiergefäße 1,5 ml und 2 ml	<i>Sarstedt AG&Co., Nümbrecht</i>
Reaktionsgefäße für PCR 0,2 ml	<i>Biostep GmbH, Jahnsdorf</i>
Quali PCR-Platten 96well mit Quali PCR- Tube-Cups	<i>G. Kisker GbR, Steinfurt</i>
96well Thermowellplatten	<i>Corning Inc., Corning, New York, USA</i>

3.1.3 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wiesen den Reinheitsgrad p.a. (zur Analyse) auf.

Acrylamid/Bisacrylamid 29:1 (30 %ig w/v)	<i>Bio-Rad Laboratories GmbH, München</i>
Agarose NEEO Ultra Qualität, Rotiphorese [®]	<i>Carl Roth GmbH, Karlsruhe</i>
Ammoniumchlorid	<i>Merck KGaA, Darmstadt</i>
Ammoniumpersulfat (APS)	<i>Amresco, Ohio, USA</i>
Bind-Silane	<i>Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg (jetzt GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg)</i>
BlueDextran 2000	<i>GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg</i>
Borsäure	<i>AppliChem, Darmstadt</i>
Bromphenolblau	<i>United States Biomedical Corp., Solon, Ohio, USA</i>
Dimethylsulfoxid (DMSO)	<i>Carl Roth GmbH, Karlsruhe</i>

MATERIAL UND METHODEN

dNTP Mix 100 mM	<i>ABgene Advanced Biotechnologies Ltd., Hamburg</i>
EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat	<i>AppliChem, Darmstadt</i>
Essigsäure	<i>Carl Roth GmbH, Karlsruhe</i>
Ethanol	<i>Carl Roth GmbH, Karlsruhe</i>
Ethidiumbromid	<i>Serva Feinbiochemica GmbH & Co., Heidelberg</i>
Formamid	<i>Carl Roth GmbH, Karlsruhe</i>
Glycerol Rotipuran [®]	<i>Carl Roth GmbH, Karlsruhe</i>
Harnstoff	<i>AppliChem, Darmstadt</i>
Kaliumchlorid	<i>AppliChem, Darmstadt</i>
Magnesiumchlorid-Hexahydrat reinst	<i>Merck KGaA, Darmstadt</i>
Magnesiumchlorid 25 mM	<i>Promega GmbH, Mannheim</i>
Natriumazetat 3M (pH 4,6-5,2)	<i>Merck KGaA, Darmstadt</i>
Natriumchlorid	<i>AppliChem, Darmstadt</i>
Natriumhydroxid	<i>Merck KGaA, Darmstadt</i>
NuSieve [®] GTG [®] Agarose	<i>Cambrex Bio Science Rockland, Inc., Rockland, Maine, USA (Vertrieb über Biozym Scientific GmbH, Hess. Olden- dorf)</i>
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	<i>Serva Feinbiochemica GmbH & Co., Heidelberg</i>
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyldiamin)	<i>Amresco, Solon, Ohio, USA und AppliChem, Darmstadt</i>
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	<i>MP Biomedicals, LLC, Eschwege</i>
Wasser für die Molekularbiologie	<i>Carl Roth GmbH, Karlsruhe</i>
HPLC-Wasser	<i>KMF Laborchemie Handels GmbH, Sankt Augustin</i>
Xylencyanol FF	<i>United States Biomedical Corp., Solon, Ohio, USA</i>
10x Taq Buffer advanced (selbstregulierend, maximale Magnesium-Konzentration: 2 mM Mg ²⁺)	<i>Eppendorf AG, Hamburg</i>

10x PCR Reaction Buffer mit 20 mM MgCl ₂	<i>Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim</i>
5x colorless GoTaq [®] Flexi Buffer	<i>Promega GmbH, Mannheim</i>
5x GC rich Solution	<i>Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim</i>
10x TBE Puffer (1 M TRIS-Borat (pH 8,3), 20 mM EDTA, destilliertes deionisiertes Wasser)	<i>Carl Roth GmbH, Karlsruhe</i>

3.1.4 Reaktionskits

ABI PRISM [®] BigDye [®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	<i>Applied Biosystems Applera Dtl GmbH, Darmstadt</i>
ABsolute [™] QPCR Mix	<i>ABgene House, Surrey, UK</i>
Invisorb [®] Spin Blood RNA Mini Kit	<i>Invitek, Berlin</i>
NucleoSpin [®] Blood Kit	<i>Macherey-Nagel, Düren</i>
Verso [™] cDNA Kit	<i>Thermo Scientific ABgene, Hamburg</i>
Wizard [®] SV Gel and PCR Clean-Up System	<i>Promega GmbH, Mannheim</i>

3.1.5 Größenstandards

3.1.5.1 Größenstandards für die Polyacrylamidgelelektrophorese mit dem ABI PRISM[®] 377 DNA Sequencer

Für die Größenbestimmung der Mikrosatelliten bei Typisierung am ABI PRISM[®] 377 DNA Sequencer wurden mittels PCR neun Fragmente aus dem Cytochrom b-Gen der ovinen mitochondrialen DNA amplifiziert (Hiendleder et al., 1998). Die PCR-Fragmente hatten die Größe 74bp, 105bp, 124bp, 156bp, 170bp, 202bp, 233bp, 266bp und 315bp.

3.1.5.2 Größenstandards zur Agarosegelelektrophorese

GeneRuler [™] 100bp DNA Ladder Plus	<i>MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot</i>
FastRuler [™] DNA Ladder, Low Range	<i>MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot</i>
pUC19 DNA/ <i>MspI</i> (<i>HpaII</i>) Marker, 23	<i>MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot</i>

3.1.6 Enzyme

Proteinase K	<i>Invitek, Berlin</i>
--------------	------------------------

Restriktionsendonukleasen:

<i>BspI</i> 286I	<i>New England Biolabs GmbH</i> , Frankfurt
<i>BfuI</i> , <i>BveI</i> , <i>MnlI</i> , <i>PagI</i> , <i>TaaI</i> , <i>TaqI</i>	<i>MBI Fermentas GmbH</i> , St. Leon-Rot
<i>FastStart Taq</i> DNA-Polymerase	<i>Roche Diagnostics Deutschland GmbH</i> , Mannheim
<i>GoTaq</i> [®] Flexi DNA-Polymerase	<i>Promega GmbH</i> , Mannheim
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	<i>5Prime GmbH</i> , Hamburg

3.1.7 Oligonukleotide

Oligonukleotide, NED- und VIC-markiert	<i>Applied Biosystems Applera Dtl GmbH</i> , Darmstadt
Oligonukleotide, unmarkiert	<i>biomers.net GmbH</i> , Ulm
Oligonukleotide, 6FAM-markiert	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH</i> , München

3.1.8 Geräte

Abdeckmatte für Thermoblock	<i>Perkin Elmer Applied Biosystems GmbH</i> , Weiterstadt
ABI PRISM [®] 377 DNA Sequencer mit Borosilikat-Glasplatten (36 cm und 12 cm Länge), mylaren Spacern (0,2 mm stark), 36-well und 48-well Haifischzahnkamm (mylar, 0,2 mm stark)	<i>Applied Biosystem Applera Dtl GmbH</i> , Darmstadt
Analysewaage AC211S	<i>Satorius AG</i> , Göttingen
Autoklav Webeco Modell C	<i>Webeco</i> , Bad Schwartau
Bidestanlage Bi-Dest 2302	<i>Gesellschaft für Labortechnik mbH</i> , Burgwedel
Centrifuge 5804 mit Rotor A-2-DWP	<i>Eppendorf AG</i> , Hamburg
Centrifuge 5810R mit Rotor A-4-62	<i>Eppendorf AG</i> , Hamburg
Centrifuge/Vortex Combi-spin FVL 2400	<i>Peqlab</i> , Erlangen
Digital Graphic Printer UP-D895	<i>Sony</i> , Tokyo, Japan, Vertrieb in Deutsch- land über <i>Biometra</i> , Göttingen
Distriman	<i>Gilson International B.V.</i> , Bad Camberg

MATERIAL UND METHODEN

Eisflockenbereiter SPR80AS	<i>Nordcap, Bremen</i>
Eismaschine Scotsman AF10	<i>Kälte Mack, Maintal</i>
Elektrophoresekammer Modell HRH	<i>International Biotechnologies Inc., New Haven, Connecticut, USA</i>
Elektrophoresekammer	<i>Peqlab, Erlangen</i>
Gelkämme und Gelschlitten diverser Größen	<i>Von Keutz Labortechnik GmbH, Reiskirchen</i>
Gradientencycler iCycler 96well	<i>Bio-Rad Laboratories GmbH, München</i>
HLC Blockthermostat BT 1301	<i>MAGV, Rabenau-Londorf</i>
Horizontalelektrophoresekammern mini und midi, ungekühlt	<i>Von Keutz Labortechnik GmbH, Reiskirchen</i>
Magnetrührer MR2002	<i>Heidolph, Kelkheim</i>
Microprocessor pH-Meter pH 537	<i>Wissenschaftlich technische Werkstätten, Weilheim</i>
Mikrowelle	<i>Siemens, München</i>
Multipette	<i>Eppendorf AG, Hamburg</i>
Netzgerät ConsortE425 für die Elektrophorese	<i>MAGV, Rabenau-Londorf</i>
Netzgeräte Power Pac 1000 und 3000 für die Elektrophorese	<i>Bio-Rad Laboratories GmbH, München</i>
pH-Meter pH 537	<i>Wissenschaftlich technische Werkstätten, Weilheim</i>
Pipetten Pipetman P10, P20, P100, P200, P1000	<i>Gilson International B.V., Bad Camberg</i>
Pipetten Research pro 0,5-10 µl, 50-1200 µl	<i>Eppendorf AG, Hamburg</i>
Pipettier-Roboter CAS-1200™	<i>Corbett Life Science, Sydney, Australia</i>
Repro Set (UV-Licht)	<i>Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg (jetzt GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg)</i>
NanoDrop™ 1000 Spektrophotometer	<i>Thermo Scientific, Hamburg</i>
Thermocycler PE 9600	<i>Perkin Elmer Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt</i>
Transferpette®-8 von 2,5 bis 25 ml	<i>Brand GmbH + Co KG, Wertheim</i>
Transilluminator Biometra Ti5	<i>Biometra, Göttingen</i>

Vortex Reax 2000	<i>Heidolph, Kelkheim</i>
Waage E1B120	<i>OHAUS, Greifensee, Schweiz</i>
Waage KERN EW2200	<i>Kern & Sohn, Balingen</i>
Wasserbad	<i>Köttermann Labortechnik, Uetze- Hänigsen</i>
Wasserbad GFL	<i>MAGV, Rabenau-Londorf</i>
Wasserbad Julabo 22A	<i>Julabo Labortechnik, Saalbach</i>
Zentrifuge Biofuge 13R	<i>Heraeus Instruments GmbH, Hanau</i>

3.1.9 Referenzsequenzen

Die in Tabelle 8 aufgeführten Referenzsequenzen sind in der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) öffentlich zugänglich.

Tabelle 8: Referenzsequenzen der untersuchten Genregionen aus der GenBank

Gen	GenBank-Nummer	DNA-Art
<i>IL8RA (CXCR1)</i>	NC_007300. (Position: 110.616.093 – 110.617.795)	Genomisch
<i>IL8RA (CXCR1)</i>	NW_001494678 (Position: 885.517 – 886.596)	Genomisch
<i>IL8RB (CXCR1)</i>	NM_001101285	Kodierend
<i>IGFBP2</i>	NC_007300. (Position: 108.810.787 – 108.839.273)	Genomisch
<i>IGFBP2</i>	NW_174555	Kodierend
<i>PIP5K3</i>	NC_007300. (Position: 101.698.976 – 101.773.063)	Genomisch
<i>PIP5K3</i>	XM_001257235	Kodierend
<i>STAT1</i>	AW289395	Genomisch

3.1.10 Computerprogramme

Die Angaben bezüglich der Internetseiten entsprechen dem Stand Juni 2009

ABI PRISM [®] DNA Sequencing Analysis	<i>Applied Biosystem</i> , Foster City, Californien, USA
BLAST	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
CERVUS Version 3.0.3	<i>Field Genetics Ltd.</i> , T. Marshall
ChromasPro 1.34	<i>Technelysium Pty Ltd</i> , Tewantin, Queensland, Australia
Cri-Map	<i>Washington University School of Medicine</i> , P. Green, St. Louis, Missouri, USA
GeneScore	<i>Technische Universität München</i> , München
Genotyper V3.7	<i>Applied Biosystems</i> , Darmstadt
MapView	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/
MOTIF Search	http://motif.genome.jp/
Mutation Surveyor [®] V 2.60	<i>SoftGenetics LLC.</i> , State College, Pennsylvania, USA
NEBcutter 2.0	<i>New England Biolabs</i> , Ipswich, Massachusetts, USA
Primer3 0.4.0	http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi
SPSS Version 15	<i>SPSS Inc.</i> , Chicago, USA
Tetra-primer ARMS-PCR	http://cedar.genetics.soton.ac.uk/public_html/primer1.html
TFSEARCH 1.3	http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.Html
Vista Browser	http://pipeline.lbl.gov/cgi-bin/gateway2

3.1.11 Datenbanken

Die Angaben bezüglich der Internetseiten entsprechen dem Stand Juni 2009

AnimalQTLdatabase	http://www.animalgenome.org/QTLdb/
ArkDB	http://www.thearkdb.org/

MATERIAL UND METHODEN

MARC_USDA (Cattle genome mapping project / table of contents)	http://www.marc.usda.gov/genome/cattle/cattle.html
CGD (Cattle Genome Database)	http://www.cgd.csiro.au/
Entrez SNP (dbSNP Build 129)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=snp&cmd=search&term=
Entrez Gene (GenBank)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez
GeneCards®	http://www.genecards.org/index.shtml
Genetic Association Database	http://geneticassociationdb.nih.gov/
Human Genome Sequencing Center, Baylor College of Medicine	http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/bovine/
NAGRP (National Animal Genome Research Programme)	http://www.animalgenome.org
OXGRID (The Oxford Grid Project)	http://oxgrid.angis.org.au/
PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez

3.2 Molekulargenetische Methoden

3.2.1 Kandidatengenauswahl

Die Kandidatengene wurden in einem kombinierten Ansatz auf Grund ihrer Position im QTL und ihrer Funktion in der immunologischen Abwehr ausgewählt. Zur Eingrenzung der in Frage kommenden Gene wurde hierfür das Intervall 15 der in Abbildung 3 dargestellten Kurve für die Suche nach Kandidatengenen ausgewählt. Die Kurve basierte auf den Berechnungen mit insgesamt 22 Markern zum Zeitpunkt 6/2007 (Reinsch, persönliche Mitteilung). Die Markerpositionen entsprachen den Werten der Karte von MARC_USDA. Intervall 15 wurde durch die Marker *DIK4880* und *DIK4726* gebildet. Die weiteren Marker sowie die von ihnen eingegrenzten Intervalle sind im Anhang in Tabelle A 3 angegeben.

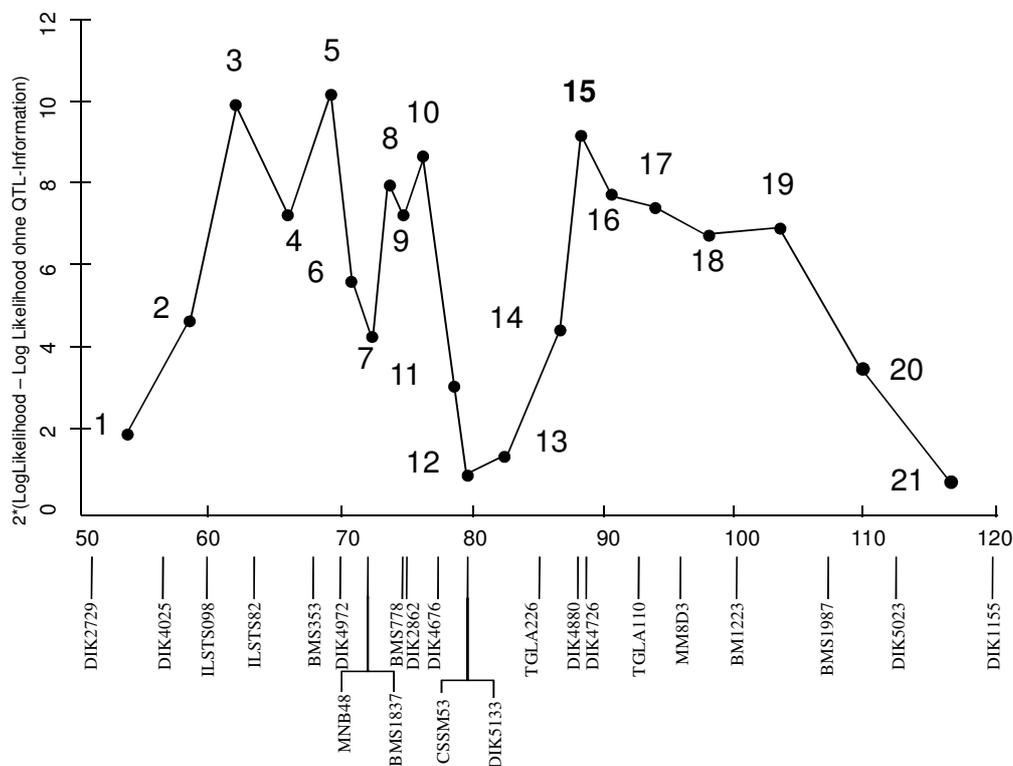


Abbildung 3: Vorläufiges Profil des QTL für SCS auf BTA02 berechnet mit insgesamt 22 Markern. Je 2 Marker bilden ein Intervall. Die putative QTL-Position innerhalb eines Markerintervalls ist jeweils mit einem (•) angegeben. Die X-Achse gibt die Position in cM bezogen auf den QTL-Bereich an, wobei die Lage des 1. Markers 50,87 cM entspricht. Unterhalb der X-Achse sind die einzelnen Marker, sowie schematisch ihre Position auf BTA02 angegeben. Stand Juni 2007

Bei der Suche der das Intervall 15 eingrenzenden Marker im MapViewer (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/>) wurde die Mikrosatelliten *TGLA226* und *MM8D3* als Begrenzung des QTL-Peaks eingesetzt, da den Markern *DIK4880* und *DIK4726* keine

Position zugeordnet werden konnte und ein Konfidenzintervall von 6 cM berücksichtigt werden musste.

Um über die Daten aller in diesem Bereich bereits bekannten Gene für die Auswahl der Kandidatengene verfügen zu können, wurde die Synteniebeziehung zwischen dem bovinen und humanen Chromosom genutzt und der beim Menschen identische Bereich identifiziert. Für eine stärkere Eingrenzung der in Frage kommenden Gene wurde anschließend eine Rangliste von Kandidatengen eines Projektpartners herangezogen. Die Rangliste wurde basierend auf dem funktionellen Hintergrund der Gene und den Ergebnissen einer im Projekt FUGATO durchgeführten Expressionsstudie an Tieren mit genetisch unterschiedlichen Prädispositionen für Mastitisanfälligkeit (Hartmann, persönliche Mitteilung) erstellt. Zur Auswahl der Tiere wurde der RZS der Tiere herangezogen. Tiere, deren hoher RZS auf eine genetisch bedingte höhere Abwehrfähigkeit hinwies, wurden der Gruppe Q zugeteilt, Tiere mit geringerer Abwehrfähigkeit (niedriger RZS) der Gruppe q.

Für Informationen über den funktionellen Hintergrund wurde die manuell gepflegte Datenbank „gene2pubmed“ herangezogen und die erhaltenen MeSH-Terme für die im Intervall 15 befindlichen Gene mit einer angefertigten Stichwortliste verglichen. Aus den gesammelten Informationen wurde anschließend ein Quotient berechnet, der mit der Summe der *fold changes* des betreffenden Gens aus der Expressionsanalyse multipliziert wurde. Die so erhaltenen Werte der einzelnen Gene bildeten die Reihenfolge in der Rangliste (Ernst, persönliche Mitteilung).

Des Weiteren war ein Bioinformaticsprogramm (GeneScore) der Technischen Universität München verfügbar, welches mit Hilfe einer Stichwörterliste aus der PubMed-Datenbank relevante Gene identifiziert und für diese je nach Relevanz einen Score angibt.

3.2.2 Auswahl der SNPs für Assoziationsanalysen

Bei der Auswahl der SNPs für eine Assoziationsstudie wurden verschiedene Kriterien herangezogen. Bereits publizierte und im Zusammenhang mit der somatischen Zellzahl untersuchte SNPs (*CXCR1+777*, *CXCR1/5`UTR/-1768* und *STAT1/3`UTR*) wurden ohne weitere Auswahlkriterien untersucht. Für im Rahmen dieser Arbeit gefundene SNPs wurde - mit Ausnahme der SNPs *IGFBP2/Int3/+167*, *IGFBP2/Int3/+193*, *IGFBP2/Int3/+146insG* und *PIP5K3Ex19/+792* - die Allelfrequenz in der Population Dt. Holstein und im vorhandenen Datenmaterial (10 Familien) geschätzt. Weitere Auswahlkriterien wurden abhängig von der Lokalisation des SNPs im Gen gewählt. Für SNPs in den Exons der Gene wurde geprüft, ob sie die Proteinfunktion des Gens beeinflussen. Hierfür wurde die

Translationsfunktion des Computerprogramms ChromasPro 1.34 (*Technelysium Pty Ltd*, Tewantin, Queensland, Australia) genutzt und die AS-Sequenz für beide Allelvarianten verglichen. Führt der Austausch zu einer Veränderung in der AS-Sequenz, wurde mittels der Blossum62 Substitutionsmatrix der Score für diesen Austausch ermittelt und anhand dieses die Bedeutung des AS-Austauschs für die Proteinfunktion geschätzt.

Für SNPs, die in der nicht kodierenden Sequenz des Gens lagen, wurde mit dem Programm TFSEARCH 1.3 (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>) überprüft, ob sie Bestandteil der Sequenz von Transkriptionsfaktoren waren. Durch den angegebenen Score wurde anschließend beurteilt, inwieweit der Basenaustausch zu einer Funktionsbeeinträchtigung des Transkriptionsfaktors führen könnte. Weiterhin wurde mit dem Vista Browser durch Speziesvergleiche der Sequenzregion geprüft, ob es sich bei der Region in welcher der SNP lag um eine hochkonservierte Region handelte.

3.2.3 Gewinnung von Leukozyten aus Vollblut

Die mit ca. 9 ml – aus der *Vena jugularis* gewonnenem – Blut gefüllten EDTA-Monovetten wurden bei 2500 rpm 20 Minuten zentrifugiert. Im Anschluss daran wurde der *Buffy Coat*, welcher hauptsächlich aus Blutleukozyten besteht und sich als weiße Schicht zwischen dem Plasma und den Erythro- und Thrombozyten befindet (Löhner, 1939), in ein 1,5 ml Reagiergefäß überführt. 50 µl hiervon wurden direkt für die Extraktion von mRNA entnommen, der Rest bei -70 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

3.2.4 Extraktion genomischer DNA aus Leukozyten

Für die Isolierung der genomischen DNA wurde das NucleoSpin[®] Blood Kit (Macherey-Nagel, Düren) verwendet. Anstelle von 200 µl Vollblut wurden 40 µl *Buffy Coat* mit 160 µl 1x TE [10 mM Tris (pH = 7,6), 1 mM EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat] verdünnt und nach Hersteller-Protokoll vorgegangen. Die Inkubationszeit bei 70 °C wurde auf 30 Minuten und die Zentrifugationszeiten bei allen Schritten auf 2 Minuten erhöht.

3.2.5 Extraktion genomischer DNA aus Tiefgefriersperma

Aus den bei -70°C tiefgefrorenen Spermareserven der ADR-MAS Tiere wurde DNA extrahiert. Hierfür wurde die Methode nach Lien et al. (1990) modifiziert angewendet. Das tiefgefrorene Sperma war nach der Gewinnung bereits mit 1 ml PBS mit 2% SDS ca. 10 Minuten auf dem Schüttler gemischt und anschließend bei 13000 rpm abzentrifugiert worden.

Der Überstand wurde verworfen, der Waschvorgang 2x wiederholt und im Anschluss das Pellet mit 500 µl PBS resuspendiert. Die Probe wurde geteilt und 250 µl eingefroren.

Zur Extraktion der DNA wurden die Proben aufgetaut und – wie bei Prinzenberg (1998) beschrieben – beginnend mit dem Schritt der 5stündigen Inkubation weiterverfahren.

3.2.6 Extraktion von mRNA aus Leukozyten

Die Isolation der mRNA aus Leukozyten wurde mit Hilfe des Invisorb[®] Spin Blood RNA Mini Kit (Invitek, Berlin) durchgeführt. Das vorgegebene Protokoll wurde insofern variiert, als dass an Stelle von 1-1,5 ml Vollblut für die Isolation jeweils 50 µl *Buffy Coat* verwendet wurden. Im Anschluss an die Isolation wurde die Konzentration der gewonnenen mRNA auf dem NanoDrop[™] 1000 Spektrophotometer (Thermo Scientific, Hamburg) gemessen und die Probe bei –70°C aufbewahrt.

3.2.7 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Für die Reverse Transkription der mRNA in cDNA wurde das Verso[™] cDNA Kit (Thermo Scientific ABgene, Hamburg) verwendet.

Hierfür wurde ein 12µl Reaktionsansatz aus 3,5 µl der mRNA (zwischen 2 und 10 ng/µl) und 1µl Random Primer sowie 7,5 µl H₂O angesetzt. Um die Sekundärstruktur zu zerstören, wurde dieser Ansatz bei 70°C für 5 Minuten inkubiert und danach auf Eiswasser abgekühlt. Im Anschluss daran wurden dem Reaktionsansatz 4 µl 1x First Strand Synthesis Buffer, 0,2 µM je dNTP, 1µl RT Enhancer und 1 µl Verso Enzym Mix hinzugefügt. Im Thermocycler (iCycler, BioRad, München) wurde dann die cDNA-Synthese bei 50°C für 60 Minuten und die anschließende Inaktivierung der Reversen Transkriptase bei 95 °C für 2 Minuten durchgeführt.

3.2.8 Amplifizierung ausgewählter Genbereiche mittels Polymerasekettenreaktion

Für die Sequenzierung von Genbereichen und die Typisierung von SNPs mittels RFLP wurden Einzel-PCRs etabliert (Mullis und Faloona, 1987). Eine dieser PCRs (*PIP5K3_Ex28-33*) stellt eine Touch-down-PCR dar (Don et al., 1991). Des Weiteren wurden 2 Tetra-Primer Amplification Refractory Mutation System (ARMS) -PCRs entwickelt (Shu et al., 2001).

Für die Untersuchung der Mikrosatelliten wurden Multiplex-PCRs etabliert (Chamberlain et al., 1988; Ziegler et al., 1992), welche sich neben den Primerkonzentrationen auch in ihrer Annealingtemperatur unterschieden.

In den weiteren Kapiteln wird auf die jeweiligen PCR-Bedingungen näher eingegangen.

3.2.8.1 Einzel-PCR

Zur Untersuchung der Kandidatengene und die im Anschluss daran stattfindende Typisierung von Polymorphismen mittels RFLP sowie zur Untersuchung des Mikrosatelliten MNB48 wurden Einzel-PCRs etabliert.

3.2.8.1.1 Primerauswahl

Die Primer für die Kandidatengene wurden mit Hilfe der Internetsoftware Primer3 (Rozen und Skaletsky, 2000) ausgewählt. Um die Amplifizierung eines Pseudogens zum größten Teil ausschließen zu können, wurden die Primer – wenn möglich – in den Intronbereich der Gene gelegt, da diese bei einem Teil der Pseudogene fehlen (Gerstein und Zheng, 2006).

Bei der Primerauswahl für das Gen *CXCR1* wurde dessen hohe Homologie mit dem Gen *CXCR2* berücksichtigt. Aus diesem Grund wurde für das PCR-Produkt *CXCR1_Exon I* der Vorwärtsprimer zum Teil in die 5'UTR und der Rückwärtsprimer in einen Bereich im Exon I gelegt, welcher in der Sequenz eine möglichst geringe Homologie zu der von *CXCR2* aufwies. Auch bei der Auswahl der RFLP-Primer für das Produkt *CXCR1_Ex1_+199* wurde hierauf geachtet und der Rückwärtsprimer so ausgewählt, dass die Sequenz an 4 Positionen nicht mit der von *CXCR2* übereinstimmte.

Die Primer für das Produkt *PIP5K3_Ex26* wurden nach Sequenzierung des Produktes *PIP5K3_Ex23-28* und der Identifizierung eines Polymorphismus im Exon XXVI des Sequenzierproduktes ausgewählt.

Die Primer für das Produkt *STAT1_3'UTR* wurden in Anlehnung an das Paper von Cobanoglu et al. (2006) ausgewählt, der Vorwärtsprimer zur Optimierung der Schmelztemperatur jedoch um zwei bp in 5'-Richtung verschoben.

Die Auswahl der PCR-Primer für das Gen *PIP5K3* wurde in Anlehnung an hochpolymorphe Bereiche und Splicingvarianten der mRNA beim Mensch durchgeführt (<http://www.genecards.org>, Stand Juni 2009). Es wurde darauf geachtet die Primer so zu legen, dass sie keine Exons umschlossen, die beim Menschen im Laufe der Transkription herausgeschnitten werden. Um die Splicingvarianten annähernd auf das Rind übertragen zu können, wurden die Exonsequenzen des Menschen mit denen des Rindes verglichen. Die ausgewählten Primer und Produktgrößen sind aufgeführt.

Primersequenzen und Produktgrößen der Amplifikate der Gene *CXCR1*, *STAT1*, *IGFBP2*, sowie des Exon XIX und XXVI des Gens *PIP5K3* sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Kreation einer künstlichen Schnittstelle

Für die Typisierung des SNPs *CXCR1/5'UTR/-69* und für die Etablierung eines Doppelverbaus der SNPs *PIP5K3/Int18/-112* und *PIP5K3/Ex19/+58* wurde durch die Auswahl der Vorwärtsprimers eine künstliche Schnittstelle (*amplification created restriction site*, ACRS) kreiert (Haliassos et al., 1989; Lien et al., 1992). Hierfür wurde bei beiden SNPs zwei Basenpaare 5`aufwärts des SNPs in der Vorwärts-Primersequenz ein Basenaustausch vorgenommen (bei *CXCR1/5'UTR/-69* wurde die Base T durch die Base C, bei *PIP5K3/Int18/-112* die Base A durch die Base C ausgetauscht; Abbildung 4). Die Sequenzen der Vorwärts- und Rückwärtsprimer sind in Tabelle 9 zu finden.

<u><i>CXCR1/5'UTR/-96</i></u>	
Ausgangssequenz	TGGGAGGGGTTT G AGGATGAGTTT G RAAATTACAGCGGCACG
Primersequenz	TGGGAGGGGTTT G AGGATGAGT T <u>C</u>
<u><i>PIP5K3/Int18/-112</i></u>	
Ausgangssequenz	GTAGGAAATGGCTATTAGCATA C AA R TAGTCTTACTTAAGAG
Primersequenz	GTAGGAAATGGCTATTAGCATA C <u>C</u>

Abbildung 4: Erzeugung einer künstlichen Schnittstelle an den Polymorphismen *CXCR1/5'UTR/-96* und *PIP5K3/Int18/-112* durch Basenaustausch im Vorwärtsprimer. Die zur Erzeugung einer künstlichen Schnittstelle ausgetauschten Basen sind unterstrichen. Die Stelle des Polymorphismus ist jeweils fett gedruckt. R = G/A

Primerauswahl für Tetra Primer ARMS-PCR

Die Primerauswahl zur Entwicklung einer Tetra-Primer Amplification Refractory Mutation System (ARMS)–PCR für das Amplifikat *IGFBP2_Int1_+55* fand mit Hilfe eines Programms (http://cedar.genetics.soton.ac.uk/public_html/primer1.html) basierend auf der Publikation von Shu et al. (2001) statt. Für das Produkt *CXCR1_-1768* wurden die Primer aus der Publikation von Leyva-Baca et al. (2008b) ausgewählt. Die Sequenzen der Primer sind in Tabelle 9 dargestellt.

MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 9 : PCR-Primer für die Gene *CXCR1*, *IGFBP2*, *PIP5K3* und *STAT1* sowie die PCR-Produktgrößen in bp

Produktname	Primersequenz fwd./rev. (5' → 3')	Produktgröße bp
<i>CXCR1_Ex1_1P</i>	CACCATGACAATCATCCTGAAAG GTAGCAGACTAGGTCCGAGTACG	479
<i>CXCR1_Ex1_+199</i>	CCATGACCTTGCCTATCTGG CCTCACGGAAGATGAAGATG	264
<i>CXCR1_+777</i>	GAGGCCTATCAACCACCGTA GCGATCAGGACCAGGTTGTA	266
<i>CXCR1_-1768_IN</i>	GCCCTGCGGCTTAGTCTTTTGTGAAGAT CACCTTTTAATATCTCTGCCAGGACTACT	*
<i>CXCR1_-1768_OUT</i>	CTTAGTAGCTGCAGCTTGCAGGCTCTAG AGCTATGTGACCTTGAGTGGGTCCTTTT	*
<i>CXCR1_5'UTR_-96</i>	TGGGAGGGGTTTGAGGATGAGTTC GGAGTTTCCCAGGAGGCTTA	159
<i>IGFBP2_Prom2</i>	GAATTGCAATGGTCCCTAAGAG ATGTAACGTGGGTCCCCTACAC	406
<i>IGFBP2_Ex1</i>	GTGGAGAAAGAAGCGGAGGAG TATCCCCAGCAAATTAGTAGCC	769
<i>IGFBP2_Int1_+55_IN</i>	GTTGGGAGAACTTAGTGGGCGGGGTGG CTGCAGAAGGGCCGCTAGCCGGGATT	*
<i>IGFBP2_Int1_+55_OUT</i>	ACTTGCGAAAAGCACGGCGATGCTGAGT CCTCTCCCGGGACCTGACTTTCGGGTTT	*
<i>IGFBP2_Ex2</i>	TTAAACACACCCTTCTTATTTTCGAG ACACATTTCTCAGGTCCAGACTTC	327
<i>IGFBP2_Ex3</i>	ACTTGAAAAGCTTGACCTTCTG TTTCTTTCTGCCTAGGAGAGTTTG	301
<i>IGFBP2_Ex4</i>	CTTTCTTGTCATTGTCAGGGTCAG GTTAGCAGCGGAATCAGAAAGAAC	465
<i>IGFBP2_Ex5</i>	ACTCTGAGTGTCTCTCTGTGTGC CTCACTCACCTGTTTGAGGTTGTA	186
<i>IGFBP2_Ex6</i>	ATACACATGTCAGAACTCCTGGAAG TAATAACCAGAGCGCAGTTCCTG	451

*Die Produktgrößen der Tetra-Primer-ARMS-PCR sind im Ergebnisteil in den Kapiteln 3.2.2.3 bzw. 3.2.3.2 zu finden.

Die im Vergleich zur Ausgangssequenz ausgetauschten Basen sind unterstrichen.

Tabelle 9 (Fortsetzung)

Produktname	Primersequenz fwd./rev. (5' → 3')	Produktgröße bp
<i>PIP5K3_Ex5-9</i>	CACAGACAGTAATTCATTGGTG GAGTGTCTTCCACAGAGTTCAC	717
<i>PIP5K3_Ex12-18</i>	GCTGACCAAAAAGAGTATTTGATTTC AAAACATCAGTGTCTTGGTTTGTTTC	859
<i>PIP5K3_Int18-Ex19</i>	GTAGGAAATGGCTATTAGCATAAC_ GAGAATGATAAGCTACACAGATCATAA	280
<i>PIP5K3_Ex19_1</i>	AGGAAATGAAACTCATGAGAACG GGATCACATCTTTCAACTCTTGC	884
<i>PIP5K3_Ex19_2</i>	ATGACACTGGCCTGTATGTTACC TTACACCCAAGTCATCATGTCAG	862
<i>PIP5K3_Ex19_2N</i>	CATCAGTACCAGAGTCATTGCTTC ATCTTAAATGTGCACAAGCACAAAG	740
<i>PIP5K3_Ex23-28</i>	ACTCCATCCACCACGATTATCAC GAGATGCATCCACTGCACTTATC	552
<i>PIP5K3_Ex26</i>	GCGTCTCAGATTGCTGGAGT CCTGACTGCAGAGTCACACC	211
<i>PIP5K3_Ex28-33</i>	CAAGTCCTGGAAGACTGAGACAAG AGGTAGTCTAATTGGGCTGCTACTC	514
<i>STAT1_3'UTR</i>	TAGCCTCAAGTTTGCCAGTG GGCTCCCTTGATAGAAGTGT	316

3.2.8.1.2 PCR-Bedingungen

Für die meisten PCRs wurde genomische DNA verwendet. Die Amplifizierung eines Teils der Exons von *PIP5K3* wurde auf Grund der Größe des Gens jedoch mit cDNA durchgeführt.

Als Ansatzvolumen der PCR wurden je nach Zielsetzung 15 bzw. 25 µl (PCR-RFLP) sowie 50 µl (Sequenzierung) eingesetzt. Diesen wurde mit Ausnahme des Ansatzes der PCR für *IGFBP2_Ex1* je 1 µl bzw. 2 µl bzw. 3µl DNA (20ng/µl) beigefügt. Für den 50 µl Ansatz der PCR *IGFBP2_Ex1* wurde 1 µl DNA (20ng/µl) verwendet. Für die Amplifizierung der cDNA wurden Ansätze von je 50 µl verwendet. Die cDNA Konzentration schwankte von ca. 320 ng/µl bis 550 ng/µl. Von dieser wurden für die PCR des Produktes *PIP5K3_Ex5-9* je 6 µl

cDNA und für die des Produktes *PIP5K3_Ex12-18* je 2µl eingesetzt. Für die PCR der Produkte *PIP5K3_Ex23-28* und *PIP5K3_Ex28-33* wurden je 3 µl.

CXCR1

Die Ansätze für die Primerpaare der Produkte *CXCR1_Ex1_1P*, *CXCR1_+777* und *CXCR1_Ex1_+199* sind der Tabelle 10 zu entnehmen. Bei Produkt *CXCR1_Ex1_1P* wurde eine Optimierung der PCR durch die Erhöhung des Magnesiumgehaltes auf 3 mM erzielt (Tabelle 18). Der Ansatz für die Primerpaare von *CXCR1_5'UTR_-96* ist in Tabelle 11 angegeben. Bei diesem wurde eine MgCl₂-Konzentration von 1,5 mM verwendet (Tabelle 18). Der Ansatz für das Produkt *CXCR1_5'UTR_-1768* ist in Tabelle 12 zu finden.

IGFBP2

Tabelle 10 gibt die Ansätze für die Primerpaare der Produkte *IGFBP2_Prom1/2*, und *IGFBP2_Ex6* an. Die PCR für das Produkt *IGFBP2_Ex1* wurde mit dem Ansatz in Tabelle 12 durchgeführt. Alle weiteren Produkte (*IGFBP2_Ex2-5*) wurden mit dem Ansatz in Tabelle 11 amplifiziert, wobei für die Produkte *IGFBP2_Ex 4* und *IGFBP2_Ex5* eine Konzentration von 1,5 mM MgCl₂ eingesetzt wurde. Bei der Amplifizierung des Produkt *IGFBP2_Ex2* wurde 2mM MgCl₂ eingesetzt und bei *IGFBP2_Ex3* 2,5 mM MgCl₂. Der Ansatz für das Produkt *IGFBP2_Int1_+55* ist in Tabelle 15 zu finden.

PIP5K3 und *STAT1*

Die Ansätze für die Primerpaare der Produkte *PIP5K3_Ex19_1/2*, *PIP5K3_Ex19_2N* und *STAT_3'UTR* sind der Tabelle 10 zu entnehmen, hier wurde eine Optimierung der jeweiligen PCR durch die Variation des MgCl₂-Gehaltes (2 mM bis 3 mM) und den Einsatz von DMSO (4%) als Adjuvanz erzielt (Tabelle 18). Der Ansatz für das Produkt *PIP5K3_Ex26* ist in Tabelle 11 angegeben. Für diesen wurde eine MgCl₂-Konzentration von 1,5mM ermittelt (Tabelle 18).

MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 10: Ansätze der PCR für *CXCR1_Ex1_1P*, *CXCR1_+777*, *CXCR1_Ex1_+199*, *IGFBP2_Prom1/2*, *IGFBP2_Ex6*, *PIP5K3_Ex19_1/2*, *PIP5K3_Ex19_2N* und *STAT_3'UTR*, sowie den Mikrosatelliten *MNB48*

Ansatz	Konz. in 15 µl	Konz. in 20µl	Konz. in 50 µl
10x Taq Buffer advanced	1x konzentriert	1x konzentriert	1x konzentriert
dNTPs (20 mM)	2 mM	2 mM	2 mM
Primer fwd (10 µM)	0,7 µM	0,8 µM	0,8 µM
Primer rev (10 µM)	0,7 µM	0,8 µM	0,8 µM
Taq DNA-Polymerase	0,5 U	1 U	2 U
MgCl ₂ (25 mM)	s. Tabelle 18	s. Tabelle 18	sTabelle 18

Tabelle 11: Ansätze der PCR für *IGFBP2_Ex2/3/4/5*, *CXCR1_5'UT_-96* und *PIP5K3_Ex26* mit 1,5 mM MgCl₂

Ansatz	Konz. in 15 µl	Konz. in 20 µl	Konz. in 50 µl
5x colorless GoTaq® Flexi Buffer	2x konzentriert	2x konzentriert	2x konzentriert
dNTPs (20 mM)	2 mM	2 mM	2 mM
Primer fwd (10 µM)	0,7 µM	0,8 µM	0,8 µM
Primer rev (10 µM)	0,7 µM	0,8 µM	0,8 µM
GoTaq® Flexi DNA-Polymerase	0,5 U	1 U	2 U
MgCl ₂ (25 mM)	s. Tabelle 18	s. Tabelle 18	s.Tabelle 18

Tabelle 12: Ansatz der PCR für *IGFBP2_Ex1*

Ansatz	Konz. in 50 µl
10x PCR Reaction Buffer mit 20 mM MgCl ₂	1x konzentriert
dNTPs (20 mM)	2 mM
Primer fwd (10 µM)	0,2 µM
Primer rev (10 µM)	0,2 µM
5xGC rich Solution	2x konzentriert
Fast-Start Taq	2 U

Tabelle 13: PCR-Ansatz für *PIP5K3_Ex5-9*, *PIP5K3_Ex12-18*, *PIP5K3_Ex23-28* und *PIP5K3_Ex28-33*

Ansatz	Konz. in 50 µl
ABsolute™ QPCR Mix	1x konzentriert
Primer fwd.	0,4 µM
Primer rev.	0,4 µM

Tetra-Primer ARMS-PCR-Bedingungen

Die Typisierung der SNPs *CXCR1/5'UTR/-1768* und *IGFBP2/Int1/+55* fand mit Hilfe einer Tetra-Primer ARMS-PCR (Shu et al., 2001) im Gradientencycler (iCycler, *Bio-Rad Laboratories GmbH*, München) statt. Die Ansätze hierfür sind in Tabelle 15 bzw. Tabelle 16 zu ersehen.

Tabelle 14: PCR-Ansatz für *CXCR1_5'UTR_-1768*

Ansatz	Konz. in 15 µl
ABsolute™ QPCR Mix	1x konzentriert
Primer fwd in	0,3 µM
Primer rev in	0,3 µM
Primer fwd out	0,7 µM
Primer rev out	0,7 µM

Tabelle 15: PCR-Ansatz für *IGFBP2_Int1_+55*

Ansatz	Konz. in 15 µl
5x colorless GoTaq® Flexi Buffer	1x konzentriert
dNTPs (20 mM)	2 mM
Primer fwd in	0,3 µM
Primer rev in	0,3 µM
Primer fwd out	0,7 µM
Primer rev out	0,7 µM
MgCl ₂ 25 mM	2 mM
GoTaq® Flexi DNA-Polymerase	0,5 U

PCR-Protokolle

Für die PCRs wurde mit Ausnahme der PCRs mit cDNA und der Tetra-Primer-ARMS-PCR ein Standard-PCR-Protokoll genutzt (Tabelle 16). Zur Bestimmung der Annealing-Temperatur wurde ein Temperaturgradient mit Hilfe eines Gradientencyclers (iCycler, *Bio-Rad Laboratories GmbH*, München) durchgeführt.

Variationen des Standard-PCR-Protokolls sind der Tabelle 18 zu entnehmen

Tabelle 16: Standard-PCR-Protokoll zur Amplifikation von PCR-Produkten

Zyklus	Temperatur (°C)	Dauer in min	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	1:30	1
Denaturierung	95 °C	0:15	} 30-35 Zyklen
Annealing	s. Tabelle 18	0:20	
Elongation	72 °C	s. Tabelle 18	
Abschließende Elongation	72 °C	5:00	1
Kühlung	6 °C	∞	

Als Protokoll für die PCR mit cDNA diene das in Tabelle 17 dargestellte modifizierte Protokoll des Verso™ cDNA Kit (Thermo Scientific ABgene, Hamburg).

Tabelle 17: PCR-Protokoll zur Amplifikation von PCR-Produkten aus cDNA

Zyklus	Temperatur (°C)	Dauer in min	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	15:00	1
Denaturierung	95 °C	0:30	} s. Tabelle 18
Annealing	s. Tabelle 18	1:30	
Elongation	72 °C	1:30	
Abschließende Elongation	72 °C	10:00	1
Kühlung	6 °C	∞	

Als PCR-Protokoll der Tetra-Primer-ARMS-PCRs diene das in Tabelle 15 (*IGFBP2_Int1_+55*) bzw. Tabelle 13 (*CXCR1_5'UTR_-1768*) abgebildete Protokoll.

MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 18: PCR-Produkte mit Annealingtemperatur, MgCl₂-Konzentration (in Puffer von ABgene und Roche enthalten), Elongationszeit und Zyklenanzahl sowie Verwendung der PCR-Produkte.

Produktname	AT (°C)	MgCl ₂ (mM)	EZ (s)	Zyklen	Verwendung des Amplifikats
<i>CXCR1_Ex1_IP</i>	60	3	30	35	Sequenzierung
<i>CXCR1_Ex1_+199</i>	58	-	30	35	RFLP
<i>CXCR1_+777</i>	62	-	40	35	Sequenzierung, RFLP
<i>CXCR1_5'UTR_-1768</i>	60	ABgene	30	35	Tetra-Primer ARMS-PCR
<i>CXCR1_5'UTR_-96*</i>	65	1,5	30	35	RFLP
<i>IGFBP2_Prom1</i>	60	-	30	35	Sequenzierung
<i>IGFBP2_Prom2</i>	62	-	30	35	Sequenzierung
<i>IGFBP2_Ex1*</i>	60	Roche	45	40	Sequenzierung
<i>IGFBP2_Int1_+55</i>	69	2	30	40	Tetra-Primer ARMS-PCR
<i>IGFBP2_Ex2</i>	62	2	30	35	Sequenzierung
<i>IGFBP2_Ex3</i>	62	2,5	30	35	Sequenzierung
<i>IGFBP2_Ex4</i>	65	1,5	30	35	Sequenzierung
<i>IGFBP2_Ex5</i>	55	1,5	30	35	Sequenzierung
<i>IGFBP2_Ex6</i>	62	-	30	35	Sequenzierung
<i>PIP5K3_Ex5-9</i>	62	ABgene	90	35	Sequenzierung
<i>PIP5K3_Ex12-18</i>	65	ABgene	90	40	Sequenzierung
<i>PIP5K3_Int18-Ex19</i>	62	2,5	30	35	Doppel-RFLP
<i>PIP5K3_Ex19_1</i>	60	3	60	35	Sequenzierung, RFLP
<i>PIP5K3_Ex19_1N</i>	60	-	50	35	Sequenzierung
<i>PIP5K3_Ex19_2</i>	60	3	60	35	Sequenzierung, RFLP
<i>PIP5K3_Ex19_2N**+***</i>	60	-	50	35	Sequenzierung
<i>PIP5K3_Ex23-28</i>	62	ABgene	90	40	Sequenzierung
<i>PIP5K3_Ex26</i>	65	1,5	30	35	RFLP
<i>PIP5K3_Ex28-33***</i>	65/60	ABgene	90	10 (↓0,5°C); 30	Sequenzierung
<i>STA1_3'UTR</i>	61	-	30	30	Sequenzierung, RFLP

* Reamplifizierung des PCR-Produkts mit demselben PCR-Protokoll

** 4% DMSO im Ansatz

*** Touchdown-PCR

3.2.9 Amplifizierung von Mikrosatelliten

3.2.9.1 Mikrosatelliten- und Primerauswahl

Im Rahmen der QTL-Studie wurden insgesamt 25 Mikrosatellitenmarker typisiert (Tabelle 19).

Die Mikrosatelliten wurden aus der MARC_USDA bovine linkage map (<http://www.marc.usda.gov/genome/genome.html>) im Bereich des von Bennewitz et al. (2003) detektierten QTLs für SCS auf BTA02 ausgewählt. Dieser QTL befindet sich zwischen ca. 60 und 120 cM auf dem Chromosom und umspannt mit einem hinzugenommenen Konfidenzintervall ca. 128 cM. In diesem Bereich wurden für eine erste Phase der Genotypisierung 16 Mikrosatelliten (Multiplex 1-3; Tabelle 19) so ausgewählt, dass im Durchschnitt alle 5 cM ein Marker untersucht werden konnte. Sechs dieser Marker waren bereits Teil der Analysen des QTL-Kartierungsprojektes „Genomanalyse Rind“ (Bennewitz et al., 2003).

Im Anschluss an die statistische Auswertung wurden vier weitere Mikrosatelliten (Multiplex 4; Tabelle 19) im distalen QTL-Bereich ausgewählt, so dass die Marker in diesem Bereich einen durchschnittlichen Abstand von 2,534 cM aufwiesen.

Die Marker der Multiplex 5 (Tabelle 19) wurden anschließend zur QTL-Kartierung des vorderen QTL-Abschnitts ausgewählt. Neben der Position wurde für alle Mikrosatelliten als Auswahlkriterium die Anzahl der publizierten Allele herangezogen.

Für den Mikrosatelliten *ILSTS098* wurden im Laufe der Untersuchungen neue Primer (*ILSTS98_n F+R*) mit der Internetsoftware Primer3 (Rozen und Skaletsky, 2000) ausgewählt.

Tabelle 19: Auflistung der in der jeweiligen Multiplex-PCR enthaltenen Mikrosatelliten

Multiplex Nr.	Mikrosatelliten
Multiplex 1	BMS353, DIK4726, MM8D3, B1223
Multiplex 2	TGLA226, DIK4025, DIK2729, ILSTS82, BMS778, BMS1987, DIK5023
Multiplex 3	TGLA110, ILSTS98, DIK1155, CSSM53, BMS1837
Multiplex 4	DIK4880, DIK4676, DIK5133, DIK2862, DIK4972
Multiplex 5	DIK4369, BMS1264, DIK4673

Die Detektion der Fragmente auf dem ABI PRISM[®] 377 DNA Sequencer (*Applied Biosystems*, Darmstadt) wurde durch die Markierung der 5'-Enden der Primer mit den

MATERIAL UND METHODEN

Farbstoffen VIC, NED und 6-FAM gewährleistet. In Tabelle 20 sind die Primersequenzen und Allelgrößen sowie die Label der untersuchten Mikrosatelliten dargestellt.

Tabelle 20: Allelgröße, Primersequenzen und Label der Rückwärtsprimer der 24 untersuchten Mikrosatelliten

Name	Größe (bp)	Primersequenz (5' → 3')	Label
<i>BM1223</i>	163-177	AGGCAAATTGTGTTTCCAGC	
		TCATAAGGGTTTGGAGGCTG	6-FAM
<i>BMS353</i>	108-122	TATCATTCTCTCTTTTCACATCCA	
		CTGATTTATCTTGAAATGCAGGG	VIC
<i>BMS778*</i>	135-163	CTTGGGGAGGCAGAATTTA	
		CCTCTCCACATACTTTCTCCA	VIC
<i>BMS1264</i>	135-145	TGCACACAAACAAGCATTTT	
		GCGAGCCATGAACATGTAAT	NED
<i>BMS1837</i>	83-109	ACGATCTAGCAATAGTTGTTTCCACA	
		TTCATTATTCCTTCCTTTGTCTTC	6-FAM
<i>BMS1987*</i>	108-124	TGATGCAGAGAACGTTTTAATTT	
		CTTGGGGTAGGCAGAGATTT	6-FAM
<i>CSSM53</i>	97-107	AGTGGAATCCAGATAAGATGTATCA	
		TTACTTAACCATTAAAACAGAGGG	VIC
<i>DIK1155</i>	199-205	GCCAAGTGACCACATATTTCTCT	
		CTTTAGCCTCTGAAGCCACCT	VIC
<i>DIK2729</i>	255-263	CTCCCACTGTGGTTCTGACA	
		GTCCTGGGCCTGGTAAAATA	NED
<i>DIK2862</i>	149-169	GGGGCTTTATCATTTTGCAT	
		TGAAAGCACAGTAGGTTTGCAC	VIC
<i>DIK4025</i>	171-209	AGCTCCACATTTTCAGTGATTG	
		CTGTAGCCCTCCAGGAACAC	NED
<i>DIK4369</i>	175-203	TGTAAGGATTTGTCTATTCTGCCTA	
		GTGAGGAAGTGTGGGACTGG	NED
<i>DIK4673</i>	221-239	GTACTTGGGGAAGCCCTCTC	
		ACTGCGCTTGAGGGAAAATA	VIC
<i>DIK4676</i>	108-208	GTTCTTGGGACGCTTCTCTG	
		AGTGGCACACCCAAAAAGAG	6-FAM

* = Marker, die Teil des QTL-Kartierungsprojektes „Genomanalyse Rind“ waren (Bennewitz et al., 2003)

Tabelle 20 (Fortsetzung)

Name	Größe (bp)	Primersequenz (5' → 3')	Label
<i>DIK4726</i>	176-188	TGTGTCCTTGTAGCTGTGTGTG	
		TGTTGTGATGCCCTCTTTGA	VIC
<i>DIK4880</i>	138-146	ACCGATGGTTATTTGCTTCG	
		TAGAAGCACCCAGCTGTTGA	NED
<i>DIK4972</i>	222-252	GCCTCCCAGAATCCTGACTA	
		GAATTTCTGGCAGTTCCTG	6-FAM
<i>DIK5023</i>	172-178	GAGAGGGTGGGCCATACATT	
		AGGGTCAGAGAGGTCAAGCA	6-FAM
<i>DIK5133</i>	200-214	AGGAGACATCAGTGGACATGG	
		CCTTTCCCATCACCTCAAGA	VIC
<i>ILSTS82*</i>	104-116	TTCGTTCTCATAGTGCTGG	
		AGAGGATTACACCAATCACC	VIC
<i>ILSTS98*</i>	97-123	AGGAATCACTGGATAGATGC	
		AGTGTATACTGCTTTCTCCC	NED
<i>ILSTS98_n</i>	157-193	GCCAGTAGCATCAAAAATGC	
		CCCTGGCATTCAACAAGTG	6-FAM
<i>MM8D3*</i>	137-147	CCCAAGGACAGAAAAGACT	
		CTCAAGATAAGACCACACC	6-FAM
<i>MNB48</i>	158-194	AGAGCTTGTATTGCTCACGTAGG	
		TCCACCAGAGACTTGGGTCC	6-FAM
<i>TGLA110*</i>	156-170	GTATTTTCAGACAGCCCCTGGTGTC	
		CAGCATTTACTTATACACACTCACCTGC	NED
<i>TGLA226</i>	129-153	AGTGGAATCCAGATAAGATGTATCA	
		ACATGAAAAGAAGCAATATCGTAAC	NED

* = Marker, die Teil des QTL-Kartierungsprojektes „Genomanalyse Rind“ waren (Bennewitz et al., 2003)

3.2.9.2 Bedingungen Multiplex-PCR

Die Multiplex-PCRs wurden mit dem ABsolute™ QPCR Mix (Abgene House, Surrey, UK) durchgeführt. Das angegebene Ansatzvolumen von 25 µl wurde auf ein Gesamtvolumen von 12 µl reduziert, in welchem 24 ng Template enthalten waren.

Für die Austestung der Primerkonzentration wurde in einem ersten Schritt für jede Multiplex-PCR ein 10x Primermix mit je 1 pmol/µl Primer angesetzt. Nach einer im Anschluss an die

PCR stattfindenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese auf dem ABI PRISM[®] 377 DNA Sequencer (*Applied Biosystems Applied Biosystems GmbH, Darmstadt*) wurde die Konzentration des jeweiligen Primers je nach Intensität der Peaks angepasst.

Gleichzeitig wurde ein Temperatur-Gradient zur Optimierung der Annealing-Temperatur durchgeführt.

Die endgültigen Konzentrationen der Primer sind in den Tabelle 21 bis Tabelle 25 vermerkt. In der Tabelle 26 sind der Reaktionsansatz und anschließend das Cyclerprogramm der einzelnen Multiplex-PCRs angegeben. Alle PCRs wurden im Gradientencycler iCycler 96well (*Bio-Rad Laboratories GmbH, München*) mit dem in Tabelle 27 aufgeführten Programm durchgeführt.

Tabelle 21: Multiplex Nr. 1, 10x Primermix der Mikrosatelliten (BMS353, DIK4726, MM8D3, BM1223)

Primer (Konz.: 20 µM)	Volumen (µl)	Konzentration im 10x Primermix (µM)
BMS353 fwd / rev	10 / 10	0,5
DIK4726 fwd / rev	30 / 30	1,5
MM8D3 fwd / rev	50 / 50	2,5
BM1223 fwd / rev	20 / 20	1,0
H ₂ O für Mol.-Biol.	180	-
Gesamt	400	-

Tabelle 22: Multiplex Nr. 2, 10x Primermix der Mikrosatelliten TGLA226, DIK4025, DIK2729, ILSTS82, BMS778, BMS1987, DIK5023)

Primer (Konz.: 20 µM)	Volumen (µl)	Konzentration im 10x Primermix (µM)
TGLA226 fwd / rev	30 / 30	1,5
DIK4025 fwd / rev	30 / 30	1,5
DIK2729 fwd / rev	10 / 20	0,5
ILSTS82 fwd / rev	10 / 20	0,5
BMS778 fwd / rev	50 / 50	2,5
BMS1987 fwd / rev	15 / 15	0,75
DIK5023 fwd / rev	10 / 10	0,5
H ₂ O für Mol.-Biol.	70	-
Gesamt	400	-

MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 23: Multiplex Nr. 3, 10x Primermix der Mikrosatelliten TGLA110, ILSTS98 bzw. ILSTS98_neu, DIK1155, CSSM53, BMS1837

Primer (Konz.: 20 µM)	Volumen (µl)	Konzentration im 10x Primermix (µM)
TGLA110 fwd / rev	10 / 10	0,5
ILSTS98_ fwd / rev*	20 / 20	1,0
DIK1155_ fwd / rev	20 / 20	1,0
CSSM53_ fwd / rev	40 / 40	3,5
BMS1837_ fwd / rev	30 / 30	1,0
H ₂ O für Mol.-Biol.	160	-
Gesamt	400	

*ILSTS98 bzw. ILSTS98_neu

Tabelle 24: Multiplex Nr. 4, 10x Primermix der Mikrosatelliten DIK4880, DIK4676, DIK5133, DIK2862, DIK4972

Primer (Konz.: 20 µM)	Volumen (µl)	Konzentration im 10x Primermix (µM)
DIK4880_ fwd / rev	40 / 40	2,0
DIK4676_ fwd / rev	10 / 10	0,5
DIK5133_ fwd / rev	20 / 20	1,0
DIK2862_ fwd / rev	20 / 20	1,0
DIK4972_ fwd / rev	10 / 10	0,5
H ₂ O für Mol.-Biol.	200	
Gesamt	400	

Tabelle 25: Multiplex Nr. 5, 10x Primermix DIK4369, BMS1264, DIK4673

Primer (Konz.: 20 µM)	Volumen (µl)	Konzentration im 10x Primermix (µM)
DIK4369_ fwd / rev	10 / 10	0,5
BMS1264_ fwd / rev	10 / 10	0,5
DIK4673_ fwd / rev	10 / 10	0,5
H ₂ O für Mol.-Biol.	270	
Gesamt	400	

Tabelle 26: Reaktionsansatz für die Multiplex-PCR 1-5

Ansatz	Konzentration in 12 µl
2x ABGene Q-PCR-Mix	1x konzentriert
10x Primermix	1x konzentriert

Tabelle 27: PCR-Programm zur Durchführung der Multiplex-PCR

Zyklus	Temperatur (°C)	Dauer in min	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	15:00	1
Denaturierung	95 °C	0:30	
Annealing	Multiplex Nr.1: 54 °C Multiplex Nr.2: 60 °C Multiplex Nr.3: 60 °C Multiplex Nr.4: 62 °C Multiplex Nr.5: 56 °C	1:30	30
Elongation	72 °C	1:00	
Abschließende Elongation	72 °C	10:00	1
Kühlung	6 °C	∞	

Für die Einzel-PCR zur Analyse des Markers *MNB48* wurde der in Tabelle 10 beschriebene Ansatz verwendet. Als PCR-Protokoll diente das in Tabelle 16 aufgeführte Protokoll mit einer Annealingtemperatur von 67 °C und einer Elongationszeit von 30 Sekunden.

3.2.10 Sequenzanalyse

3.2.10.1 Aufreinigung der PCR-Produkte

Die zur Sequenzierung eingesetzten PCR-Produkte wurden mit dem Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (*Promega GmbH*, Mannheim) nach Herstellerprotokoll aufgereinigt.

3.2.10.2 Sequenzierung spezifischer Genbereiche

Für die Suche nach Polymorphismen in den ausgewählten Genen wurden Sequenzierungen durchgeführt. Als Verfahren wurde das Didesoxynukleotidverfahren (Sanger et al., 1977) mit fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleosidtriphosphaten gewählt und in Form einer Zyklus-Sequenzierung durchgeführt (Slatko, 1994).

Die Sequenzierreaktion wurde mit dem BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (*Applied Biosystems Applera Dtl GmbH*, Darmstadt) realisiert, wobei der im Protokoll vorgeschlagene reduzierte Reaktionsansatz mit 2 µl BigDye Sequencing Buffer, 4 µl Premix und 5 pmol des jeweiligen Primers auf ein Gesamtvolumen von 20 µl angesetzt wurde. Als Template wurden die aufgereinigten PCR-Produkte der Reaktionen aus Tabelle 18 verwendet,

wobei die Menge (in ng) nach Herstellerempfehlung durch Division der Länge des zu sequenzierenden Produktes (in bp) durch den Faktor 20 ermittelt wurde. Die Sequenzierreaktion fand in dem Gradientencycler iCycler 96well (*Bio-Rad Laboratories GmbH*, München) mit dem für das Kit angegebenen Protokoll statt. Die Annealingtemperatur bei allen Reaktionen betrug 55 °C.

Direkt im Anschluss an die Sequenzierreaktion wurde diese gefällt. Hierfür wurde 1/10 des PCR Volumens an 3M Natriumacetat (pH 4,6-5,2) und das 2½fache an EtOH (absolut, unvergällt) zugegeben, der Ansatz gemischt und bei 11000 rpm für 20 Minuten zentrifugiert (Sambrook et al., 1989). Der Überstand wurde daraufhin mittels einer Wasserstrahlpumpe quantitativ abgezogen und das Pellet 2x mit 150 µl 70%igem EtOH gewaschen, bei 11.000 rpm für acht Minuten zentrifugiert und der Überstand mit einer Wasserstrahlpumpe abgezogen. Die Trocknung des Pellets wurde in einem Gradientencyclers (iCycler, *Bio-Rad Laboratories GmbH*, München) bei 50 °C für 15 Minuten durchgeführt und die Proben lichtgeschützt bei -20 °C bis zur Analyse auf dem ABI PRISM® 377 DNA Sequencer (*Applied Biosystems Applera Dtl GmbH*, Darmstadt) aufbewahrt.

3.2.11 Restriktionsspaltung

Der Nachweis der in Tabelle 28 aufgeführten Polymorphismen fand in Form eines Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP) statt (Saiki et al., 1985). Für die Produkte CXCR1/+777 und STAT1/3`UTR wurden die Enzyme aus den Veröffentlichungen von Leyva-Baca et al. (2007) bzw Cobanoglu et al. (2006) eingesetzt. Alle weiteren eingesetzten Restriktionsenzyme wurden mit Hilfe der Internetsoftware NEBcutter 2.0 (*New England Biolabs*, Ipswich, Massachusetts, USA) ausgewählt (Vincze et al., 2003). Wenn möglich, wurden die Enzyme bzw. die Primer für die PCR-Produkte so ausgewählt, dass im Produkt eine weitere nicht variable Schnittstelle für das Enzym vorhanden war, durch welche eine Kontrolle des Restriktionsverdaus ermöglicht wurde (Newton und Graham, 1994). Die PCR-Produkte wurden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen hydrolisiert, wobei je 8 µl PCR-Produkt mit je 0,5 µl Enzym und aq. bidest, sowie mit 1 µl Puffer angesetzt wurden und mit den in Tabelle 28 aufgeführten Bedingungen inkubiert.

Tabelle 28: Mittels RFLP untersuchte SNPs sowie verwendete PCR-Produkte und RFLP-Bedingungen

SNP	PCR-Produkt	Restriktions-enzym	Puffer	°C	Inkubationszeit
<i>CXCR1/Ex1/+777</i>	<i>CXCR1_+777</i>	<i>Bsp1286I</i>	NEBuffer 4	37	16 h
<i>CXCR1/Ex1/+199</i>	<i>CXCR1_Ex1_+199</i>	<i>MnII</i>	Puffer G	37	16 h
<i>CXCR1/5'UTR/-96</i>	<i>CXCR1_5'UTR_-96</i>	<i>TaqI</i>	Puffer TaqI	65	16 h
<i>PIP5K3/Int18/-112</i> <i>PIP5K3/Ex19/+58</i>	<i>PIP5K3_Int18-Ex19</i>	<i>TaaI</i>	Puffer Tango	65	16 h
<i>PIP5K13/Ex19/+792</i>	<i>PIP5K3_Ex19_2N</i>	<i>BveI</i>	Puffer 0*	37	16 h
<i>PIP5K3/Ex26/+69</i>	<i>PIP5K3_Ex26</i>	<i>BfuI</i>	Puffer BfuI	37	16 h
<i>STAT1/3'UTR</i>	<i>STAT1_3'UTR</i>	<i>PagI</i>	Puffer 0	37	16 h

* = Zugabe von 0,2 µl 50x Oligonukleotide

3.2.12 Gelelektrophorese

3.2.12.1 Agarosegelelektrophorese

Kontrolle der PCR-Bedingungen und Mengenschätzung der PCR-Produkte

Zur Kontrolle der PCR Bedingungen wurden 5 µl des PCR-Produkts zusammen mit 2 µl eines Ladepuffers [0,25% (v/v) Bromphenolblau, 0,25% (v/v) Xylencyanol FF, 30% (v/v) Glycerol, 69,5% (v/v) Wasser] auf ein 1,5%iges Agarosegel geladen und die Produkte anschließend durch eine Elektrophorese bei 150 bis 200 V für 60 bis 90 min aufgetrennt. Als Marker diente hierbei die FastRuler™ DNA Ladder, Low Range (*MBI Fermentas GmbH*, St. Leon-Rot). Im Anschluss an die Gelelektrophorese wurde das Gel in Ethidiumbromid gefärbt, die angefärbten Banden unter UV-Licht bei 254 nm sichtbar gemacht (Sambrook et al., 1989) und auf ihre Qualität und Quantität hin beurteilt.

Ebenso wurde auch zur Schätzung der Produktmenge für die Sequenzierung verfahren. Hierfür wurde – anschließend an die Färbung – die Intensität der Bande des PCR-Produkts und die der Bande mit bekannter Konzentration der DNA-Leiter verglichen und so die Konzentration der DNA im PCR-Produkt geschätzt.

RFLP und Tetra Primer-ARMS PCR

Im Anschluss an die Restriktionsspaltung und die allelspezifische PCR wurden die Fragmente auf einem Agarosegel mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Hierfür wurde der gesamte

Ansatz der Restriktionsspaltung mit 2 µl eines Ladepuffers [0,25% (v/v) Bromphenolblau, 0,25% (v/v) Xylencyanol FF, 30% (v/v) Glycerol, 69,5% (v/v) Wasser] versetzt. Der Ansatz der Tetra Primer-ARMS PCR wurde mit je 3µl des oben genannten Ladepuffers gemischt. Im Anschluss daran wurde die gesamte Menge des RFLP-Ansatzes und die Hälfte der Tetra Primer-ARMS PCR auf ein Agarosegel geladen und eine Gelelektrophorese mit anschließender Ethidiumbromidfärbung durchgeführt. Die angefärbten Banden wurden unter UV-Licht bei 254 nm sichtbar gemacht (Sambrook et al., 1989).

3.2.12.2 Polyacrylamidgelelektrophorese

Fragmentlängenanalyse

Die Fragmentlängenanalyse der Mikrosatelliten wurde an einem halbautomatischen Sequenziergerät, dem ABI PRISM[®] 377 DNA Sequencer (*Applied Biosystems Applied Biosystems GmbH, Darmstadt*) mittels lasergestützter Polyacrylamidgelelektrophorese (PAA-Gelelektrophorese) durchgeführt. Durch die Auswahl verschiedener Filter, die nur eine bestimmte Wellenlänge passieren lassen, war es mittels unterschiedlicher Markierung (VIC, NED, 6-FAM) der Rückwärtsprimer möglich, die jeweiligen Multiplex-Ansätze mit mehreren Mikrosatelliten gleichzeitig in einem Slot laufen zu lassen. Die PAA-Gelelektrophorese wurde wie bei Peter (2005) beschrieben durchgeführt.

Sequenzierung

Nach Geräteherstellerangaben wurde ein 0,2 mm dünnes, 5%iges Polyacrylamidgel mit einem Acrylamid:Bisacrylamidverhältnis von 29:1 und 7 M Harnstoff gegossen.

Für die ca. sechs bis acht Stunden andauernde Gelelektrophorese bei 2500 V, 50 mA, 48 W und 51 °C wurden 1,5 bis 2 µl der zuvor mit 4 µl Ladepuffer gelösten Sequenzierprobe auf das Gel geladen. Der Ladepuffer bestand aus 50 mg Blue Dextran 2000, welches durch Ultraschall in 1 ml EDTA (25mM) gelöst und im Verhältnis 5:1 mit Dimethylformamid verdünnt wurde.

Die detektierten Fluoreszenzsignale wurden durch das Programm ABI PRISM[®] DNA Sequencing Analysis (*Applied Biosystem, Foster City, Californien, USA*) in Sequenzsignale umgeschrieben.

3.2.13 Statistische Methoden

3.2.13.1 Genotypen

Die Genotypen der Bullenväter der Familien ADR-MAS 5-7 wurden durch den manuellen Vergleich der Typisierungsergebnisse ihrer Nachkommen bestimmt.

3.2.13.2 Allel- und Genotypfrequenz

Die Allelfrequenz wurde mit dem Computerprogramm CERVUS Version 3.0.3 (*Field Genetics Ltd.*, T. Marshall) berechnet. Die Genotypfrequenz wurde nach Auszählung der Genotypen manuell berechnet.

3.2.13.3 Markerkarte

Die Markerreihenfolge und –positionen bei MARC_USDA (<http://www.marc.usda.gov/genome/cattle/cattle.html>) basieren auf einer Kopplungsanalyse. Zur Festlegung der genauen populationspezifischen Markerpositionen wurde in einem ersten Schritt die bei MARC_USDA angegebene Markerreihenfolge überprüft. Hierfür wurde die Sequenz der Mikrosatelliten in der bovinen Genomsequenz Build 3.1 geladen. Anschließend wurden die Markerabstände basierend auf dieser Reihenfolge mit der Cri-Map-Software (*Washington University School of Medicine*, St. Louis, P. Green St. Louis, Missouri, USA) mit der /BUILD/-Option berechnet.

3.2.13.4 QTL-Analyse

Die QTL-Analyse wurde wie bei Baes et al. (2010) beschrieben durchgeführt.

Die “Linkage Phase” von allen Vätern und ihren Söhnen wurde mit Hilfe des Programmes BIGMAP (Reinsch, 1999), basierend auf den Markergenotypen, geschätzt.

Der Mittelpunkt zwischen zwei Markern wurde als putative QTL-Position konstruiert, wodurch insgesamt 25 putative QTL-Positionen in die Berechnungen mit einfließen.

3.2.13.4.1 Kopplungsgleichgewicht

Das Modell zur Berechnung des Kopplungsgleichgewichts beinhaltet als Zufallsfaktoren sowohl einen polygenetischen Rand-Effekt als auch einen additiven QTL-Effekt. Die eingeschränkte „log likelihood ratio test statistic“ wurde für jede putative QTL-Position berechnet.

3.2.13.4.2 Kopplungsungleichgewicht

Das Kopplungsungleichgewicht wurde mittels zwei verschiedener Modelle mit in die Berechnung des QTL-Bereichs einbezogen. Diese werden im Folgenden beschrieben.

- Aufnahme der Kopplungsungleichgewichtsanalyse mittels Varianzkomponentenanalyse

Für die Berechnung des kombinierten Kopplungsgleich- und -ungleichgewichts wurde eine Varianzkomponentenanalyse nach dem Ansatz von Meuwissen et al. (2002) durchgeführt. Hierfür wurde eine IBD-Submatrix angefertigt, durch welche die Wahrscheinlichkeit der Marker, „identical by descent“ zu sein, mit in die Berechnungen integriert wurde.

- Aufnahme der Kopplungsungleichgewichtsanalyse mittels „Regression on Marker Alleles“

In diesem Ansatz wurde die Signifikanz jedes einzelnen Markers auf die QTL-Kurve getestet. Marker, die ein nominales Signifikanzlevel von 5% aufwiesen, wurden in einem weiteren Modell mit dem Marker (QTL) als fixem Effekt über alle 25 putativen QTL-Positionen untersucht, um so zu bestimmen, wie viel QTL-Varianz durch den Einbezug des einzelnen Markers erklärt werden konnte.

3.2.13.5 Assoziationsanalyse

Im Folgenden sind die unterschiedlichen Modelle für die Durchführung der Assoziationsanalyse erläutert.

3.2.13.5.1 Assoziationsanalyse in einem 20 cM großen, den SNP umschließenden, Fenster

Zur Schätzung des polygenen Effekts aller Gene (außer des QTLs/SNPs), der Effekte des putativen QTLs und des Residualeffekts der Umweltvarianz auf die somatische Zellzahl wurde eine Varianzkomponentenanalyse mit den Genotypen des jeweiligem SNPs als fixem Effekt über alle 3 Laktationen hinweg durchgeführt (Görtz et al., 2009). Die polygenetische Varianz wurde durch den Einbezug eines erweiterten Pedigrees, der die nicht-genotypisierten Vorfahren (n=8073) der genotypisierten Tiere beinhaltet, berücksichtigt. Die kondensierte genetische Verwandtschaftsmatrix wurde für jeden cM eines 20 cM großen, den SNP umschließenden Fensters mit der Fortran 90 software COBRA (Baes und Reinsch, 2007) berechnet.

Das folgende gemischte lineare Modell wurde für die Schätzung der Varianzkomponentenanalyse genutzt und mit Hilfe von ASReml (Gilmour et al., 2006) gerechnet.

$$y_{ijk} = \mu + \text{Genotyp}_i + a_j + g_k + e_{ijk}$$

y_{ijk}	= DYD in der 1., 2. bzw. 3. Laktation
μ	= Mittelwert der Population
Genotyp_i	= fixer Effekt des Genotyps i
a_j	= polygenetischer Randeffect des Tieres j
g_k	= gametischer Randeffect der Gamete k
e_{ijk}	= zufälliger Resteffect

Untersucht wurden – mit Ausnahme des SNPs *PIP5K3/Ex26/+69* – die SNPs, deren Typisierungsergebnisse nicht in die QTL-Kartierung einfließen.

3.2.13.5.2 Einfluss des Genotyps nach Laktationen getrennt

Mit einem weiteren Modell wurde die Beziehung zwischen dem Genotyp und der DYDs in der 1., 2. und 3. Laktation mit der Prozedur ALM–univariat von SPSS Version 15 (*SPSS Inc.*, Chicago, USA) aller untersuchten SNPs berechnet.

$$y_i = \mu + \text{Genotyp}_i + e_i$$

y_i	= DYD in der 1., 2. bzw. 3. Laktation
μ	= Mittelwert der Population
Genotyp_i	= fixer Effekt des Genotyps i
e_i	= zufälliger Resteffect

3.2.13.5.3 Interaktion zwischen Genotyp und Familie in den heterozygoten Familien

Die Signifikanz der Interaktion zwischen Genotyp und Familie wurde mit der Prozedur ALM–univariat von SPSS Version 15 (*SPSS Inc.*, Chicago, USA) untersucht. Das Auswertungsmodell berücksichtigte die fixen Effekte von Genotyp, Familie und der Interaktion zwischen Genotyp und Familie.

$$y_{ij} = \mu + \text{Genotyp}_i + \text{Familie}_j + \text{Genotyp*Familie}_{ij} + e_{ij}$$

μ	= Mittelwert der Population
y_{ij}	= DYD in der 1., 2. bzw. 3. Laktation
Genotyp_i	= fixer Effekt des Genotyps
Familie_j	= fixer Effekt der Familie
$\text{Genotyp*Familie}_{ij}$	= fixer Effekt der Interaktion zwischen Genotyp und Familie
e_{ij}	= zufälliger Resteffect

4 Ergebnisse

4.1 Mikrosatellitenanalyse

4.1.1 Typisierbarkeit der Mikrosatelliten

Insgesamt wurden 25 Mikrosatelliten für die Eingrenzung des QTL-Bereichs auf BTA02 typisiert. Alle Mikrosatelliten, mit Ausnahme von *MNB48* und *BMS1264*, ließen sich mit vereinzelt Ausfällen zuverlässig typisieren (Tabelle 29). Trotz einzelner Amplifizierung des Mikrosatelliten *MNB48* und Austestung der PCR mit unterschiedlichen Adjuvanzen zeigte dieser Marker insgesamt 46 Typisierungsausfälle. Am Genort *BMS1264* ließen sich insgesamt 39 Proben nicht zuverlässig typisieren. Bei der Typisierung des Mikrosatelliten *ILSTS098* mit den Primern *ILSTS098_F/R* wurden insgesamt sechs verschiedene homozygote Genotypen innerhalb einer Familie gefunden. Durch die Auswahl neuer Primer (*ILSTS098_n_F/R*) konnte jedoch auch dieser Marker korrekt typisiert werden, welcher Anstelle des ursprünglichen Primers in die späteren Berechnungen einfließt.

Tabelle 29: Typisierungsergebnisse der untersuchten Mikrosatelliten

Marker	Anzahl erfolgreiche Typisierungen (n=)	Fehlende Typisierungen (n=)	Ausfallrate in %
<i>BM1223</i>	1117	4	0,36
<i>BMS1264</i>	1082	39	3,48
<i>BMS1837</i>	1115	6	0,54
<i>BMS1987</i>	1109	12	1,07
<i>BMS353</i>	1117	4	0,36
<i>BMS778</i>	1112	9	0,80
<i>CSSM53</i>	1114	7	0,62
<i>DIK1155</i>	1118	3	0,27
<i>DIK2729</i>	1117	4	0,36
<i>DIK2862</i>	1109	12	1,07
<i>DIK4025</i>	1116	5	0,45
<i>DIK4369</i>	1108	13	1,16
<i>DIK4673</i>	1103	18	1,61
<i>DIK4676</i>	1112	9	0,80
<i>DIK4726</i>	1116	5	0,45
<i>DIK4880</i>	1107	14	1,25
<i>DIK4972</i>	1109	12	1,07
<i>DIK5023</i>	1120	1	0,09

Tabelle 29 (Fortsetzung)

Marker	Anzahl erfolgreiche Typisierungen (n=)	Fehlende Typisierungen (n=)	Ausfallrate in %
<i>DIK5133</i>	1110	11	0,98
<i>ILSTS098</i>	1118	3	0,27
<i>ILSTS82</i>	1117	4	0,36
<i>MM8D3</i>	1116	5	0,45
<i>MNB48</i>	1075	46	4,10
<i>TGLA110</i>	1119	2	0,18
<i>TGLA226</i>	1119	2	0,18

4.1.2 Allelfrequenz der Mikrosatelliten

Tabelle A 4 gibt die für die untersuchten Mikrosatelliten identifizierten Allele sowie deren Frequenz im untersuchten Tiermaterial wieder.

4.1.3 Genotypen der Väter

Die Genotypen der Bullenväter sind der Tabelle A 5 im Anhang zu entnehmen.

4.1.4 Karten- und Markerinformation

Für die Kartierung des QTLs für SCS auf BTA02 wurden zusätzlich zu den 25 beschriebenen Mikrosatellitenmarkern die Typisierungsdaten der SNPs *STAT1/3`UTR* und *CXCR1/+777* verwendet. Die Mikrosatellitenmarker hatten durchschnittlich 6,04 Allele mit einem Maximum von 11 Allelen für den Marker *MNB48* und einem Minimum von 3 Allelen für den Marker *BMS1264*. Nach der Positionsrechnung ergab sich inklusive der beiden SNP ein durchschnittlicher Markerabstand von 3,14 cM mit einem Maximum von 9,6 cM zwischen den Markern *BMI223* und *BMS1987* und einem Minimum von 0,01 cM zwischen den Markern *DIK4673* und *ILSTS098*. Für die Marker *DIK2862* und *BMS778* wurde im Vergleich zu der Reihenfolge der MARC_USDA-Karte eine umgekehrte Reihenfolge festgestellt. Für den Marker *DIK4676* konnte keine Position in der Markerkarte festgelegt werden, weshalb die Typisierungsdaten dieses Markers nicht mit in die QTL-Berechnungen einfluss. Der PIC-Wert des Markers betrug 0,082 und die Heterozygotierate (HZ) 8,6 %. Die Markerreihenfolge, die Markerposition im QTL-Bereich, die Anzahl der Allele pro Marker, die Anzahl der informativen Meiosen, der polymorphe Informationsgehalt sowie die Heterozygotierate sind in Tabelle 30 zu sehen.

ERGEBNISSE

Tabelle 30: Markerinformation der untersuchten Mikrosatelliten sowie der SNPs *STAT1/3`UTR* und *CXCR1/+777*. Die Marker sind in ihrer berechneten Reihenfolge angegeben. Die Markerposition ist im Bezug auf die Position im untersuchten QTL-Bereich angegeben.

Marker	Position (cM)	Anzahl Allele	Informative Meiosen	PIC	HZ (%)	Intervall* (Nr.)
<i>DIK2729</i>	0,00	4	279	0.375	60	1
<i>DIK4025</i>	2,00	8	60	0.217	20	2
<i>DIK4673</i>	7,30	6	206	0.619	40	3
<i>ILSTS098</i>	7,31	9	230	0.580	60	4
<i>STAT1/3`UTR</i>	10,40	2	38	0.357	40	5
<i>ILSTS82</i>	11,50	7	770	0.651	90	6
<i>BMS1264</i>	13,10	3	710	0.584	90	7
<i>DIK4369</i>	15,60	6	318	0.629	70	8
<i>BMS353</i>	16,00	5	679	0.582	80	9
<i>DIK4972</i>	16,90	5	474	0.526	80	10
<i>MNB48</i>	18,80	11	531	0.611	80	11
<i>BMS1837</i>	22,70	6	487	0.522	80	12
<i>DIK2862</i>	28,50	10	498	0.541	80	13
<i>BMS778</i>	31,10	8	803	0.672	90	14
<i>CSSM53</i>	35,00	5	471	0.532	70	15
<i>DIK5133</i>	37,00	7	714	0.624	90	16
<i>TGLA226</i>	40,60	5	485	0.599	70	17
<i>DIK4880</i>	41,60	5	476	0.561	70	18
<i>DIK4726</i>	48,60	7	95	0.307	30	19
<i>TGLA110</i>	50,80	5	267	0.340	30	20
<i>CXCR1/+777</i>	51,80	2	473	0.374	90	21
<i>MM8D3</i>	52,70	7	408	0.552	50	22
<i>BM1223</i>	56,80	6	231	0.306	30	23
<i>BMS1987</i>	66,40	4	284	0.358	40	24
<i>DIK5023</i>	74,70	4	496	0.547	80	25
<i>DIK1155</i>	81,60	4	330	0.434	50	

* = Zwischen zwei Markern befindliches Intervall, PIC = Polymorphism Information Content, HZ = Heterozygotierate

4.1.5 QTL-Analyse

Wie in Kapitel 3.2.13.4 beschrieben wurden sowohl eine Kopplungsanalyse als auch eine kombinierte Analyse mit Kopplungsgleich- und -ungleichgewicht sowie eine Regressionsanalyse mit einzelnen Markern durchgeführt. Durch die Anwendung des Kopplungsgleichgewichts konnte das Konfidenzintervall des QTL für SCS auf BTA02 von 128 cM auf 38 cM reduziert werden.

4.1.5.1 Kopplungsgleichgewicht mittels Varianzkomponentenschätzung

Die Ergebnisse des RLRTs (*Restricted Likelihood Ratio Test*) sind in Abbildung 5a dargestellt. Das RLRT-Profil zeigt die Ergebnisse der Analyse eines Modells, welches einen QTL für den SCS und einen polygenetischen Randeffekt beinhaltete, gegenüber einem Modell mit nur einem polygenetischen Randeffekt.

Die *Likelihood*-Kurve erreichte ein Maximum von 20,29 im Markerintervall 13 zwischen den Markern *DIK2862* und *BMS778*. 22 Positionen waren auf einem chromosomweiten Level signifikant, 15 Positionen erreichten auf einem genomweiten Level eine Signifikanz und 12 Positionen lagen in einem 1-LOD drop Konfidenzintervall mit globalem Maximum.

4.1.5.2 Kopplungsungleichgewicht mittels Varianzkomponentenschätzung

Abbildung 5b) stellt das *Likelihood*-Profil der LD-Analyse dar. Die gesamten Werte lagen auf einem sehr geringen Level. Die Analyse zeigte, dass zwischen den einzelnen Markern kein LD vorhanden ist.

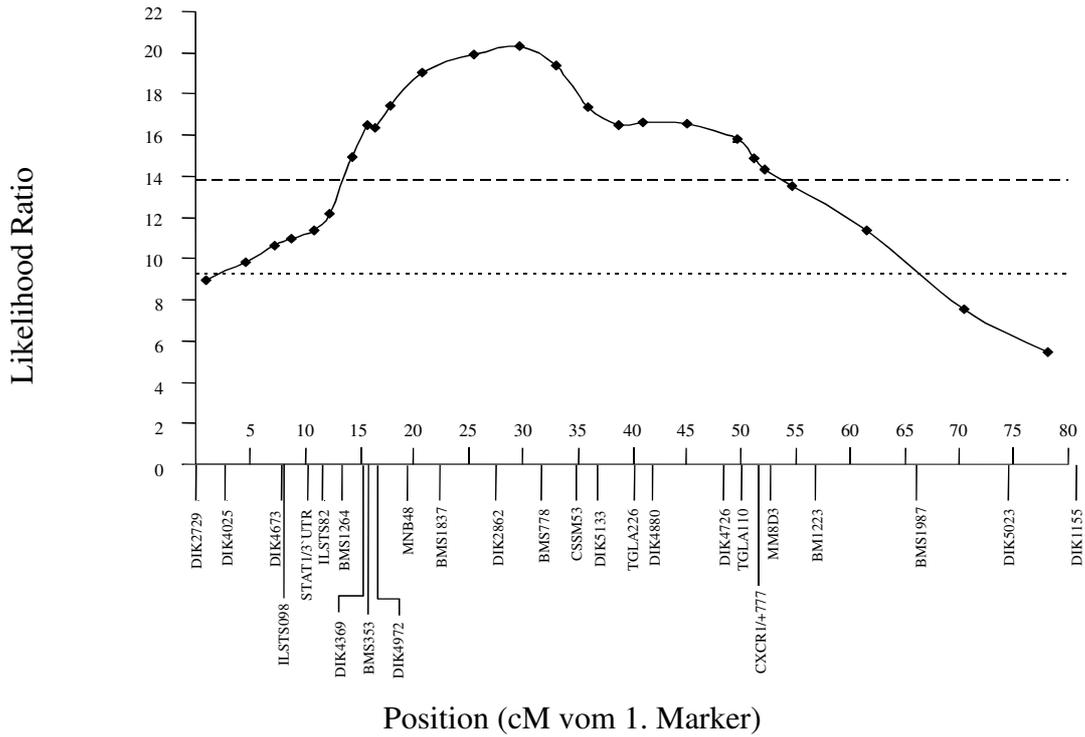
4.1.5.3 Kombinierte LDLA-Varianzanalyse

Die kombinierte LDLA-Analyse (Abbildung 6) ergab zwei Hauptpeaks zwischen den Markern *MNB48* und *TGLA226* sowie den Markern *DIK4880* und *DIK4726*. Der Peak zwischen den Markern *MNB48* und *TGLA226* war sowohl chromosomweit als auch genomweit signifikant. Außerdem erreichten zwei weitere Peaks die chromosomweite Signifikanzgrenze (zwischen *ILSTS098* und SNP *STAT1/3`UTR* sowie *BM1223* und *BMS1987*).

Die beschriebenen Hauptpeaks befanden sich in der durch die LA-Analyse erhaltenen signifikanten Region. Das RLRT der kombinierten LDLA-Varianzanalyse war an allen Positionen jedoch geringer als das der LA-Analyse.

ERGEBNISSE

a)



b)

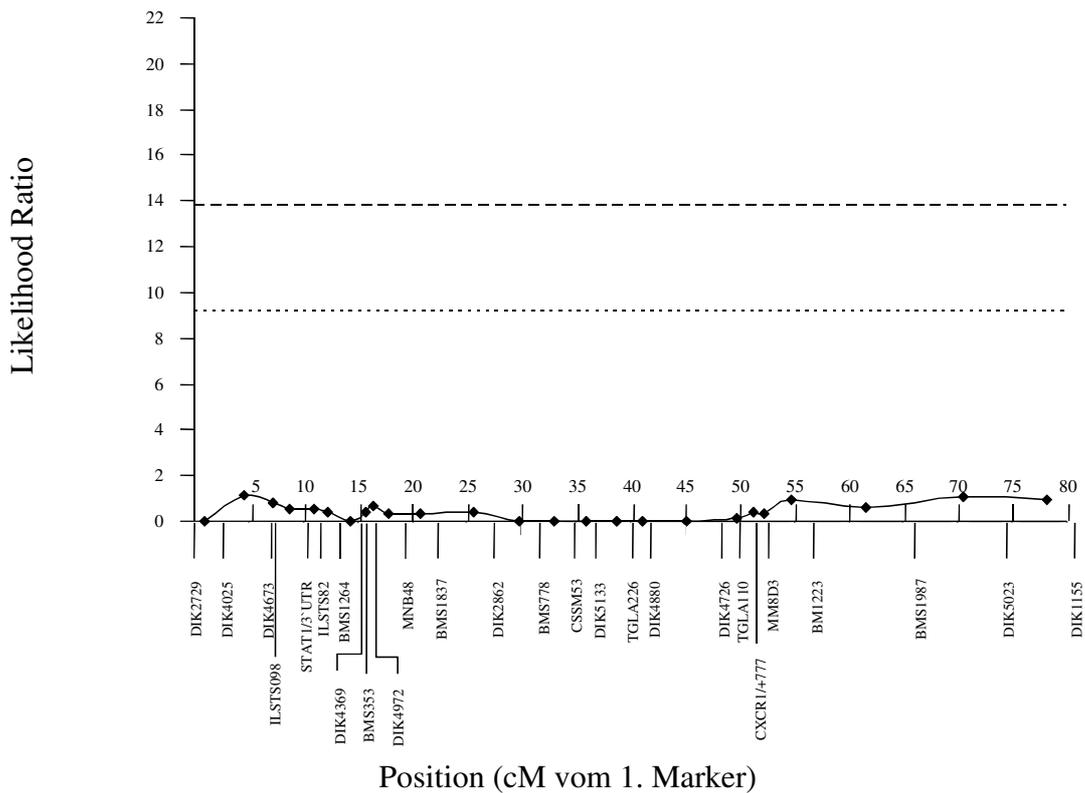


Abbildung 5 a) und b): Restricted log-likelihood ratio der Kopplungsanalyse mit Kopplungsgleichgewicht (a) und Kopplungsungleichgewicht (b). Die putative QTL-Position innerhalb eines Markerintervalls ist jeweils mit einem (♦) angegeben. Die obere gestrichelte horizontale Linie gibt den genomweit-signifikanten, die untere den chromosomweit-signifikanten Schwellenwert an.

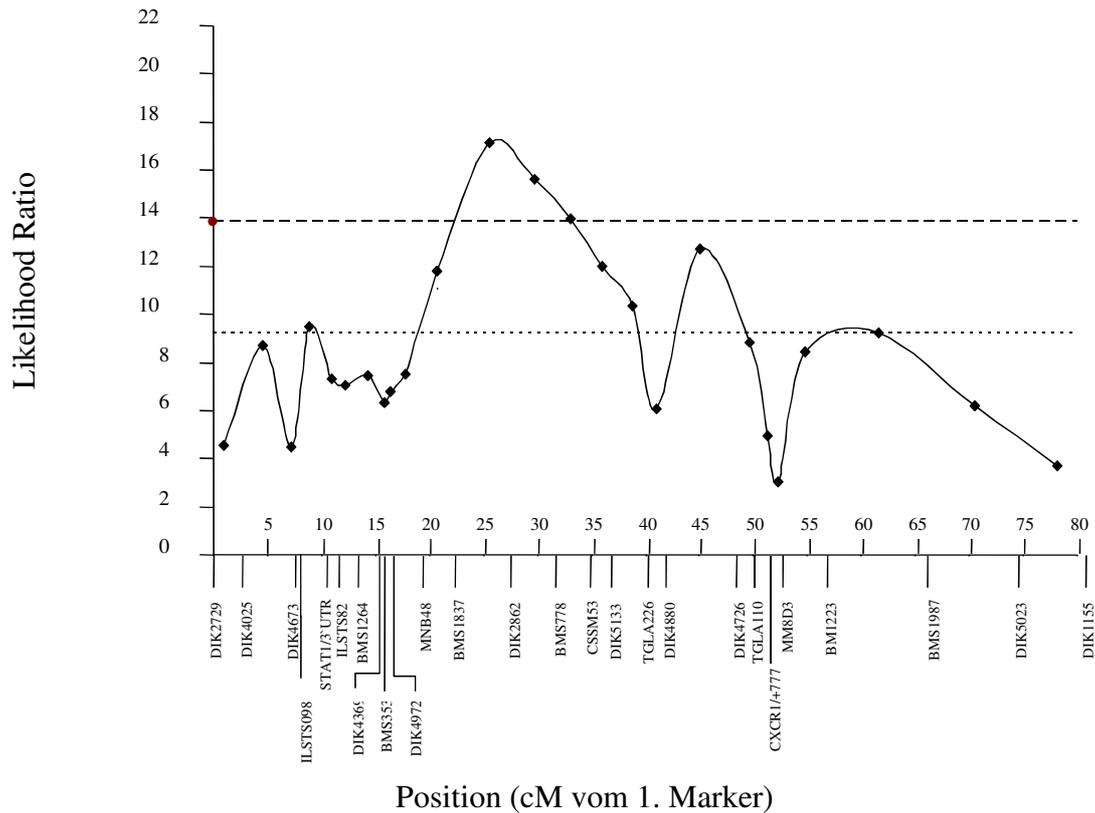


Abbildung 6: Restricted log-likelihood ratio der Kopplungsanalyse mit kombiniertem Kopplungsgleich- und -ungleichgewicht. Die putative QTL-Position innerhalb eines Markerintervalls ist jeweils mit einem (◆) angegeben. Die obere gestrichelte horizontale Linie gibt den genomweit-signifikanten, die untere den chromosomweit-signifikanten Schwellenwert an.

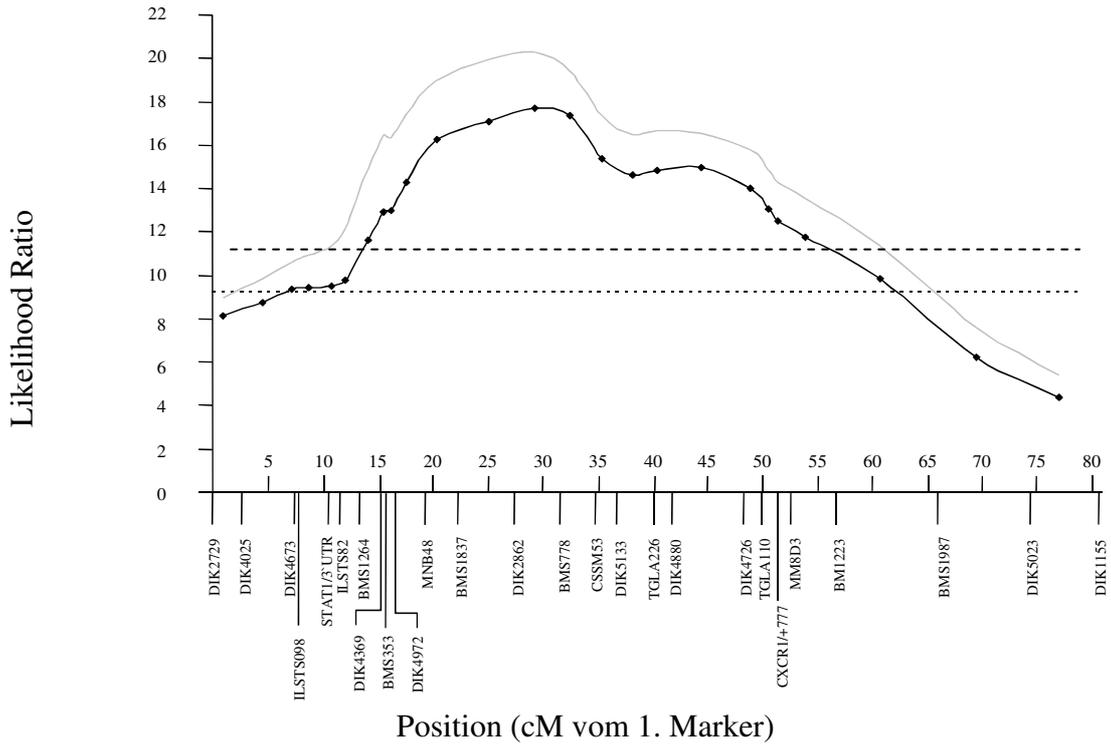
4.1.5.4 Kombinierte LDLA-Regressionsanalyse

Zwei der Marker (*ILSTS098* $p \leq 0,05$ und *BMS778* $p \leq 0,01$) erreichten bei der Regressionsanalyse ein nominales Signifikanz-Level von mindestens 5%, woraufhin für jeden der beiden Marker eine Regressionsanalyse über alle 26 QTL-Positionen durchgeführt wurde.

Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abbildung 7 a und b dargestellt. Zu sehen ist die verringerte Likelihood-Ratio der QTL-Varianz nach Einbezug des jeweiligen Markers im Vergleich zur QTL-Varianz durch LA-Analyse. Durch den Marker *ILSTS098* kam es zu keiner signifikanten Veränderung der Likelihood-Ratio, wohingegen der Marker *BMS778* zu einer deutlichen, signifikanten Abnahme der QTL-Varianz führte.

ERGEBNISSE

a)



b)

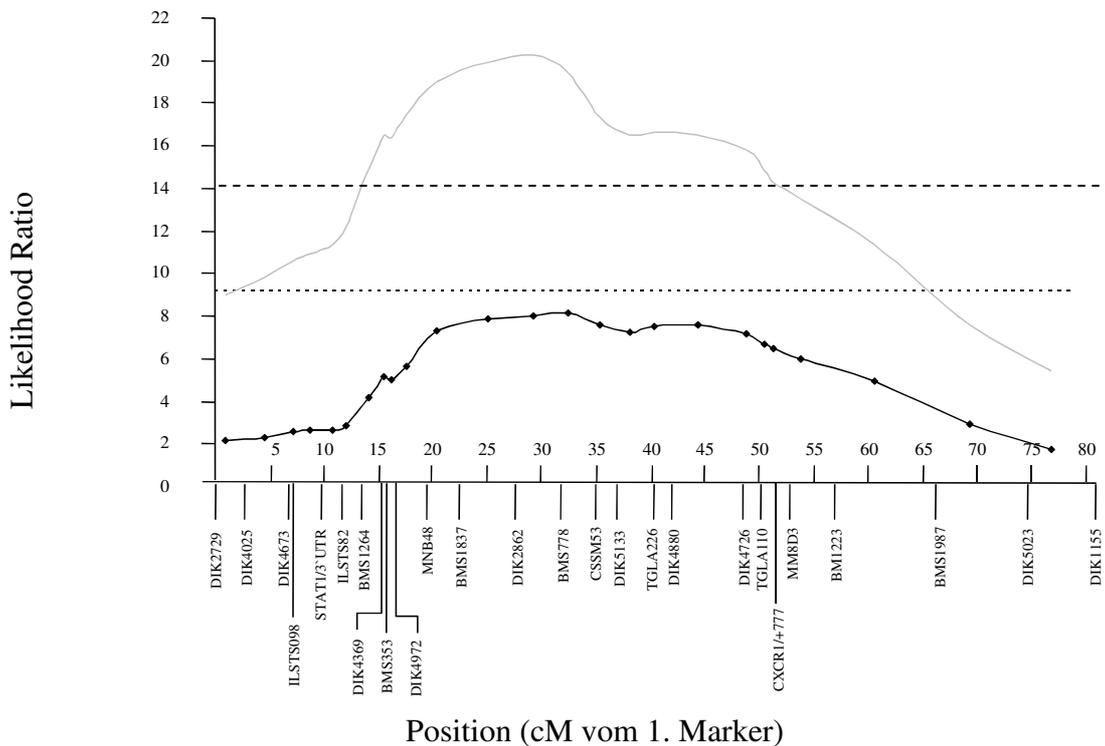


Abbildung 7: Restricted log-likelihood Profile der Kopplungsanalyse mit Regression des additiven Markereffektes in den Familien: *ILSTS098* (a) und *BMS778* (b). Die grauen Kurven zeigen die Kopplungsanalyse ohne Markerregression zur Verdeutlichung der Auswirkung des jeweiligen Markers auf die QTL-Varianz. Die putative QTL-Position innerhalb eines Markerintervalls ist jeweils mit einem (♦) angegeben. Die obere gestrichelte horizontale Linie gibt den genomweit-signifikanten, die untere den chromosomweit-signifikanten Schwellenwert an.

4.2 Kandidatengene

Tabelle 31 gibt alle durch Sequenzierung nachgewiesenen SNPs wieder. Die bereits in anderem Tiermaterial untersuchten und publizierten SNPs *CXCR1/5`UTR/-1768*, *CXCR1/+777* und *STAT1/3`UTR* wurden nicht in die Tabelle aufgenommen.

Tabelle 31: In den untersuchten Genen *CXCR1*, *IGFBP2* und *PIP5K3* durch Sequenzierung nachgewiesene SNPs

Gen	Lokalisation im Gen	Nukleotidaustausch
CXCR1	5`UTR, Position -96	A/G
	Exon1, Position +199	T/C
IGFBP2	Intron 1, Position +55	A/G
	Intron 3, Position+167	C/G
	Intron 3, Position+193	C/G
	Intron 3, Position+146	G Insertion
PIP5K3	Intron18, Position -112	A/G
	Exon XIX, Position+58	A/G
	Exon XIX, Position+792	A/G
	Exon XXVI, Position+69	T/C

4.2.1 STAT1

4.2.1.1 PCR und Sequenzierung

Die Sequenzierung des Amplifikats *STAT1_3`UTR* zeigte, dass es sich bei dem Produkt um die zu amplifizierende Sequenz handelte. Der innerhalb dieses Produktes an Position 204 beschriebene Polymorphismus *STAT1/3`UTR* konnte mittels der Sequenzierung innerhalb der Rasse Dt. Holstein bestätigt werden.

4.2.1.2 Darstellung des SNPs *STAT1/3`UTR* mittels RFLP

Der SNP *STAT1/3`UTR* wurde mit dem Enzym *PagI* dargestellt. An Position 262 des PCR-Produktes befand sich eine Kontrollschnittstelle. Neben dieser schnitt das Restriktionsenzym bei Vorhandensein der Base C an Position 203, bei Vorhandensein der Base T hingegen nicht. Beide Schnittstellen sind in Abbildung 8 in der Sequenz des PCR-Produkts *STAT1_3`UTR* markiert.

ERGEBNISSE

```

1  TAGCCTCAAGTTTGCCAGTGGCCTTGCCTGTGAAATAGTGCAAAGCTGTCCTGTATCTGGGCA
63 GAGGATAAAAAGTTATGTGTGTTATTATATTTTTCCACACTGGCCATTGAAAAC TAAAGATTCT
125 CTTTCTTGGGAGAATTAGCTTTTTGGTATGGCTTTATGATGCTGGCTAATATCAATAGAAGGA
      Position 203
187 AGTAAACTTTACAAATTCATGAGTAGTATCTTCCATTTTCAGCTTTAATACCAAAGTTGAATA
      Position 262
249 TATTCTGCCTTCATCATGAAATTGAAGTTAGTAAATGAAACTGTCTTACAGTTCTATCAAG
311 GGAGCC
  
```

Abbildung 8: Sequenz des PCR-Produktes *STAT1_3'UTR* mit der Base C an Stelle des Polymorphismus *STAT1/3'UTR*. Die Position des Polymorphismus ist grau hinterlegt. Die Primersequenzen sind fettgedruckt. Die Erkennungssequenzen des Enzyms *PagI* sind unterstrichen und die Schnittstellen des Enzyms mit einem Pfeil markiert.

Die Fragmente von 262 bp für Allel T und 203 bp für Allel C wurden auf einem 3,5 %igen Agarosegel bei 350 V für ca. 1,5 h aufgetrennt. Die Darstellung der Fragmente ist in Abbildung 9 zu sehen. Die für die Typisierung irrelevanten Fragmente von 59 und 54 bp sind auf Grund ihrer geringen Größe und der daraus resultierenden geringen Fluoreszenz nicht demonstriert.

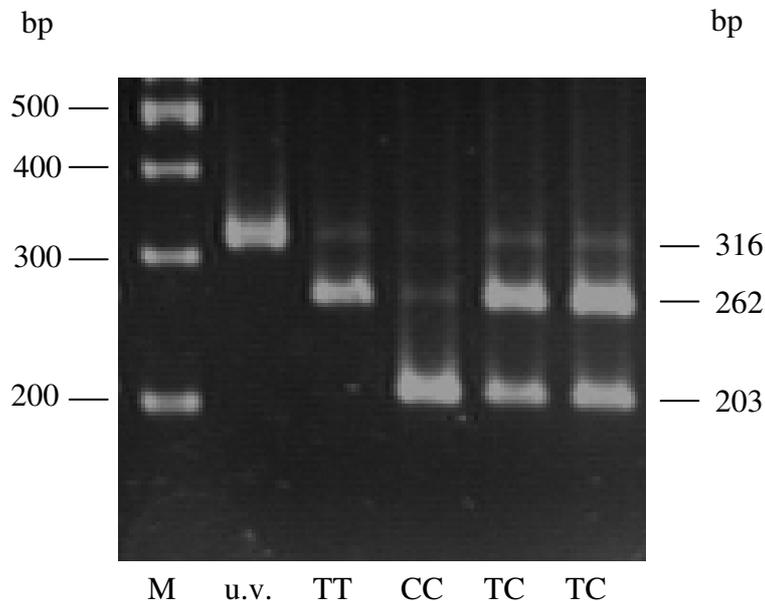


Abbildung 9: Darstellung der Genotypen TT, CC und TC des SNPs *STAT1/3'UTR* mittels PCR-RFLP-Analyse mit dem Enzym *PagI* und anschließender Agarosegelelektrophorese

M = Marker

u.v. = unverdautes PCR-Produkt

4.2.2 CXCR1

4.2.2.1 PCR und Sequenzierung

CXCR1_Ex1

Für die Sequenzierung des Produktes *CXCR1_Ex1* konnte sowohl für den Vorwärts- als auch für den Rückwärtsprimer eine Sequenzierreaktion etabliert werden. An Stelle -96 innerhalb der 5`UTR konnte ein Polymorphismus der Basen A und G festgestellt werden (Abbildung 10). Außerdem wurde an Position 199 des Exons I ein weiterer Polymorphismus detektiert, bei welchem es zu einem Austausch der Base T durch die Base C kommt (Abbildung 11).

a) <i>CXCR1/5`UTR/-96</i>		Position -96
		↓
3663_01	TTGTGGGAGGGGTTTGAGGATGAGTTTGAAAATTACAGCGGCACGCCACCCACAGAAGAC	
3437_01A.....	

Abbildung 10: Darstellung des Polymorphismus *CXCR1/5`UTR/-96* mittels eines Sequenzausschnitts des PCR-Produkts *CXCR1_Ex1*

Tier 3663_01: homozygot G
 Tier 3437_01: homozygot A

<i>CXCR1/Ex1/+199</i>		Position 199
		↓
3437_01	TTCGGCACACCCCTGTGCAAGGTGGYCTCACTCCTGAAGGAAGTGAAGTCTACAGCGGT	
3663_01C.....	
3256_01T.....	

Abbildung 11: Ansicht des Polymorphismus *CXCR1/Ex1/+199* mittels eines Sequenzausschnitts des PCR-Produkts *CXCR1_Ex1*

Tier 3437_01: heterozygot T und C (Y)
 Tier 3663_01: homozygot C
 Tier 3256_01: homozygot T

CXCR1_+777

Die Sequenzierung des Amplifikats *CXCR1_+777* zeigte, dass es sich bei dem Produkt um die zu amplifizierende Sequenz handelte. Der innerhalb dieses Produktes beschriebene Polymorphismus konnte mittels Sequenzierung innerhalb der Rasse Dt. Holstein bestätigt werden.

4.2.2.2 Darstellung des SNPs *CXCR1/5`UTR/-96* mittels RFLP

Der SNP *CXCR1/5`UTR/-96* wurde durch einen RFLP mit dem Enzym *TaqI* dargestellt. Das mittels der Primer (*CXCR1_5`UTR_-96_F+R*) amplifizierte 159 bp große Produkt wurde durch den Einbau der künstlichen Schnittstelle an Position 23 bei Vorhandensein der Base A am Polymorphismus geschnitten. Die Schnittstelle des Enzyms innerhalb des PCR-Produkts ist in Abbildung 12 gezeigt. Bei einem für Allel G homozygoten Tier entstand durch den Verdau somit das Fragment 159, bei einem für A homozygoten Tier die Fragmente 136 und 23.

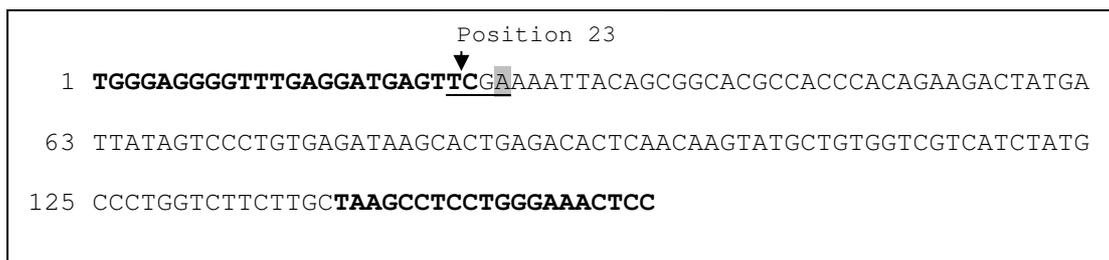


Abbildung 12: Sequenz des PCR-Produktes *CXCR1_5`UTR_-96* mit der Base A an Stelle des Polymorphismus *CXCR1/5`UTR/-96*. Die Position des Polymorphismus ist grau hinterlegt. Die Erkennungssequenz des Enzyms *TaqI* ist unterstrichen, die Schnittstelle des Enzyms ist mit einem Pfeil markiert. Die Primersequenzen sind fettgedruckt. Letzte Base des Vorwärtsprimers ist die mit Hilfe des Primers eingebaute Base zur Erschaffung der künstlichen Schnittstelle (Kapitel 2.2.8.1.1).

Die Fragmente wurden auf einem 3,5%igen Agarosegel bei 250 V für ca. 2 h aufgetrennt (Abbildung 13). Das für die Typisierung irrelevante 23 bp große Produkt ist auf Grund seiner geringen Größe und der daraus resultierenden geringen Fluoreszenz nicht dargestellt.

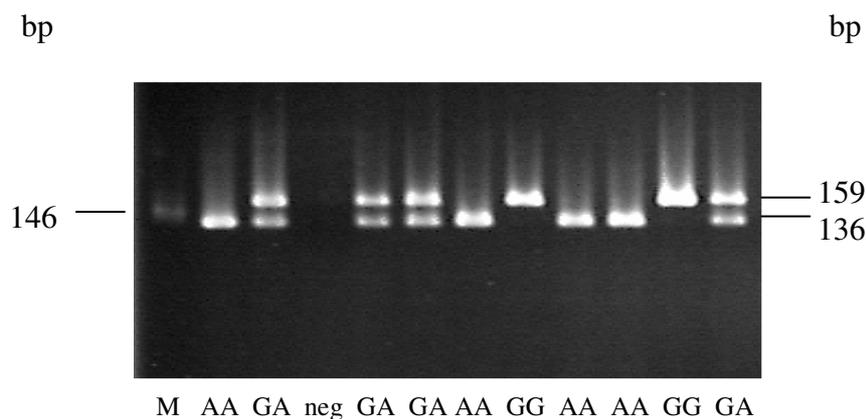


Abbildung 13: Nachweis der Genotypen AA, GG und GA des SNPs *CXCR1/5`UTR/-96* durch PCR-RFLP-Analyse mit dem Enzym *TaqI* und anschließender Agarosegelelektrophorese
 M = Marker
 neg = Negativprobe

4.2.2.3 Darstellung des SNPs *CXCR1/5`UTR/-1768* mittels Tetra-Primer ARMS PCR

Der Nachweis des SNPs *CXCR1/5`UTR/-1768* erfolgte mittels Tetra-Primer ARMS-PCR. Abbildung 14 zeigt die durch die Auswahl der allelspezifischen Primer entstehenden Produktgrößen. Bei Vorhandensein der Base A an Stelle -1768 in der 5`UTR bindet der innere Rückwärtsprimer und bildet zusammen mit dem äußeren Vorwärtsprimer ein 280 bp großes Produkt. Beim Vorkommen der Base T bindet hingegen der innere Vorwärtsprimer und bildet ein 187 bp großes Produkt mit dem äußeren Rückwärtsprimer. Durch die beiden äußeren Primer wird ein 410 bp großes Produkt amplifiziert.

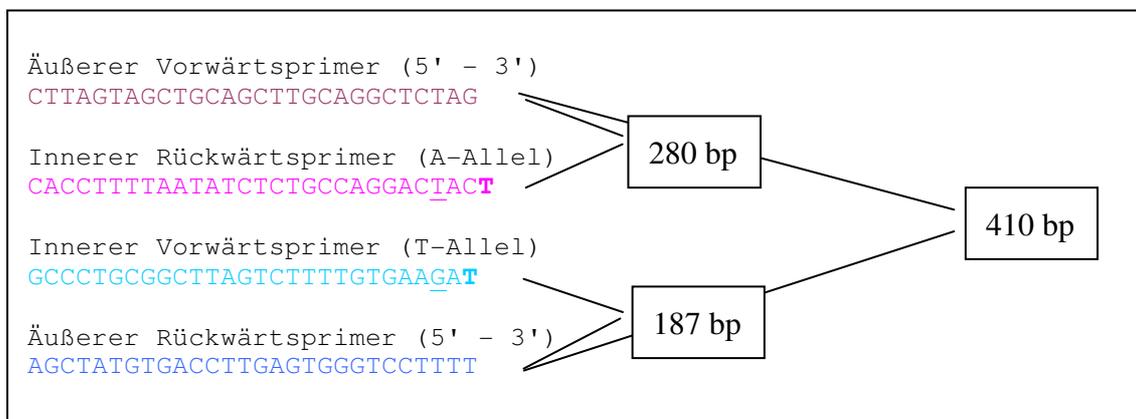


Abbildung 14: Primer der Tetra-Primer ARMS-PCR zur Darstellung des SNPs *CXCR1/5`UTR/-1768*, sowie Produktgrößen der PCR-Produkte. Unterstrichen sind die beiden Mismatchstellen der inneren Primer, fettgedruckt die beiden allelspezifischen Basen am 3`-Ende der inneren Primer. Alle Primer sind vom 5`- zum 3`-Ende angegeben.

Die ausgewählten Primer sind zur Verdeutlichung in Abbildung 15 ober- bzw. unterhalb der Sequenz des Kontrollfragments aus den äußeren Primern dargestellt. Der Polymorphismus *CXCR1/5`UTR/-1768* wurde in der Sequenz grau hinterlegt. Um die allelspezifische Bindung des jeweiligen Primers zu verdeutlichen, wurde an der allelspezifischen Primerbindungsstelle die jeweilige, dem Primer entsprechende, Base grau hinterlegt.

ERGEBNISSE



Abbildung 15: Sequenz des Kontrollfragments der äußeren Primer von *CXCR1/5`UTR/-1768*. Die über bzw. unter der Sequenz angegebenen Oligonukleotidesequenzen stellen die für die allelspezifische PCR ausgewählten Primer dar (siehe auch Abbildung 14). Die Stelle des Polymorphismus ist in der Sequenz grau hinterlegt. In den Oligonukleotiden ist die jeweilige Base, durch die es an der Position des Polymorphismus zu einer allelspezifischen Bindung des entsprechenden Primers kommt, grau hinterlegt. Unterstrichen sind die für eine Verbesserung der Bindungsspezifität sorgenden Mismatchstellen drei Basen vor dem 3` bzw. 5`-Ende der Primer. 1) = äußerer Vorwärtsprimer, 2) = innerer Vorwärtsprimer, 3) = innerer Rückwärtsprimer reverse und complement und 4) = äußerer Rückwärtsprimer reverse und complement

Die PCR-Produkte konnten auf einem 2%igen Agarosegel bei 250 V für ca. 2 h aufgetrennt werden (Abbildung 16).

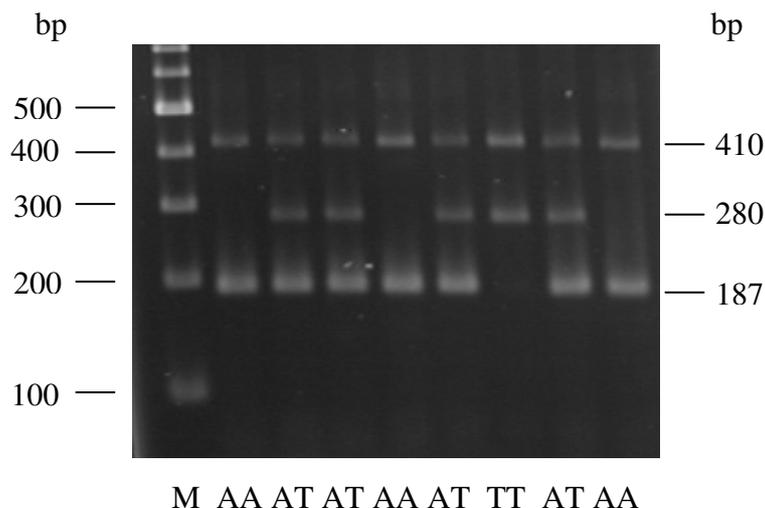


Abbildung 16: Darstellung der Genotypen AA, TT und AT des SNPs *CXCR1/5`UTR/-1768* mittels Tetra-Primer ARMS-PCR und anschließender Agarosegelelektrophorese
M = Marker

4.2.2.4 Darstellung des SNPs *CXCR1/Ex1/+199* mittels RFLP

Der SNP *CXCR1/Ex1/+199* wurde durch einen PCR-RFLP mit dem Enzym *MnlI* dargestellt. Die hierfür ausgewählten Primer (*CXCR1_Ex1_+199_F+R*) amplifizierten ein 264 bp großes Produkt, in dem sich neben der durch die Base C hervorgerufenen Schnittstelle an Position 83 eine weitere Schnittstelle an Position 35 als Kontrollschnittstelle befand (Abbildung 17). Für die Darstellung der Base T an Position +199 im Exon I resultierten somit Fragmente der Größe 35 und 229 bp. Bei Vorhandensein der Base C an eben dieser Stelle schnitt das Enzym zusätzlich an Stelle 83 des PCR-Produktes, wodurch Fragmente der Größen 35, 48 und 181 entstanden.

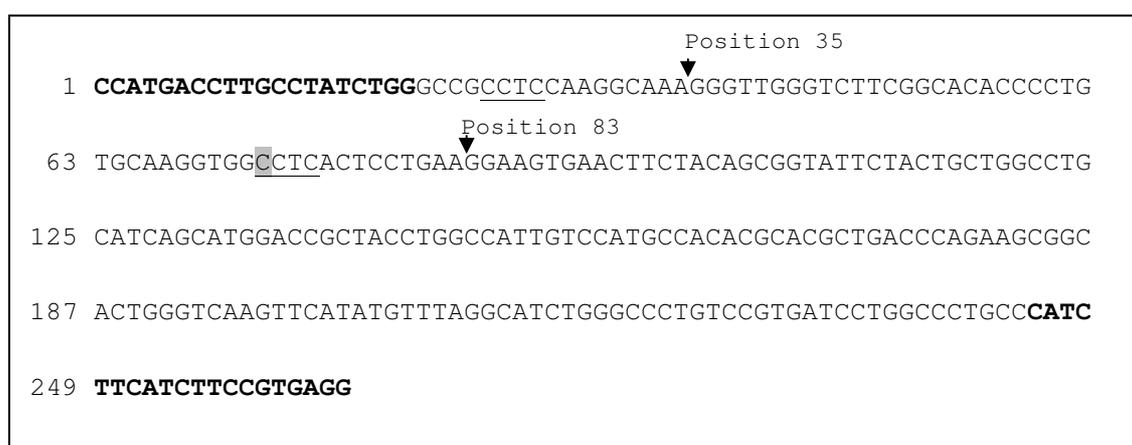


Abbildung 17: Sequenz des PCR-Produktes *CXCR1_Ex1_+199*. Die Position des Polymorphismus *CXCR1/Ex1/+199* ist grau hinterlegt. Erkennungssequenzen des Enzyms *MnlI* sind unterstrichen, Schnittstellen des Enzyms sind mit einem Pfeil markiert. Die Primersequenzen sind fettgedruckt.

Die Produkte der PCR-RFLP-Analyse konnten auf einem 3,5 %igen Agarosegel bei 250 V für ca. 3 h mittels Gelelektrophorese aufgetrennt werden (Abbildung 18). Die für die Typisierung irrelevanten Fragmentgrößen 35 und 48 bp wurden auf Grund ihrer geringen Fluoreszenz nicht dargestellt.

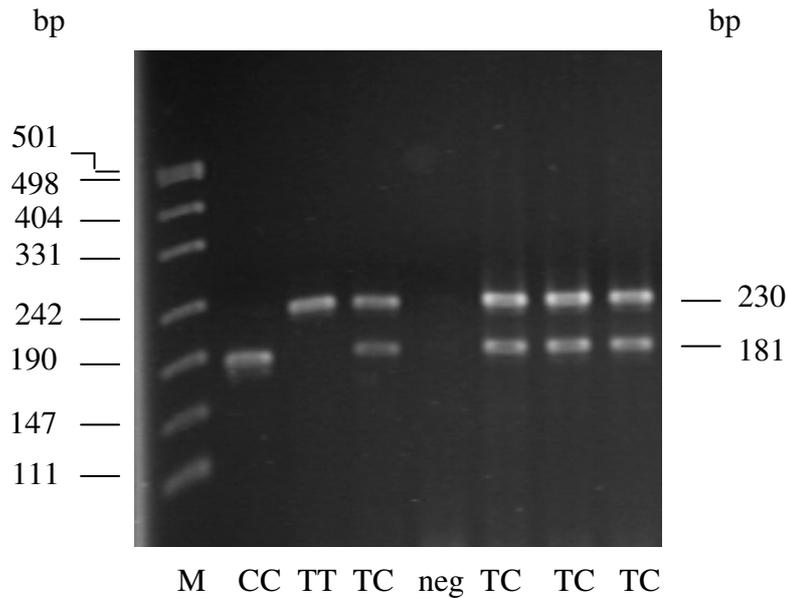


Abbildung 18: Darstellung Genotypen CC, TT, TC des SNPs *CXCR1/Ex1/+199* durch PCR-RFLP-Analyse mit dem Enzym *MnlI* und anschließender Agarosegelelektrophorese
M = Marker
neg = Negativprobe

4.2.2.5 Darstellung des SNPs *CXCR1/+777* mittels RFLP

Der SNP *CXCR1/+777* wurde durch einen RFLP des PCR- Produktes *CXCR1_+777* mit dem Enzym *BspI268I* dargestellt. In Abbildung 19 sind die Erkennungssequenz und die Schnittstellen des Enzyms *BspI268I* in der Sequenz des Produktes *CXCR1_+777* gekennzeichnet. Das eingesetzte Restriktionsenzym schnitt an der Stelle des SNPs, wenn hier die Base C vorlag. Zusätzlich war eine Kontrollschnittstelle an Position 221 vorhanden.

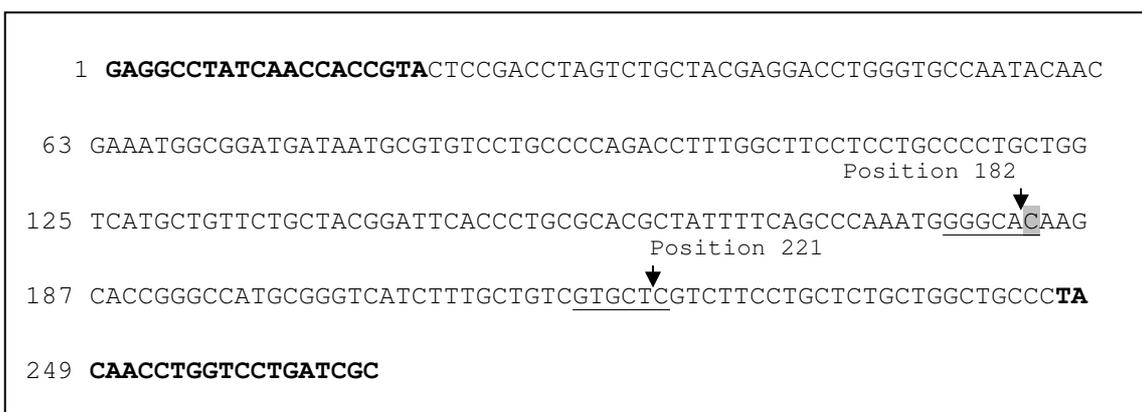


Abbildung 19: Sequenz des PCR-Produktes *CXCR1_Ex1_+199*. Die Position des Polymorphismus *CXCR1/Ex1/+199* ist grau hinterlegt. Erkennungssequenzen des Enzyms *BspI268I* sind unterstrichen, Schnittstellen des Enzyms sind mit einem Pfeil markiert. Die Primersequenzen sind fettgedruckt.

Die Fragmente der PCR-RFLP-Analyse wurden auf einem 2%igen Agarosegel bei 350 V für ca. 1,5 h aufgetrennt (Abbildung 20). Die Fragmente besaßen eine Größe von 39, 45 und 182 bp für das Allel C und 45 sowie 221 bp für das Allel G. Die Fragmentgrößen von 39 und 47 bp sind in Abbildung 20 auf Grund ihrer geringen Fluoreszenz nicht dargestellt.

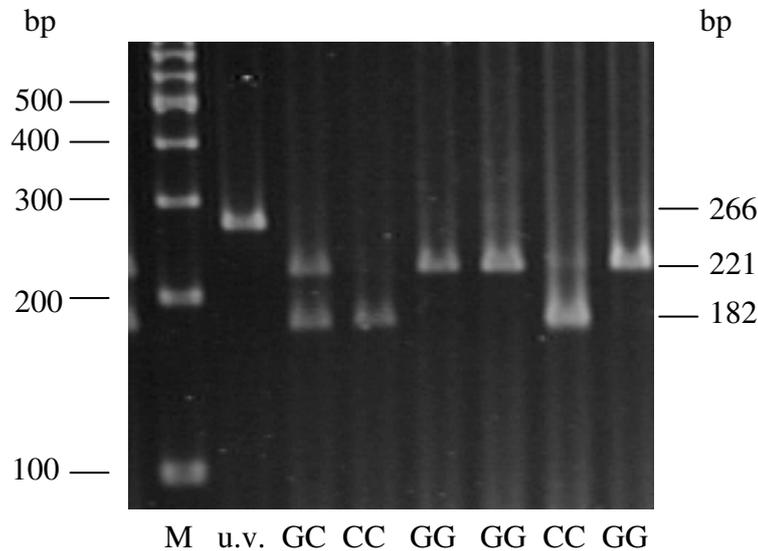


Abbildung 20: PCR-RFLP-Analyse der Genotypen GG, CC und GC des SNPs *CXCRI/+777* mit dem Enzym *BspI268I* und anschließender Agarosegelelektrophorese

M = Marker

u.v. = ungeschnittenes PCR-Produkt

4.2.3 IGFBP2

Bei einem *in silico* durchgeführten Vergleich der in der Sequenz NC_007300 angegebenen Exons von IGFBP2 mit der Sequenz der mRNA (NW_174555) dieses Gens zeigte sich, dass die Sequenz der Exons II und III nicht in der publizierten mRNA-Sequenz vorhanden sind. Bei beiden Exons konnte eine potentielle Donor-Spleißstelle (AG) nachgewiesen werden. Zusätzlich befand sich beim Exon III auch eine potentielle Akzeptor-Spleißstelle (GT), wohingegen bei Exon II am angegebenen Beginn des Introns 3 die Basen GC vorhanden waren.

4.2.3.1 Sequenzierung

Alle sechs Exons und der beim Schwein beschriebene Promotorbereich des *IGFBP2* konnten sequenziert werden. Innerhalb der Untersuchung der Exons I bis VI des *IGFBP2* wurden bei allen Produkten Intronbereiche mit amplifiziert, so dass von Intron 1 im vorderen Teil 263 bp und im hinteren 81 bp, von Intron 2 jeweils 229 und 67 bp, im 3. Intron 224 und 91 bp, im 4.

Intron 230 und 36 bp sowie 19bp und 121bp des 5. Intron und 165 bp der an Exon VI angrenzenden 3`UTR in die Analyse mit einfließen. Im Weiteren sind nur die Sequenziererergebnisse solcher PCR-Produkte aufgeführt, in denen Polymorphismen nachgewiesen werden konnten. Alle anderen sequenzierten Bereiche des *IGFBP2* zeigten sich in dem untersuchten Tiermaterial monomorph und stimmten zu 100% mit der Referenzsequenz NC_007300 (Position: 108.810.787 -108.839.273) überein.

IGFBP2_Ex1

Die Sequenzierung des Exons I erfolgte durch den Rückwärtsprimer *IGFBP2_Ex1_R*. Innerhalb dieser Sequenz konnte ein in der Sequenz NC_007300 fehlender Abschnitt identifiziert und mittels des Programms ChromasPro (*Technelysium Pty Ltd*, Tewantin) dargestellt werden. Der in der Sequenz NC_007300 fehlende mit einer Größe von 88 bp angegebene Abschnitt wies in dem sequenzierten Produkt eine Größe von insgesamt 270 bp auf. Durch ein Alignment dieses unbekanntes Sequenzabschnitts mit dem aus der mRNA-Sequenz NW_174555 abgeleiteten Exon I von *IGFBP2* konnte gezeigt werden, dass es sich zum Teil um einen 147 großen Endabschnitt des Exons I handelt, an den sich der bisher nicht bekannte vordere 123 bp große Abschnitt des Introns I anschließt (Abbildung 21). Die vollständige Sequenz des Exon I sowie vor dieser Arbeit unbekanntes Sequenzabschnitt des Introns 1 sind unter der Accession-Nr. GQ477184 in der GenBank Entrez Gene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>) zu finden.

ERGEBNISSE

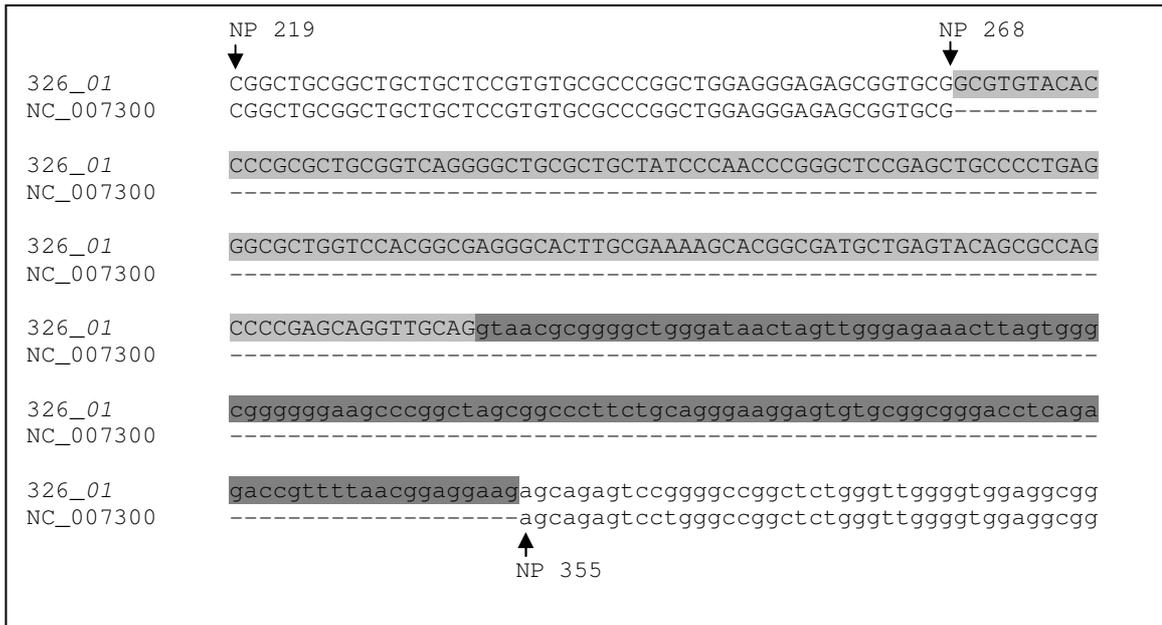


Abbildung 21: Darstellung der Sequenziererergebnisse des in der Sequenz NC_007300 fehlenden Sequenzabschnitts von *IGFBP2*. Hellgrau hinterlegt ist der dem Exon I (Großbuchstaben) zugeordnete, dunkelgrau der dem Intron 1 (Kleinbuchstaben) zugeteilte Sequenzabschnitt. NP = Nukleotidposition in der Referenzsequenz NC_007300 des *IGFBP2*.

An Position +55 des 1. Introns konnte durch die Sequenzierung in Dt. Holstein eine Punktmutation dargestellt werden. Es handelte sich hierbei um einen Austausch der Basen G und A (Abbildung 22).

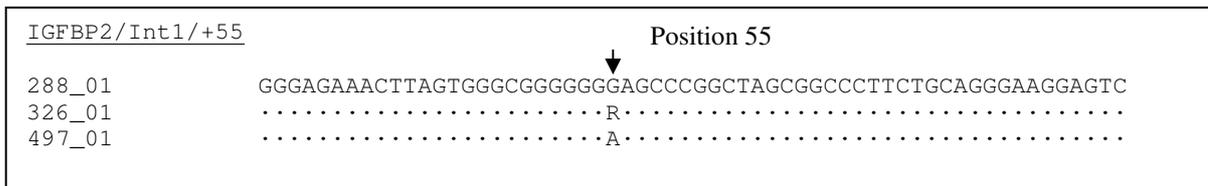


Abbildung 22: Ansicht des Polymorphismus *IGFBP2/Int1/+55* mittels eines Sequenzausschnitts des PCR-Produkts *IGFBP2/Int1/+55*. Identische Nukleotide werden durch Punkte dargestellt.

Tier 288_01: homozygot G

Tier 326_01: heterozygot A und G (R)

Tier 497_01: homozygot A

· : Wiedergabe der Sequenzübereinstimmung

IGFBP2_Ex2

Durch die Sequenzierung des PCR-Produkts *IGFBP2_Ex2* konnten drei Polymorphismen im angrenzenden Intron 3 nachgewiesen werden. Bei zwei dieser Polymorphismen handelte es sich um Basenaustausche (*IGFBP2/Int3/+167*, *IGFBP2/Int3/+193*), wohingegen die dritte Mutation eine Insertion der Base G darstellte. Da in der Sequenz im Bereich der Insertion weitere sieben Gs vorhanden waren, konnte die genaue Position der Insertion nicht bestimmt

ERGEBNISSE

werden. Im Weiteren wird die Insertion *IGFBP2/Int3/+146insG* genannt, da dies der letzten Base des G-Repeats entspricht und hier die Insertion deutlich wird. In Abbildung 23 ist die Darstellung der Polymorphismen zu sehen.

<u>IGFBP2/Int3</u>	+146insG ↓	+167 ↓	+193 ↓
HF 288_01	GCGGGGGGGGTGGGGTTGGAGTAGGTGGGCCTGGAAGAAAAATAGCAGGGGGACCGTGA		
DA grün 14S.....S.....S.....
FLV blau 1S.....S.....S.....

Abbildung 23: Sequenzausschnitt des Introns 3 von *IGFBP2* zur Darstellung der Polymorphismen *IGFBP2/Int3/+146insG*, *IGFBP2/Int3/+167* und *IGFBP2/Int3/+193*. Die Nukleotidpositionen der Polymorphismen sind oberhalb der Sequenzen im Bezug auf die Position im Intron 3 angegeben. Identische Nukleotide werden durch Punkte, fehlende Nukleotide durch Striche dargestellt.

- Tier 288_01: Insertion der Base G
- Tier DA grün 14: heterozygot C und G (S) für den SNP *IGFBP2/Int3/+167*
- Tier FLV blau 1: heterozygot G und C (S) Für den SNP *IGFBP2/Int3/+193*

Die Insertion ist in der Abbildung 24 zum besseren Verständnis in Form von zwei homozygoten Tieren demonstriert. Das Tier HF 288_01 war jedoch heterozygot. Hierdurch wurden in der Kurvendarstellung des Computerprogrammes ChromasPro zwei Kurven übereinander projiziert. Die eine Kurve entspricht der normalerweise fortlaufenden Sequenz und die andere Kurve stellt diese Sequenz je um ein bp nach hinten verschoben dar (Abbildung 24).

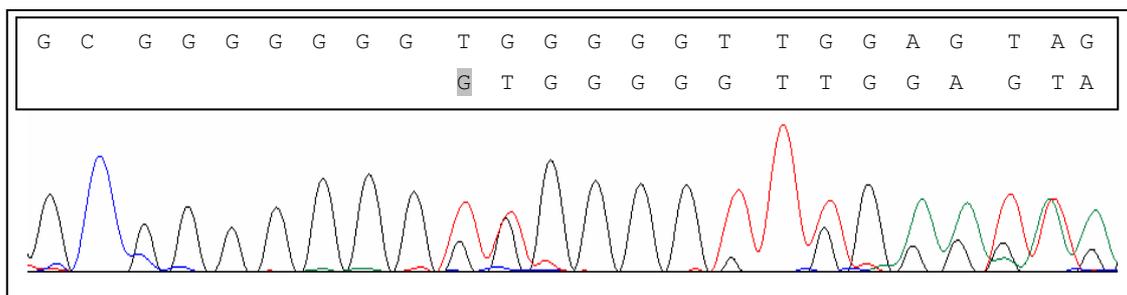


Abbildung 24: Kurvendarstellung der Insertion im Intron 3 des *IGFBP2* und der nachfolgenden Sequenzierergebnisse. Die obere Basenabfolge gibt die Sequenz um den Insertionsbereich an, die untere zeigt die Sequenzverschiebung durch die Insertion der Base G (grau hinterlegt). In der Kurvendarstellung ist ab diesem Punkt die Verschiebung der Sequenz durch zwei übereinander liegende Kurven sichtbar.

4.2.3.2 Darstellung des SNPs *IGFBP2/Int1/+55* mittels Tetra-Primer ARMS PCR
 Für die Typisierung der Tiere am SNP *IGFBP2/Int1/+55* wurde eine Tetra-Primer ARMS-PCR etabliert. Durch die ausgewählten inneren Vorwärts- und Rückwärtsprimer konnten beide Genotypen dargestellt werden. In Abbildung 25 sind die ausgewählten Primer und die Größe der mit ihrer Hilfe amplifizierten PCR-Produkte gezeigt. Der innere Rückwärtsprimer bindet bei Präsenz der Base A an Stelle +55 in Intron 1 und bildet zusammen mit dem äußeren Vorwärtsprimer ein 131 bp großes Produkt. Befindet sich an dieser Stelle hingegen die Base G bindet der innere Vorwärtsprimer und es wird mit dem äußeren Rückwärtsprimer zusammen ein 188 bp großes Produkt amplifiziert. Durch die beiden äußeren Primer entsteht ein 265 bp großes Produkt.

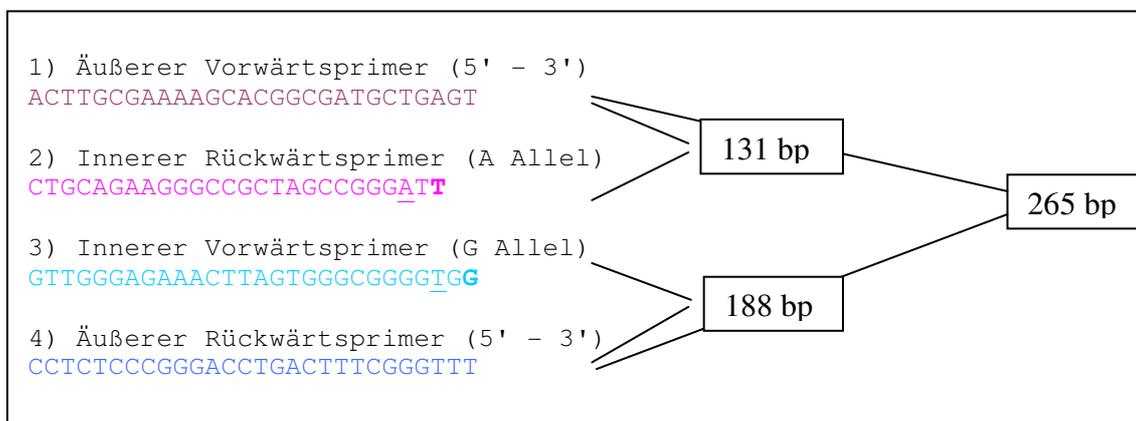


Abbildung 25: Primer der Tetra-Primer ARMS-PCR zur Darstellung des SNPs *IGFBP2/Int1/+55* sowie Produktgrößen der PCR-Produkte. Unterstrichen sind die beiden Mismatchstellen der inneren Primer, fettgedruckt die beiden allelspezifischen Basen am 3'-Ende der inneren Primer. Alle Primer sind vom 5'- zum 3'-Ende angegeben.

Zur Verdeutlichung ist die Sequenz des Kontrollfragments aus den äußeren Primern, sowie alle vier genutzten Primer in Abbildung 26 dargestellt. An Stelle +199 wurden der Polymorphismus sowie die für die allelspezifische Primerbindung verantwortliche Base im jeweiligen Oligonukleotid grau hinterlegt.

ERGEBNISSE

```

1) CACTTGCGAAAAGCACGGCGATGCTGAGT
   CACTTGCGAAAAGCACGGCGATGCTGAGTACAGCGCCAGCCCCGAGCAGGTTGCAGGTAACGCGGGGC
   ▲ Position 1

   2) GTTGGGAGAACTTAGTGGGCGGGGTTGG
TGGGATAACTAGTTGGGAGAACTTAGTGGGCGGGGGNAGCCCGGCTAGCGGCCCTTCTGCAGGGAAGGAG
                                   3) AACCCGGCTAGCGGCCCTTCTGCAG
                                   ▲
TGTGCGGCGGGACCTCAGAGACCGTTTTTAACGGAGGAAGAGCAGAGTCCTGGGCCGGCTCTGGGTTGGGGTG
                                                                                   ▼ Position 265

GAGGCGGTGGTTGTTGGGAGGGGGAAAACCCGAAAGTCAGGTCCCGGGAGA
                                   4) AAACCCGAAAGTCAGGTCCCGGGAGAGG
    
```

Abbildung 26: Sequenz des Kontrollfragments der äußeren Primer von *IGFBP2/Int1/+55*. Die über bzw. unter der Sequenz angegebenen Oligonukleotidesequenzen stellen die für die allelspezifische PCR ausgewählten Primer dar (siehe auch Abbildung 25). Die Stelle des Polymorphismus ist in der Sequenz grau hinterlegt. In den Oligonukleotiden ist die jeweilige Base grau hinterlegt, durch welche es an der Position des Polymorphismus zu einer allelspezifischen Bindung des entsprechenden Primers kommt. Unterstrichen sind die für eine Verbesserung der Bindungsspezifität sorgenden Mismatchstellen 3 Basen vor dem 3'- bzw. 5'-Ende der Primer. Die Rückwärtsprimer sind reverse und complement angegeben. 1) = äußerer Vorwärtsprimer, 2) = innerer Vorwärtsprimer, 3) = innerer Rückwärtsprimer und 4) = äußerer Rückwärtsprimer

Die PCR-Produkte wurden auf einem 3,5%igen Gel bei 250 V für 2 h aufgetrennt (Abbildung 27).

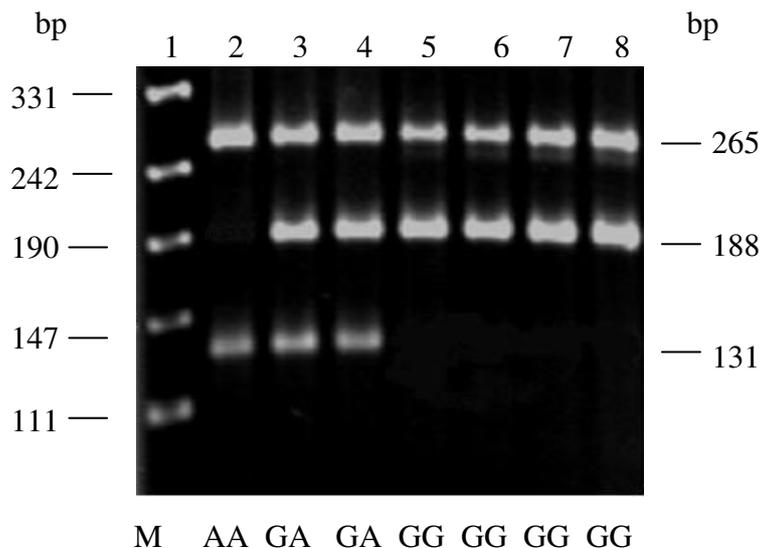


Abbildung 27: Tetra-Primer ARMS-PCR für den SNP *IGFBP2/Int1/+55* mit anschließender Agarosegelelektrophorese zur Darstellung der Genotypen AA, GG und GA
M = Marker

4.2.4 PIP5K3

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Untersuchung des Gens *PIP5K3* dargestellt.

4.2.4.1 Sequenzierung

Mittels Sequenzierung wurden insgesamt 16 Exons auf das Vorhandensein von Polymorphismen untersucht. Die Exons V, VI, VII, VIII, IX, XXIII, XXIV, XXV, XXVII, XXVIII, XXIX, XXX, XXXI, XXXII zeigten sich in dem untersuchten Tiermaterial monomorph. In Exon XIX wurden an Position +58 (A>G) und +792 (A>G) Polymorphismen gefunden. Außerdem wurde in Exon XXVI an Position +69 ein SNP (T>C) identifiziert. Durch die Untersuchung des Exons XIX mittels genomischer DNA wurde auch ein Teil des Introns 18 sequenziert. In diesem konnte an Stelle -112 ein Basenaustausch (G>A) nachgewiesen werden. Die Polymorphismen sind in Abbildung 28 und Abbildung 29 dargestellt.

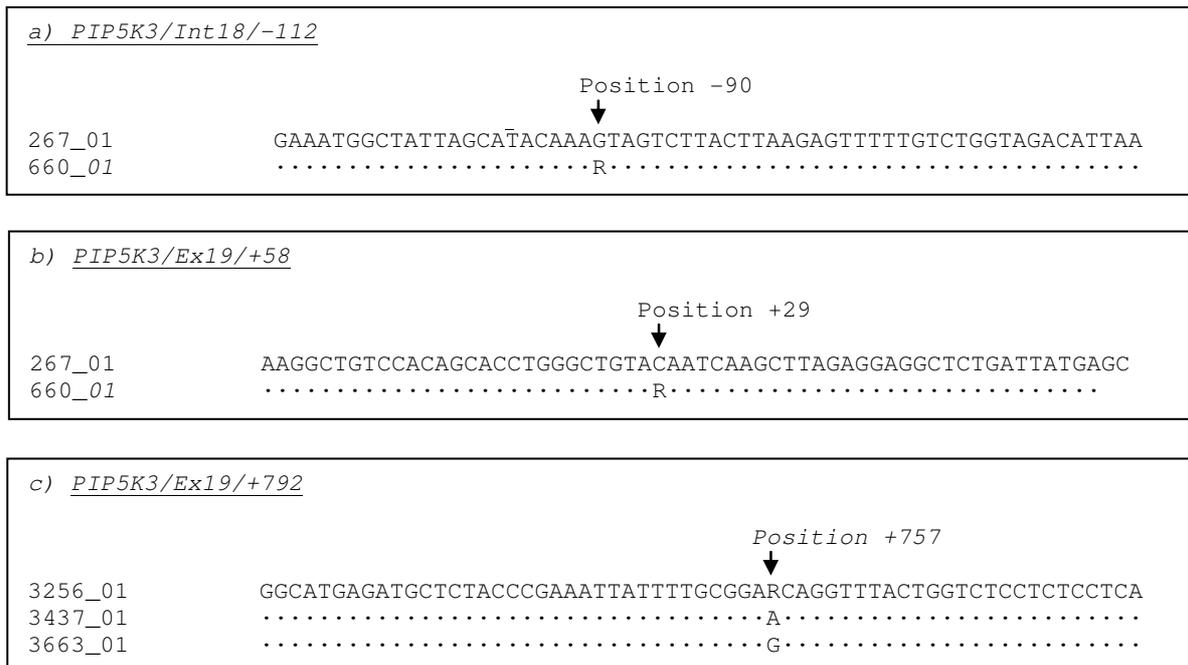


Abbildung 28: Darstellung der Polymorphismen a) *PIP5K3/Int18/-112* und b) *PIP5K3/Ex19/+58*. Die angegebenen Positionen sind im Bezug auf die Position im jeweiligen Exon bzw. Intron angegeben. Identische Nukleotide werden durch Punkte dargestellt.

- | | | |
|----------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|
| a) Tier 267_01: homozygot G | b) Tier 267_01: homozygot A | c) Tier 3256_01: heterozygot A/G (R) |
| Tier 660_01: heterozygot A/G (R) | Tier 660_01: heterozygot A/G (R) | Tier 3437_01: homozygot A |
| | | Tier 3663_01: homozygot G |

ERGEBNISSE

<u>PIP5K3/Ex26/+69</u>	
	Position +40 ↓
OH04_2008	TCCTGTCTTCCTCCATGGATACCCCCAGCAACTGCAGTCAGTCTTCGAGTCCCTCATCG
OH07_2008G.....
OH14_2008K.....

Abbildung 29: Darstellung des Polymorphismus *PIP5K3/Ex26/+69*. Die angegebene Position ist im Bezug auf die Position im Exon angegeben. Identische Nukleotide werden durch Punkte dargestellt.

Tier OH04_2008: homozygot T
 Tier OH07_2008: homozygot G
 Tier OH014_2008: heterozygot T/G (K)

4.2.4.2 Darstellung des SNPs *PIP5K3/Int18/-112* und des SNPs *PIP5K3/Ex19/+58* mittels Doppel-RFLP

Für die Typisierung der beiden Polymorphismen *PIP5K3/Int18/-112* und *PIP5K3/Ex19/+58* konnte ein Doppelverdau mit dem Enzym *TaaI* etabliert werden. Die durch den Vorwärtsprimer eingebaute Base C, zwei Positionen vor dem Polymorphismus *PIP5K3/Int18/-112*, erzeugte eine künstliche Schnittstelle für das Enzym, wodurch auch bei diesem SNP die beiden Genotypen G und A unterschieden werden konnten. Die jeweilige Schnittstelle des Enzyms an den Polymorphismen *PIP5K3/Int18/-112* und des SNPs *PIP5K3/Ex19/+58* ist in Abbildung 30 zu sehen.

1)	↓
1 gtaggaaatggctattagcat <u>acacag</u> tagtcttacttaagagtttttgtctggtagacatt 63 aaaataatgaactaattctgtctggacttctggattgccacctaaacctttttaaccttg 125 tttgtttattttgtaGAACAAACCAAGACACTGATGTTTTTTGAAGGCTGTCCACAGCACCTG	
2)	↓
125 GGCTGT <u>ACAGT</u> CAAGCTTAGAGGAGGCTCTGATTATGAGCTGGCTCGAGTTAAGGAGATCTT 187 AATAT TTATGATCTGTGTAGCTTATCATTCTC	

Abbildung 30: Sequenz des PCR-Produktes *PIP5K3_Int18-Ex19*. Die Position der Polymorphismen *PIP5K3/Int18/-112* (1) und *PIP5K3/Ex19/+58* (2) sind grau hinterlegt. Die Sequenzanteile des Introns sind in Kleinbuchstaben, die des Exons in Großbuchstaben dargestellt. Die Erkennungssequenzen des Enzyms *TaaI* sind unterstrichen, Schnittstellen des Enzyms sind mit einem Pfeil markiert. Die Primersequenzen sind fettgedruckt. Letzte Base des Vorwärtsprimers ist die mit Hilfe des Primers eingebaute Base zur Erzeugung der künstlichen Schnittstelle im Intron18 (Kapitel 3.2.8.1.1).

ERGEBNISSE

Die Fragmente wurden auf einem 3,5%igen Agarosegel bei 250V für 2h aufgetrennt.

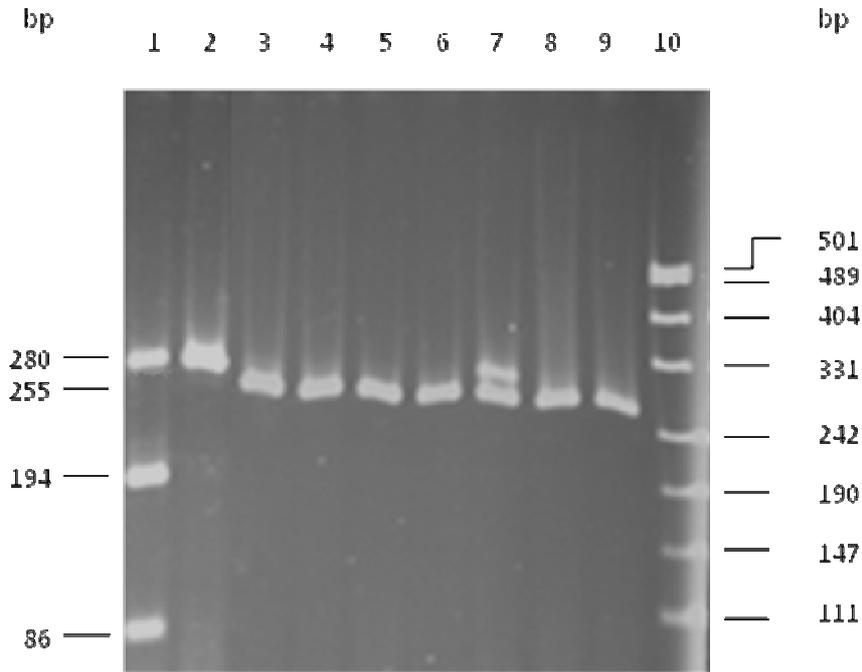


Abbildung 31: Gelbild des Doppelverdaus von PIP5K3/Int18Ex19 mit dem Enzym *TaalI* zum Nachweis der SNPs PIP5K3/Int18/-112 und PIP5K3/Ex19/+58.

Slot 1: A-G/AA
Slot 2: A-A/A-A
Slot 3- 6: G-A/G-A
Slot 7: G-A/A-A
Slot 8-9: G-A/G-A
Slot 10: Marker

Mit Hilfe des Doppelverdaus war es neben der Typisierung der Polymorphismen möglich, die Haplotypen G-A, G-G, A-G und A-A (Int18-Ex19) der Tiere sowie die daraus resultierenden Genotypen (Diploypen) zu bestimmen. Mögliche Diploypen sowie alle aus diesen im Zuge eines Doppel-RFLPs resultierenden Fragmentlängen sind in Abbildung 32 dargestellt. Die untersuchten Proben wiesen die Diploypen G-A/G-A, A-G/A-A, A-A/A-A und G-A/A-A auf, welche zur Verdeutlichung in der Abbildung 32 fett dargestellt sind.

ERGEBNISSE

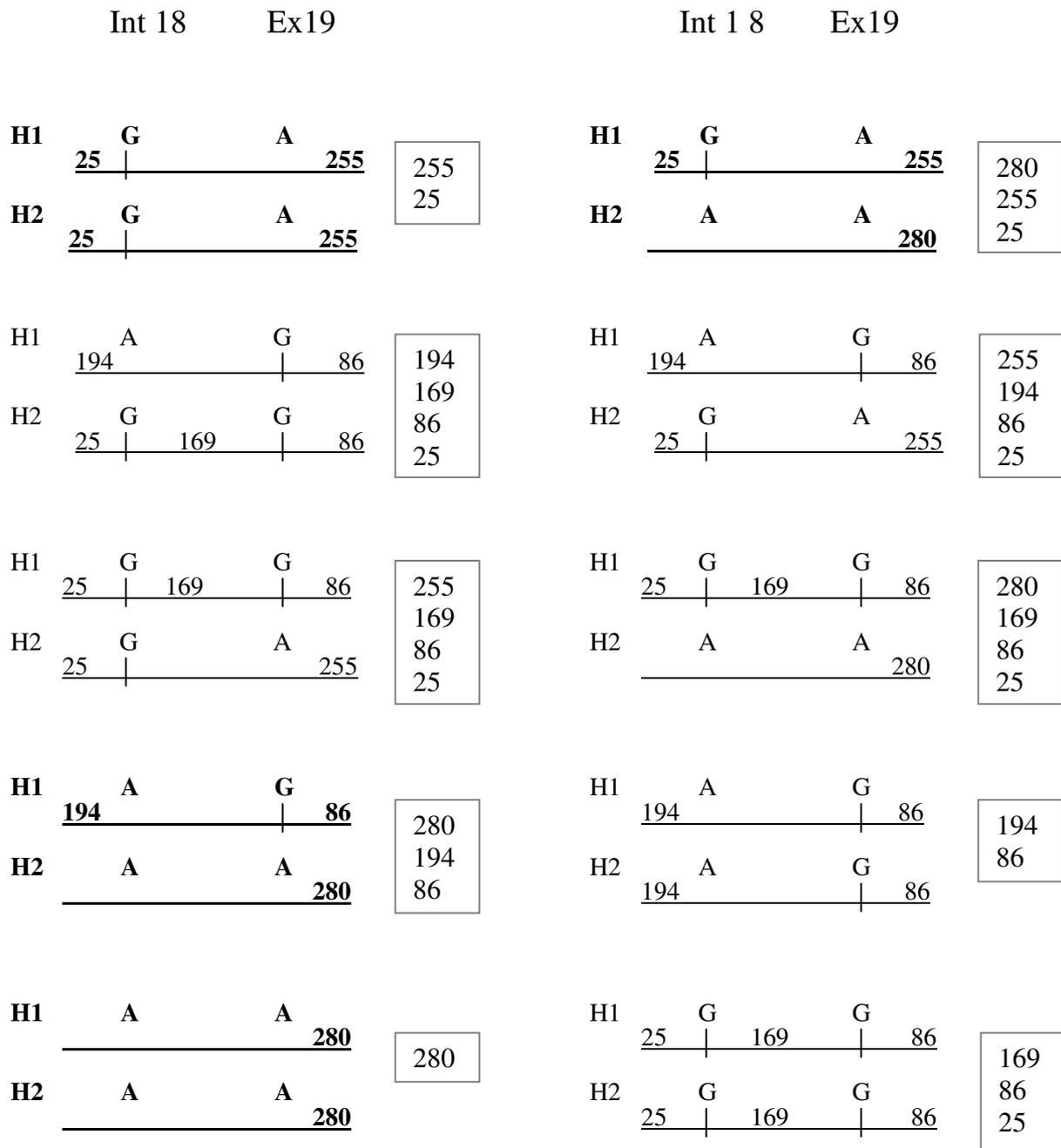


Abbildung 32: Mögliche Diplotypen der SNPs *PIP5K3/Int18/ -112* (Int18) und *PIP5K3/Ex19/+58* (Ex19) sowie die aus diesen durch einen Doppelverdau mit dem Enzym *TaaI* resultierenden Fragmentlängen in Basenpaaren. Fett gedruckt sind die im Probenmaterial gefundenen Diplotypen. Senkrechte Striche geben den Schnitt des Enzyms bei Vorhandensein der Base G an beiden Polymorphismen an. In den Kästchen sind die jeweiligen Fragmentgrößen in Anlehnung an ihre Auftrennung bei einer Agarosegelelektrophorese schematisch dargestellt. H = Haplotyp

4.2.4.3 Darstellung des SNPs *PIP5K3/Ex19/ +792*

Der SNP *PIP5K3/Ex19/+792* konnte mittels einer PCR-RFLP-Analyse mit dem Enzym *BveI* dargestellt werden. Das Enzym schnitt bei Vorhandensein der Base G, wodurch zwei

ERGEBNISSE

Fragmente mit der Größe von 683 und 179 bp entstanden. Lag hingegen die Base A vor, schnitt das Enzym das 862 bp große Produkt nicht.

```
001 ATGACACTGGCCTGTATGTTACCGAGGA
029 AGTTACCTCTTCTGAAGATAAACGGAAGACTGATTCTTTGACCTTTAAGCAAGAGTTGAA
089 AGATGTGATCCTCTGTATCTCGCCAGTCATCACATTCCGGGAGCCCTTCCTTTTAACTGA
      ↓ Position 179
149 CAAGGGCATGAGATGCTCTACCCGAGATTATTTTGCAGGAGCAGGTTTACTGGTCTCCTCT
209 CCTCAATAAGGAGTTCAAGGAAATGGAGAGCAGGCGAAAGAAACAGATGCTTAGGGATCT
269 CTCTGGCCTTCAGGGCATGAATGGAAGTGTTTCAGGCCAAGTCCATTCAAGTCTGCCCTC
329 ACATGAGCTCGTGAGCACCAGAATTGCTGAGCACCTGGGGGACAGCCAGAGCTTGGGGAG
389 AATGCTAGCCGATTATCGGGCCAGAGGAGGAAGAATCCAGCAAAAAAACTCAGACCCTTT
449 TGCTTACTCAAAGGAGGCATCAAGCACCTCAAGTGGAAAATCAGGAAGCAGAACTGAAGG
509 TGATGAAGAAAAAGGGTTGATTACCAGTGATGCAGTGTGGTCGACAAAGGTGAGCAAGAC
569 TGCCTTTGTGCTTGTGCACATTTAAGATGGGTGGAAAATCTCTGCTGTGGCAAGGTAAAA
629 AAGTCAAATATGACAGCTTGCATGCAGATTTATTAATATTTTCATCTGTGCTTTTTTTTTT
689 GTTTTGGTCTCTTTTGTCTTAACGTGTTGCTTTAAAATGTAAGAAATAGGAGTGTAAATGT
749 GATGAAACTAGATTTGAAGGTTTCAGGCTAAGCTCACAGCAAACCTCGGAAGAACTGTGAG
809 GTAGGGGGCAGTGTGGAGCTGCTTAAAATTTCTGACATGATGACTTGGGTGTAA
```

Abbildung 33: Sequenz des PCR-Produktes *PIP5K3_Ex19_2*. Die Position des Polymorphismus *PIP5K3/Ex19/+792* ist grau hinterlegt. Die Erkennungssequenz des Enzyms *BveI* ist unterstrichen, die Schnittstelle des Enzyms mit einem Pfeil markiert. Fett gedruckt sind die Primersequenzen.

Die Fragmente der PCR-RFLP-Analyse wurden auf einem 2%igen Gel bei 250 V für ca. 2,5 h aufgetrennt (Abbildung 34).

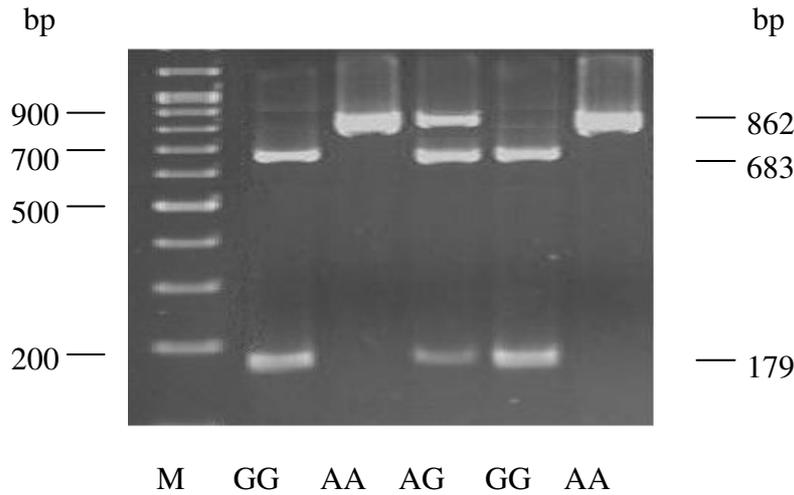


Abbildung 34: Darstellung der Genotypen GG, AA und GA des SNPs *PIP5K3/Ex19/+792* mit dem Enzym *BciVI* mittels PCR-RFLP-Analyse und anschließender Agarosegelelektrophorese
M = Marker

4.2.4.4 Darstellung des SNPs *PIP5K3/Ex26/+69*

Für die Typisierung des SNPs *PIP5K3/Ex26/+69* wurde ein RFLP mit dem Enzym *BfuI* etabliert. Abbildung 35 zeigt die Schnittstelle und die Erkennungssequenz des Enzyms in der Sequenz des PCR-Produkts. Die aus dem Verdau resultierenden Fragmente hatten eine Größe von 114 und 97 bp (Allel T). Da das Enzym keine Kontrollschnittstelle in dem PCR-Produkt hatte, wurde das Produkt bei Vorliegen der Base G am SNP an keiner Stelle geschnitten.

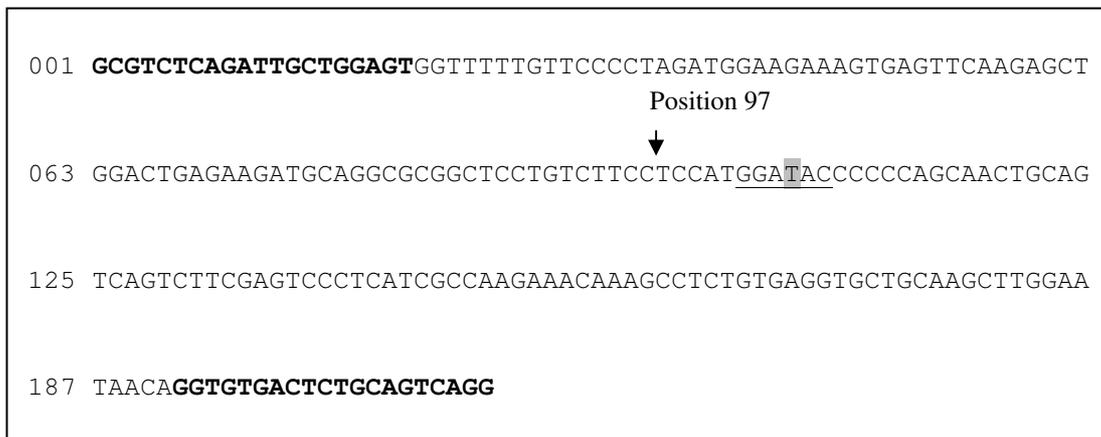


Abbildung 35: Sequenz des PCR-Produktes *PIP5K3_Ex26*. Die Position des Polymorphismus *PIP5K3/Ex26/+69* ist grau hinterlegt. Die Erkennungssequenz des Enzyms *BfuI* ist unterstrichen, die Schnittstelle des Enzyms ist mit einem Pfeil markiert. Fett gedruckt sind die Primersequenzen.

Die Fragmente der PCR-RFLP-Analyse wurden auf einem 2%igen Agarosegel bei 250V für ca. 2h aufgetrennt (Abbildung 36).

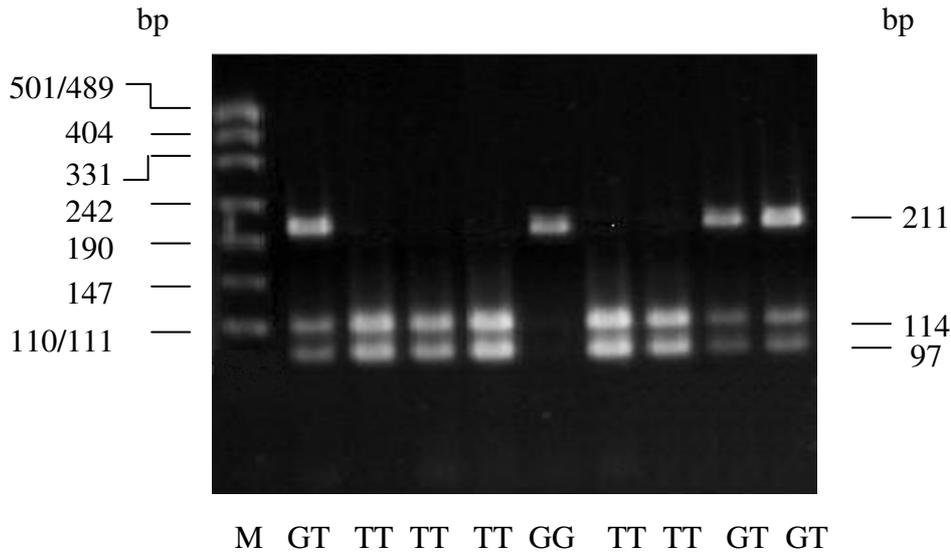


Abbildung 36: Abbildung der Genotypen TT, GG und GT des SNPs *PIP5K3/Ex26/+69*. Dargestellt mittels PCR-RFLP-Analyse mit dem Enzym *BveI* und anschließender Agarosegelelektrophorese. M = Marker

4.2.5 Ergebnisse der Auswahlkriterien für die SNPs

4.2.5.1 Allelfrequenzen im unverwandten Material

Die Allelfrequenzen in der Population wurde für die in Tabelle 32 aufgeführten SNPs anhand unverwandter Tiere geschätzt. Im Zuge des Doppelverbaus der SNPs *PIP5K3/Int18/-112* und *PIP5K3/Ex19/+58* wurde auch die Allelverteilung des letzteren ausgewertet. Von den 40 untersuchten Tieren hatte nur ein Tier den Genotyp GA, alle anderen Tiere den Genotyp AA.

Tabelle 32: Allelfrequenzen der untersuchten SNPs in Dt. Holstein Tieren

SNP	Allel 1	Allel 2
<i>CXCR1/5`UTR/-96</i>	A = 0,53	G = 0,47
<i>CXCR1/5`UTR/-1768</i>	T = 0,71	A = 0,29
<i>CXCR1/Ex1/+199</i>	C = 0,56	T = 0,44
<i>CXCR1/+777</i>	C = 0,52	G = 0,48
<i>IGFBP2/Int1/+55</i>	G = 0,55	A = 0,45
<i>PIP5K3/Int18/-112</i>	A = 0,84	G = 0,16
<i>PIP5K3/Ex19/+58</i>	A = 0,99	G = 0,01
<i>PIP5K3/Ex26/+69</i>	T = 0,86	G = 0,14
<i>STAT1/3`UTR</i>	C = 0,60	T = 0,40

4.2.5.2 Lage und Scores der SNPs

4.2.5.2.1 CXCR1

SNP in kodierendem Bereich

Bei dem SNP *CXCR1/Ex1/+199* handelt es sich um einen nicht-synonymen Basenaustausch. An Stelle der AS Valin wird an Position 67 die AS Alanin in die Aminosäuresequenz eingebaut. Die Blossum62-Matrix ergibt für diesen Austausch einen Score von 0.

SNP in nicht kodierendem Bereich

Für den SNP *CXCR1/5`UTR/-96* ergab die Analyse mit TFSEARCH 1.3 (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>) eine potentielle Bindungsstelle des funktionell möglichen Transkriptionsfaktors C/EBP, wobei der Score mit der Base G an Stelle des SNPs bei 89,2 liegt und bei der Base A nur ein Score von 81,5 erreicht wurde (Abbildung 37).

	Entry	Score
GGTTTGAGGA TGAGTTTGG A AATTACAGCG GCACGCCACC ----->	C/EBP	89.2
GGTTTGAGGA TGAGTTTGA A AATTACAGCG GCACGCCACC ----->	C/EBP	81.5

Abbildung 37: Die bovine Sequenz um den Polymorphismus *CXCR1/5`UTR/-96* wurde mittels des Programms TFSEARCH 1.3 auf das Vorhandensein von Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren untersucht. In der Abbildung sind die gefundenen Bindungsstellen des funktionell plausiblen Transkriptionsfaktors C/EBP (Entry) als Pfeile unterhalb der Sequenz dargestellt. Der Score gibt den Grad der Übereinstimmung der gefundenen Bindungsstelle mit der optimalen Konsensussequenz der TRANSFAC-Datenbank für Transkriptionsfaktoren an und wurde für beide Allele des Polymorphismus ermittelt. Die Position des Polymorphismus ist grau hinterlegt.

4.2.5.2.2 IGFBP2

SNPs in nicht kodierenden Bereichen

Die Untersuchung der Sequenz in der direkten Umgebung des SNPs *IGFBP2/Int1/+55* mit Hilfe des Programms TFSEARCH 1.3 (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>) ergab, dass der SNP in einer potentiellen Bindungsstelle für den funktionell relevanten Transkriptionsfaktor NF-kappaB (p50) liegt. Durch den Basenaustausch G>A kommt es zu einer Erhöhung des Bindungsscores von 80,9 auf 85,2 (Abbildung 38).

ERGEBNISSE

Die Überprüfung der Konservierung dieses Bereichs mit dem Internetprogramm Vista Browser in verschiedenen Spezies führte zu der Annahme, dass es sich bei diesem Bereich nicht um einen hochkonservierten Bereich handelt (Abbildung 39). Es konnte jedoch auch beim Menschen und bei der Maus im Bereich des SNPs ein potentielles Bindungselement für NF-kappaB gefunden werden, bei welchem auch beim Menschen durch den Basenaustausch G>A an der Stelle des SNPs eine Erhöhung des Scores auf 87.4 angegeben wurde (Abbildung 38).

Die Prüfung des Bereichs um den SNP *IGFBP2/Int3/+167* und SNP *IGFBP2/Int3/+193* sowie der Insertion *IGFBP2/Int3/+146insG* zeigte, dass es sich auch hier um einen gering konservierten Bereich handelt. In der Umgebung des SNPs *IGFBP2/Int3/+193* und der Insertion konnten bis zu einem Score von 75 keine Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen ermittelt werden. Für die Lage des SNPs *IGFBP2/Int3/+167* konnten in der Rindersequenz insgesamt 3 – auch funktionell relevante – Bindungsstellen detektiert werden. Bei keiner dieser Bindungsstellen wurde ein Score von über 85 erreicht und keiner dieser Transkriptionsfaktoren hatte eine potentielle Bindungsstelle in der Sequenz der Maus und des Menschen.

a) Rind			
AGAAACTTAG	TGGGCGGGGG	GGAGCCCGGC	TAGCGGCC
		----->	
			Entry
			score
AGAAACTTAG	TGGGCGGGGG	GAAGCCCGGC	TAGCGGCC
		----->	
			NF-kap
			80.9
			NF-kap
			85.2
b) Mensch			
			Entry
			Score
TGGGAGAAAC	TTGGAGGGCA	GCGGAGAAAGC	CCGACGGGCG
		<-----	
			NF-kap
			76.3
TGGGAGAAAC	TTGGAGGGCA	GCGGAAAAGC	CCGACGGGCG
		<-----	
			NF-kap
			87.4

Abbildung 38: Die bovine (a) und humane (b) Sequenz um den Polymorphismus *IGFBP2/Int1/+55* wurde mittels des Programms TFSEARCH 1.3 auf das Vorhandensein von Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren untersucht. In der Abbildung sind die gefundenen Bindungsstellen des funktionell plausiblen Transkriptionsfaktors NF-kappaB als Pfeile unterhalb der Sequenz dargestellt. Der Score gibt den Grad der Übereinstimmung der gefundenen Bindungsstelle mit der optimalen Konsensussequenz der TRANSFAC-Datenbank für Transkriptionsfaktoren an und wurde für beide Allele des Polymorphismus ermittelt. Grau hinterlegt sind die Positionen des Polymorphismus.

	Entry	Score
1 GCTATTAGCA TACAAAATAG TCTTACTTAA GAG <-----<	Oct-1	89.5
1 GCTATTAGCA TACAAAGTAG TCTTACTTAA GAG <-----<	Oct-1	89.5

Abbildung 40: Die bovine Sequenz um den Polymorphismus *PIP5K3/Int18/-112* wurde mittels des Programms TFSEARCH auf das Vorhandensein von Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren untersucht. In der Abbildung sind die gefundenen Bindungsstellen des funktionell plausiblen Transkriptionsfaktors Oct-1 (Entry) als Pfeile unterhalb der Sequenz dargestellt. Der Score gibt den Grad der Übereinstimmung der gefundenen Bindungsstelle mit der optimalen Konsensussequenz der TRANSFAC-Datenbank für Transkriptionsfaktoren an und wurde für beide Allele des Polymorphismus ermittelt. Die Position des Polymorphismus ist grau hinterlegt.

4.3 Genotyp- und Allelfrequenzen

Genotypen Bullenväter

Für die auf ihre Assoziation mit den DYDs für die SCC hin untersuchten SNPs sind die Genotypen der Bullenväter in Tabelle 32 angegeben. Es zeigte sich, dass neun Bullenväter an der Stelle der SNPs *CXCR1/5`UTR/-96*, *CXCR1/Ex1/+199* und *CXCR1/+777* beide Allele besaßen, wohingegen nur vier Tiere für den SNP *IGFBP2/Int1/+55* und nur drei Tiere für den SNP *CXCR1/5`UTR/-1768* heterozygot waren. Am SNP *PIP5K3/Ex26/+69* waren nur zwei der insgesamt zehn Väter heterozygot.

Tabelle 32: Genotypen der Bullenväter für die untersuchten SNPs

Bullenvater	<i>CXCR1</i> 5`UTR/-1768	<i>CXCR1</i> 5`UTR/-96	<i>CXCR1</i> Ex1/+199	<i>CXCR1</i> +777	<i>IGFBP2</i> Int1/+55	<i>PIP5K3</i> Ex26/+69	<i>STAT1</i> 3`UTR
ADR II-BC	T T	G G	T T	C C	A G	T G	C C
ADR II-BD	T T	A G	C T	G C	G G	T T	C C
ADR II-DA	T T	A G	C T	G C	A G	T T	T T
ADR-MAS 1	T T	A G	C T	G C	A A	T T	T C
ADR-MAS 2	A T	A G	C T	G C	A G	T T	T C
ADR-MAS 3	T T	A G	C T	G C	G G	T T	T C
ADR-MAS 4	T T	A G	C T	G C	A G	T T	T C
ADR-MAS 5	A T	A G	C T	G C	A G	T T	C C
ADR-MAS 6	A T	A G	C T	G C	A G	T G	C C
ADR-MAS 7	T T	A G	C T	G C	G G	T T	C C

Allel- und Genotypfrequenz

Die berechneten Allel- und Genotypfrequenzen in den Familien sind in den Tabellen A 6 und A 7 m Anhang zusammengefasst. Eine Übersicht der Allel- und Genotypfrequenz des SNPs *PIP5K3/Ex26/+69* in den zwei untersuchten heterozygoten Familien gibt die im Anhang befindliche Tabelle A 8.

4.4 Assoziationsanalyse

Assoziationsanalyse in einem 20 cM großen den SNP umschließenden Fenster

Die Ergebnisse der Analyse in einem 20 cM großen Fenster sind im Anhang in den Tabelle A 9 dargestellt. Innerhalb dieser Analyse konnte kein signifikanter Einfluss der SNPs auf die Höhe der somatischen Zellen gefunden werden. Zur Verdeutlichung der Ergebnisse sind die f- und p-Werte in Tabelle 33 angegeben.

Tabelle 33: F- und p-Werte der putativen QTL-Positionen in einem 20 cM großen den SNP umschließenden Fenster

QTL*	<i>CXCR1/5`UTR/-1768</i>		<i>CXCR1/5`UTR/96</i>		<i>CXCR1/Ex1/-199</i>		<i>IGFBP2/Int1/+55</i>	
	f-Wert	p-Wert	f-Wert	p-Wert	f-Wert	p-Wert	f-Wert	p-Wert
1	0,98	0,412	0,53	0,593	0,48	0,624	0,59	0,559
2	1,02	0,402	0,54	0,588	0,48	0,624	0,56	0,574
3	1,01	0,402	0,53	0,589	0,48	0,622	0,57	0,568
4	1,01	0,400	0,53	0,593	0,48	0,622	0,57	0,572
5	1,00	0,401	0,52	0,596	0,48	0,623	0,56	0,572
6	1,01	0,408	0,50	0,611	0,45	0,640	0,57	0,568
7	1,00	0,420	0,47	0,628	0,42	0,660	0,57	0,570
8	1,00	0,413	0,44	0,644	0,39	0,681	0,57	0,570
9	1,02	0,398	0,42	0,657	0,36	0,700	0,57	0,569
10	1,05	0,379	0,40	0,670	0,34	0,717	0,56	0,572
11	1,06	0,372	0,40	0,674	0,33	0,723	0,57	0,571

* = putative QTL-Position

ERGEBNISSE

Tabelle 33 (Fortsetzung)

QTL*	<i>CXCR1/5`UTR/-1768</i>		<i>CXCR1/5`UTR/96</i>		<i>CXCR1/Ex1/-199</i>		<i>IGFBP2/Int1/+55</i>	
	f-Wert	p-Wert	f-Wert	p-Wert	f-Wert	p-Wert	f-Wert	p-Wert
12	1,08	0,362	0,39	0,681	0,31	0,732	0,57	0,571
13	1,13	0,341	0,37	0,694	0,29	0,749	0,57	0,572
14	1,13	0,342	0,38	0,689	0,30	0,746	0,57	0,570
15	1,11	0,347	0,38	0,685	0,30	0,744	0,56	0,573
16	1,10	0,352	0,39	0,679	0,30	0,739	0,55	0,579
17	1,09	0,358	0,40	0,675	0,30	0,740	0,53	0,591
18	1,07	0,365	0,41	0,668	0,31	0,733	0,52	0,597
19	1,06	0,371	0,42	0,662	0,32	0,728	0,51	0,604
20	1,05	0,376	0,42	0,659	0,32	0,726	0,49	0,614
21	1,04	0,38	0,42	0,657	0,33	0,724	0,48	0,623

* = putative QTL-Position

Einfluss des Genotyps nach Laktationen getrennt sowie Interaktion zwischen Genotyp und Familie in den heterozygoten Familien

Die Signifikanz des Genotyp-Einflusses auf die DYDs der typisierten Bullen und die Signifikanz der Interaktion zwischen Genotyp und Vater in den einzelnen Laktationen ist in Tabelle 34 aufgeführt. Angegeben sind jeweils die Ergebnisse der Analyse mit allen 10 Familien und die der Analyse mit den für den jeweiligen SNP heterozygoten Familien. Die heterozygoten Familien sind Tabelle 32 zu entnehmen. Wie in Tabelle 34 ersichtlich, konnte bei der gemeinsamen Berechnung mit den Typisierungsdaten aller Familien für keinen der untersuchten SNPs eine signifikante Assoziation zwischen dem Genotyp und den DYDs der 1. bis 3. Laktation festgestellt werden.

Für den SNP *IGFBP2/Int1/+55* konnte bei der Analyse der heterozygoten Familien eine signifikante Interaktion zwischen Genotyp und Vater in der 1. Laktation nachgewiesen werden.

ERGEBNISSE

Ebenso war eine signifikante Interaktion zwischen Genotyp und Vater in der 1., 2. und 3. Laktation beim SNP *STAT1/3`UTR* vorhanden.

Tabelle 34: Signifikanzwerte der Genotypeneffekte und der Interaktion zwischen Genotyp und Vater auf die DYD für SCS in der 1. (DYD1), 2. (DYD2) und 3. (DYD3) Laktation. Kursiv sind die signifikanten Ergebnisse dargestellt.

SNP	Material	Geno			Geno x Vater		
		DYD1	DYD2	DYD3	DYD1	DYD2	DYD3
<i>CXCR1/5`UTR/-96</i>	Gesamt	0,707	0,600	0,661			
	9x Hetero	0,732	0,607	0,659	0,266	0,494	0,643
<i>CXCR1/5`UTR/-1768</i>	Gesamt	0,909	0,879	0,784			
	3x Hetero	0,055	0,066	0,073	0,751	0,801	0,849
<i>CXCR1/Ex1/+199</i>	Gesamt	0,787	0,664	0,655			
	9x Hetero	0,786	0,649	0,642	0,237	0,298	0,318
<i>CXCR1/+777</i>	Gesamt	0,940	0,956	0,941			
	9x Hetero	0,942	0,953	0,956	0,098	0,135	0,192
<i>IGFBP2/Int1/+55</i>	Gesamt	0,954	0,966	0,964			
	6x Hetero	0,855	0,763	0,699	0,046	0,121	0,215
<i>STAT1/3`UTR</i>	Gesamt	0,604	0,806	0,794			
	4x Hetero	0,722	0,977	0,967	0,022	0,011	0,014

Geno = p-Werte für den Einfluss des Genotyps

Geno x Vater = p-Werte für die Interaktion zwischen Genotyp und Vater

Gesamt = Auswertung der Typisierungsergebnisse aller 10 Familien

(N)x Hetero = Anzahl der verwendeten heterozygoten Familien

Die Betrachtung der DYD-Mittelwerte bezüglich des SNPs *IGFBP2/Int1/+55* in den heterozygoten Familien zeigte, dass in der Familie ADR II-DA im Gegensatz zu allen anderen Familien der Mittelwert des Genotypen GG weit über denen der Genotypen GA und AA lag (Abbildung 41). Die Familien ADR II-BC und ADR-MAS 5 zeigten außerdem eine einander ähnliche Mittelwertverteilung. Bei allen anderen Familien folgte die Verteilung keinem einheitlichen Schema.

Die Mittelwerte der DYDs der 2. Laktation in den für den SNP *STAT1/3`UTR* heterozygoten Familien zeigten das in Abbildung 42 dargestellte Verteilungsmuster. In der Familie ADR-MAS 2 lagen die Mittelwerte für den Genotyp TT über denen des Genotyps TC und diese wiederum über denen des Genotyps CC. In der Familie ADR-MAS 4 konnte eine genau gegensätzliche Verteilung beobachtet werden. Hier waren die Werte der DYDs für den Genotyp CC höher als die für den Genotyp TC und diese andererseits höher als die des Genotyps TT. In den Familien ADR-MAS 1 und ADR-MAS 3 konnte keine derartige

ERGEBNISSE

Verteilung festgestellt werden. Vielmehr hatte hier der heterozygote Genotyp (TC) einen wesentlich höheren (ADR-MAS 3) bzw. niedrigeren (ADR-MAS 1) Wert als beide homozygoten Genotypen (CC, TT).

DYD SCS

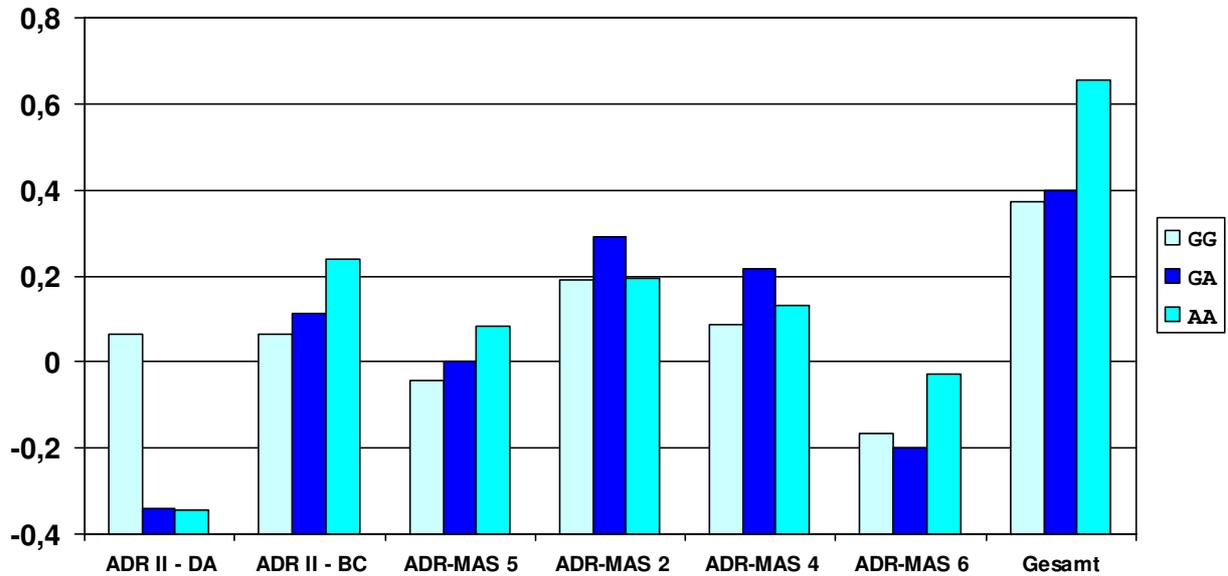


Abbildung 41: Mittelwerte der DYDs in der 1. Laktation für die Genotypen des SNPs *IGFBP2/Int1/+55* innerhalb der typisierten heterozygoten Familien

DYD SCS

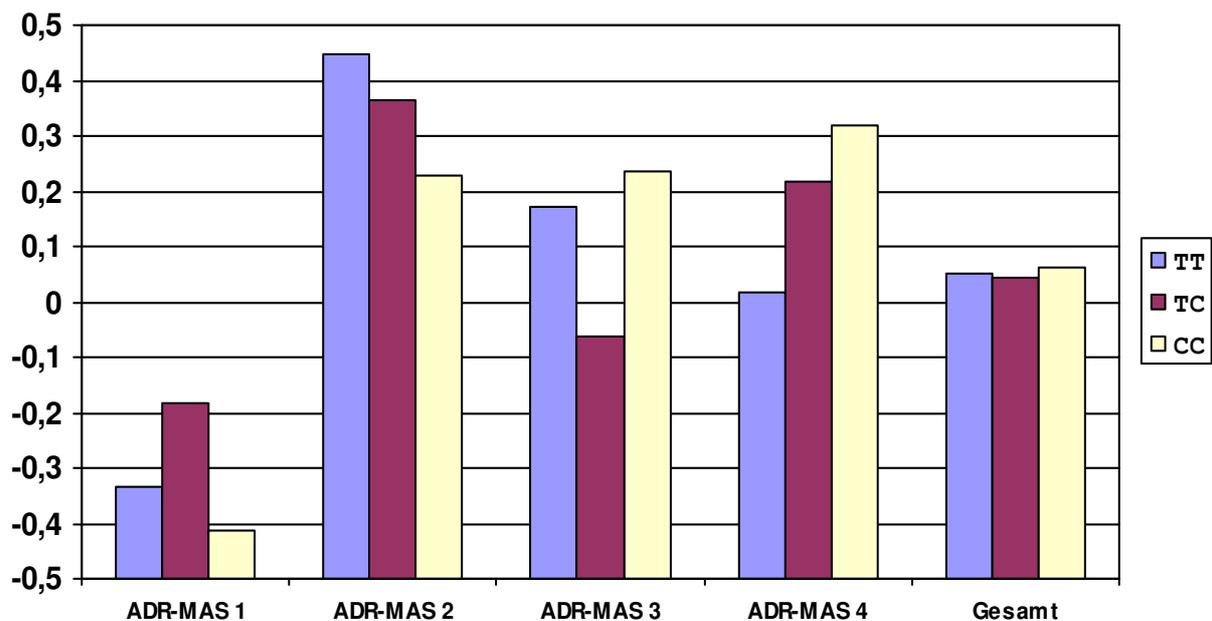


Abbildung 42: Mittelwerte der DYDs in der 1. Laktation für die Genotypen des SNPs *STAT1/3'UTR* innerhalb der typisierten heterozygoten Familien

5 Diskussion

5.1 Tiermaterial

Die 10 untersuchten Rinderfamilien bestanden neben den 3 Familien, welche sich für den QTL auf BTA02 für SCC als informativ erwiesen (Bullenväter für möglichst viele Marker heterozygot), aus Tieren des ADR-MAS-Projekts. Diese zusätzlichen Familien wurden ausgewählt, da viele kleine Familien bei QTL-Studien einen höheren Informationsgehalt bieten als wenige Familien mit vielen Nachkommen (Lee und van der Werf, 2004). Bei dem in dieser Arbeit angewandten kombinierten Ansatz von LA und LD spielte die Heterozygotie der Bullenväter im Vergleich zur alleinigen LA-Analyse überdies eine untergeordnete Rolle. Im kombinierten Ansatz liefern heterozygote Väter zwar weiterhin Informationen für das Kopplungsgleichgewicht, jedoch sind hier auch die Allele, die ein Sohn aus der Population seiner Mutter bekommen hat, wichtig, da bei der Berechnung des LD auch Informationen nicht typisierter Generationen genutzt werden (Meuwissen et al., 2002; Lee und van der Werf, 2005).

Auch für die Assoziationsanalyse zwischen den einzelnen SNPs und der SCC stellte das angewandte Tiermaterial eine gute Datengrundlage dar. Vor allem Väter, welche für den SNP heterozygot sind, liefern hierbei die beste Voraussetzung, eine mögliche Assoziation zu detektieren, sofern es sich bei den untersuchten Tieren um Halbgeschwister handelt. Der Vorteil besteht darin, dass das Restgenom von Vaterseite in Halbgeschwisterfamilien gleich ist und ein eventueller Effekt dieses bei der Analyse ausgeschlossen werden kann.

5.2 Nutzung der DYDs für SCC als Merkmal

Die Nutzung von DYDs hatte in der vorliegenden Arbeit, vor allem für die Kartierung von QTL mit geringerem Einfluss, einen Vorteil gegenüber der Nutzung von *Estimated Breeding Values* (EBVs), der sich aus den unterschiedlichen Berechnungen beider ergibt. DYDs, die korrigierten mittleren Töchterabweichungen der Bullen, stellen den Beitrag der Töchter zum Zuchtwert ihres Vaters dar. Sie haben eine größere Variation als die EBVs und beinhalten neben dem additiven genetischen Effekt auch Resteffekte. EBVs beinhalten hingegen neben Informationen über Töchterleistungen auch Verwandtschaftsinformationen der Bullen jedoch keinen Resteffekt. Die Relevanz dieses Unterschieds konnte anhand von Kartierungs-Simulationsstudien gezeigt werden, bei denen die Rate der QTL-Entdeckungen durch die Verwendung von DYDs höher als bei der Verwendung von EBVs war (Thomsen et al., 2001).

Setzt man also DYDs an Stelle der EBVs bei der Schätzung von QTL-Effekten ein, so besteht auf Grund ihrer höheren Variation die Möglichkeit, auch QTLs mit geringem Effekt detektieren zu können. Der Vorteil von DYDs wird ferner bei der Betrachtung der Hypothese deutlich, dass ein quantitatives Merkmal neben vielen kleinen Geneffekten auch von Hauptgenen beeinflusst wird (Farrall, 2004). Szyda et al. (2008) konnten zeigen, dass Effekte dieser gegebenenfalls in den Residuen des genetischen Evaluierungsmodells angesammelt sein können und daher nur in den DYDs, nicht aber in den EBVs enthalten sind.

In Kapitel 2.5 wurde beschrieben, welche Vorteile die Nutzung der SCC als Merkmal gegenüber der Nutzung von Daten über klinische Mastitis hat. Für die Kombination beider Merkmale bei der züchterischen Verbesserung der Eutergesundheit spricht jedoch nicht zuletzt die Annahme, dass bei monatlicher Messung der SCC nur 10 bis 20 % derjenigen Fälle nachgewiesen werden, bei der die SCC zwar stark aber nur kurz erhöht ist (Colleau und Le Bihan-Duval, 1995), wie dies z.B. bei der Infektion mit *Echerichia coli* der Fall ist (de Haas et al., 2008).

Bei der vorliegenden Arbeit wurden die Daten von insgesamt 833.336 Kühen genutzt. Eine Studie in derartigem Umfang wäre mit Daten über Mastitiserkrankungen nicht möglich gewesen. Grund hierfür ist die Tatsache, dass die Voraussetzungen, Daten über klinische Mastitiden in Zuchtprogrammen zu nutzen, in Deutschland bisher nicht gegeben sind. Um auch mit solchen Daten arbeiten zu können, müsste nach dem Vorbild skandinavischer Länder für alle in Deutschland gehaltenen Milchkühe ein *Disease Recording System* aufgebaut werden. Bis diese Anforderungen erfüllt sind, verkörpert die SCC in Deutschland weiterhin das sinnvollste Ersatzmerkmal für die Zucht auf Kühe mit einer höheren Resistenz gegen Mastitis.

5.3 QTL-Kartierung

Der *Polymorphism Information Content* (PIC) (Botstein et al., 1980) der eingesetzten Marker stand in der Datenbank der MARC_USDA (<http://www.marc.usda.gov/genome/genome.html>) nicht zur Verfügung. Aus diesem Grund dienten als Auswahlkriterien die Position der Mikrosatelliten innerhalb des QTL-Bereichs und die publizierte Anzahl von Allelen für diesen Genort. Es zeigte sich, dass von den untersuchten Mikrosatelliten 17 Marker im eingesetzten Material hochinformativ waren und einen PIC von $> 0,50$ aufwiesen. 8 Marker hatten nach der Einteilung von Botstein et al. (1980) einen akzeptablen PIC von $> 0,25$ und 1 Marker (*DIK4025*) hatte einen geringen Informationsgehalt von nur 0,22. Bei letzterem zeigte

sich, dass der geringe PIC-Wert auf die hohe Frequenz des Allels 203 ($203 = 0,88$) im untersuchten Material zurückzuführen ist. Auch der geringe Heterozygotiegrad der Väter von nur 20 % und das Vorherrschen des Genotyps 203/203 bei diesen spiegelt die Dominanz des Allels in der Population wieder. Es ist möglich, dass der geringe Heterozygotiegrad der Väter auch bei den Markern *DIK4726*, *TGLA110* und *BM1223* einen Einfluss auf den PIC im untersuchten Material hat. Die im Anschluss an die Typisierung der Mikrosatelliten durchgeführte LD-Analyse zeigte, dass zwischen den einzelnen Markern kein LD vorhanden war. Da bei LA-Analysen nur heterozygote Familien zum Informationsgehalt beitragen (Du et al., 2002), hätte die Auswahl von Mikrosatelliten mit einer höheren Heterozygotie-Rate der Väter aller Voraussicht nach zu einem höheren Informationsgehalt bei der QTL-Analyse geführt. Dies konnte zu Beginn der Arbeit jedoch noch nicht vorhergesehen werden. Die Wahrscheinlichkeit in diesem Bereich geeignete Mikrosatelliten zu finden ist überdies sehr gering, da die Auswahl durch das Kriterium der Allelzahl und die Zahl der publizierten Mikrosatelliten in dem durch die feinere Kartierung eingegrenzten Bereich begrenzt war.

Der Marker *DIK4676* wurde aus den QTL-Berechnungen herausgenommen, da er sich im gesamten Material als hochgradig monomorph darstellte und damit keinen weiteren Informationsgewinn brachte. Da die Berechnung der Markerkarte mit der CRI-map Version 5 Software (Washington University School of Medicine, P. Green, St. Louis, Missouri, USA) auf der Basis von Kopplungsdaten basiert und der Informationsgehalt eines Markers von der Heterozygotie eines Markers abhängt (Lander und Green, 1987), scheint die extreme Monomorphie des Mikrosatelliten *DIK4676* (Allelfrequenz: $201 = 0,96$; PIC: 0,086 und HZ: 8,6 %) dazu geführt zu haben, dass auf Grund zu geringer Kopplungsinformation die exakte Markerposition nicht berechnet werden konnte. Um Markerpaare mit zu geringem Informationsgehalt zu verhindern wählten Moen et al. (2008) in ihrer Kopplungsanalyse nur Mikrosatellitenmarker mit einer HZ von über 50% aus.

Das Vorhandensein eines Nullallels konnte bei allen für die Berechnung der QTL-Position eingesetzten Mikrosatelliten mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Allerdings ließen die Typisierungsergebnisse des Markers *ILSTS098* mit den anfänglich verwendeten Primern (*ILSTS98_F+R*) auf ein Nullallel durch eine Mutation in der Primersequenz schließen. In einem solchen Fall erscheint auf Grund der Nichtamplifikation eines Allels bei heterozygoten Genotypen, die das Nullallel tragen, dieser Genotyp homozygot und es besteht ein Heterozygotendefizit (Clayton et al., 2004; Dakin und Avise, 2004). Innerhalb einer Population kann ein Nullallel durch die Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

nachgewiesen werden (Ball und Chapman, 2003). Da diese Abweichung jedoch auch durch andere Ursachen, wie Mutation, Selektion, Migration und Inzucht entstehen kann (Sing und Rothmann, 1975; Ball und Chapman, 2003), ist die Verwendung von Familienmaterial bei der Identifikation eines Nullallels aussagekräftiger. Hierbei kann die Vermutung eines Nullallels – wie im vorliegenden Beispiel – bei homozygoten Vätern durch die Existenz von Nachkommen, die für ein anderes Allel homozygot sind, bestätigt werden (Dakin und Avise, 2004). Da für den Marker *ILSTS098* innerhalb einer Familie 6 homozygote, vom Genotyp des Vaters abweichende, Genotypen festgestellt werden konnten, ist die Wahrscheinlichkeit, dass ein Nullallel vorliegt, hoch. Dies bestätigte sich auch durch die Verwendung neuer Primer (*ILSTS98_n*), durch deren Einsatz bei den vorher fälschlicherweise homozygot typisierten Tieren, das Allel 187 nachgewiesen werden konnte. Nach Identifizierung des Nullallels wurden alle Tiere mit dem neuen Primern typisiert. Da dies in einer frühen Phase des Projekts stattfand, hatten die neuen Typisierungsergebnisse keine Konsequenzen auf die Berechnung des QTL-Bereichs. Bei dem Marker *DIK4025*, welcher eine extrem starke Präsenz des Genotyps 203/203 aufwies, konnte das Vorhandensein eines Nullallels mit Hilfe der Hypothese von Dakin und Avise (2004) mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Im Gegensatz zum Marker *ILSTS098* traten bei diesem Marker im Rahmen der Typisierung keine Abstammungsfehler auf. Ginge man bei *DIK4025* davon aus, dass das Nullallel neben dem Allel 203 durch Inzucht in der gesamten Population eine extrem hohe Frequenz aufweist, müsste es überdies rein statistisch eine hohe Anzahl von für das Nullallel homozygoten Tieren geben. Bei diesen Tieren hätte die Nichtamplifikation beider Allele wiederum zu einer wesentlich höheren Ausfallrate führen müssen, als dies bei nur 5 von insgesamt 1121 Tieren der Fall war.

Das Konfidenzintervall für den von Bennewitz et al. (2003) mit dem von Thomsen et al. (2000) beschriebenen Design gefundenen QTL für SCS auf BTA02 überspannte zu Beginn der Untersuchungen mit ca. 128 cM fast 80 % des gesamten Chromosoms. In der durchgeführten Joint-Analyse betrug dieser sogar 151 cM, was einer Chromosomen-Abdeckung von 96 % entsprach. Durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Typisierung von insgesamt 26 Markern konnte dieses Intervall mittels der LA-Analyse auf 38 cM reduziert werden. Die flache Kurve bei der LD-Analyse mittels Varianzkomponentenschätzung zeigte, dass keine der in der LA-Analyse gefundenen putativen QTL-Positionen in der LD-Analyse signifikant war. Die eingesetzten Haplotypen stehen auf Populationsebene demnach nicht im LD mit dem QTL. Daher war auch das Ergebnis der kombinierten Analyse, bei welcher

verglichen mit der LA-Analyse für alle Positionen geringere Werte ermittelt wurden, nicht anders zu erwarten. Mithilfe der kombinierten Analyse wurden dementsprechend keine weiteren Erkenntnisse bezüglich der genauen QTL-Lokalisation erreicht. Zhao et al. (2007) konnten zeigen, dass die Nutzung von Haplotypeninformationen bei der Nutzung von Karten mit verhältnismäßig geringer Dichte und im Vergleich zu Einzelmarker-Regressionen nicht unbedingt die größte Präzision bietet. Dies wird durch die Ergebnisse der hier beschriebenen QTL-Analyse bestätigt, bei der durch den Einsatz einer Einzelmarker-Regression für 2 Marker ein LD gefunden werden konnte. Es handelte sich hierbei um die Marker *ILSTS098* und *BMS778*. Bei beiden Markern wurde ein signifikanter Effekt auf den SCS in Dt. Holstein gefunden. Im Rahmen eines *Whole Genome Scans* wurde für einen von diesen Markern flankierten Bereich ein QTL für die funktionale Nutzungsdauer beschrieben (Kühn et al., 2003). Da die funktionale Nutzungsdauer die Gesundheit und die Konstitution einer Kuh beschreibt, wird in diesem Merkmal auch die Eutergesundheit berücksichtigt (VIT, 2009). Dies unterstreicht die Relevanz der Marker *ILSTS098* und *BMS778* für das Merkmal SCS. Auch die Ergebnisse der Assoziationsanalyse in einem 20 cM umfassenden Fenster sprechen für eine Lage des QTL in oder sehr nah zum untersuchten Bereich.

Bei der durchgeführten Regressionsanalyse einzelner Marker kann davon ausgegangen werden, dass die QTL-Kurve ein flaches Profil nahe der Nullgrenze erreicht, sofern der untersuchte Marker mit dem ursächlichen QTL gekoppelt ist. In diesem Fall erklärt der eingesetzte Marker vollständig die QTL-Varianz (Olsen et al., 2007). Da sich die Kurve bei der Regressionsanalyse des Markers *ILSTS098* nur geringfügig veränderte, kann man schließen, dass dieser Locus nur eine geringe genetische Varianz erklärt. Auch bei der Regressionsanalyse des Markers *BMS778* zeigte sich, dass sich der Marker zwar im Kopplungsungleichgewicht mit einem ursächlichen SNP befindet, jedoch noch weitere Effekte auf die QTL-Kurve vorhanden sind, und demnach noch andere Loci auf BTA02 einen Einfluss auf das untersuchte Merkmal ausüben. Da bei der Regressionsanalyse keiner der weiteren Marker ein Signifikanz-Level von über 5 % erreichte, kann davon ausgegangen werden, dass mehrere Loci mit geringem Effekt beteiligt sind. Diese Vermutung erscheint basierend auf der Annahme, dass ein quantitatives Merkmal von mehreren Loci mit geringem Effekt beeinflusst wird (Farrall, 2004), als durchaus plausibel. Auch das Vorhandensein von 2 Peaks spricht dafür, dass mehr als ein QTL existiert (Olsen et al., 2007). Da das Konfidenzintervall mit 38 cM noch relativ groß ist, kann es durch eine feinere Kartierung des QTL-Bereiches weiter eingegrenzt werden, wodurch eine genauere Lokalisierung ursächlicher QTL gewährleistet wird (Meuwissen und Goddard, 2000).

5.4 Auswahl und Untersuchung der Kandidatengene

Neben den Kriterien der Position in dem feinkartierten QTL-Bereich und der funktionellen Bedeutung der Kandidatengene wurde auch eine vergleichende Kartierung mit dem menschlichen Genom durchgeführt. Die Kombination der genutzten Kriterien für die Auswahl der Kandidatengene stellte nach Ron und Weller (2007) eine optimale Grundlage dar solche Gene zu finden, welche mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einer Merkmalsbeeinflussung führen. Die vergleichende Kartierung ermöglichte es, alle verfügbaren Informationen auch solcher Gene aus der humanen Genomforschung zu nutzen, welche beim Rind noch nicht identifiziert bzw. verifiziert wurden (Andersson et al., 1996; Georges, 2001; Antoniou et al., 2002). Ein Beispiel hierfür ist die Arbeit von Weikard et al. (2006). Durch die komplette Sequenzierung des bovinen Genoms ist zwar die Lage aller Gene beim Rind bekannt, bei einigen dieser Gene fehlt jedoch die genaue Annotierung, weshalb diese nur durch eine Nummer in der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) gekennzeichnet sind. Eine vergleichende Analyse erwies sich in dem untersuchten QTL-Bereich daher als sinnvoll. Die eingegrenzte Region auf BTA02 zeigte sich ortholog zum humanen Chromosom 2 (HSA2). Diese Feststellung stimmt mit den Ergebnissen der Arbeit von Liu et al. (2003) überein. Über vergleichende Studien publizierter immunrelevanter QTLs die Anzahl der in Frage kommenden Gene weiter eingrenzen zu können (Jann et al., 2009), war in der vorliegenden Arbeit nicht möglich, da in der Assoziations-Datenbank (Genetic Association Database, GAD) beim Menschen keine Informationen über immunrelevante Assoziationen im untersuchten Bereich gefunden werden konnten.

Die erfolgreiche Anwendung vergleichender Expressionsstudien zur Eingrenzung der Anzahl potentieller Kandidatengene in so genannten *Susceptibility Loci* für bakterielle Krankheiten konnte bereits bei ähnlich aufgebauten Studien gezeigt werden (Banus et al., 2006; Banus et al., 2007; Hu et al., 2009). Tatsächlich konnte der Informationsgehalt bezüglich der funktionellen Relevanz der im QTL-Bereich befindlichen Gene zusätzlich durch die im Rahmen des Projekts FUGATO „M.A.S.-Net“ angefertigten Expressions-Studien (Hartmann, persönliche Kommunikation) erhöht und die Anzahl der in Frage kommenden Gene reduziert werden.

Durch das Ranking der differentiell exprimierten Gene, welches auf ihren Expressions-Scores und der publizierten Funktion der Gene basierten, konnten die Ergebnisse der

Expressionsanalyse insoweit optimiert werden, als dass die angefertigte Rangliste die von Zhu und Zhao (2007) thematisierte Gefahr begrenzte, Gene nach rein subjektiven Gesichtspunkten auszuwählen. Ein Risiko stellte hierbei jedoch die Tatsache dar, dass gegebenenfalls solche Gene nicht erfasst wurden bzw. einen geringeren Score erhielten, deren physiologische Rolle nicht mit der für die Rangliste verwendeten Stichwörterliste übereinstimmte oder deren Einfluss sich nicht in einer differentiellen Genexpression widerspiegelte. Dieses wurde durch weitere Recherchen im Internet für diejenigen positionellen Kandidatengene, die differentiell exprimiert waren, und für alle nicht durch die Expressionsstudie erfassten Gene des QTL-Bereichs begrenzt. Eine solche Vorgehensweise erwies sich außerdem deshalb als sinnvoll, da in dem ausgewählten Bereich nur wenige Gene lagen, die eine offensichtliche Rolle im Immungeschehen spielten. Dies spiegelte sich auch in den Ergebnissen der GeneScore-Analyse wider. Bei der absichtlich sehr allgemein gehaltenen Suche mit Wörtern wie *immune* oder *immunity* ergaben innerhalb des ausgewählten Bereiches nur insgesamt 5 Gene einen Score, welcher in einem Bereich zwischen 0,14 (*CXCRI*) und 0,01 (*LANCLI*) lag, wohingegen das laut GeneScore wahrscheinlichste Gen auf BTA02 (*CD28*), welches jedoch nicht in Intervall 15 lag, einen Score von 27,02 hatte.

Bei der im Verlauf des Projektes getroffenen Auswahl der Kandidatengene wurde das QTL-Intervall 15 herangezogen, welches im Rahmen einer vorläufigen Berechnung (vom Juni 2007) ausgewählt wurde (vergleiche Kapitel 3.2.1). Dieses Intervall befand sich im Bereich zwischen 41,6 und 48,6 cM auf BTA02. Nach weiterentwickelten Analysen zeigte die endgültige QTL-Kurve, dass sich ein QTL-Peak mit einer *Likelihood Ratio* von 20 weiter proximal auf BTA02 bei ca. 30 cM und ein weiterer mit einer *Likelihood Ratio* von ca. 16,5 bei ca. 45 cM befinden. Die potentielle Relevanz der Gene für den QTL auf BTA02 blieb jedoch trotz dieser Ergebnisse bestehen, da die Kandidatengene weiterhin in dem für den QTL genomweit-signifikanten Bereich lagen und sich überdies in dem für den vorderen QTL-Peak angegebenen Konfidenzintervall von 95 %, welcher sich über 38 cM erstreckt, befanden (Abbildung 43).

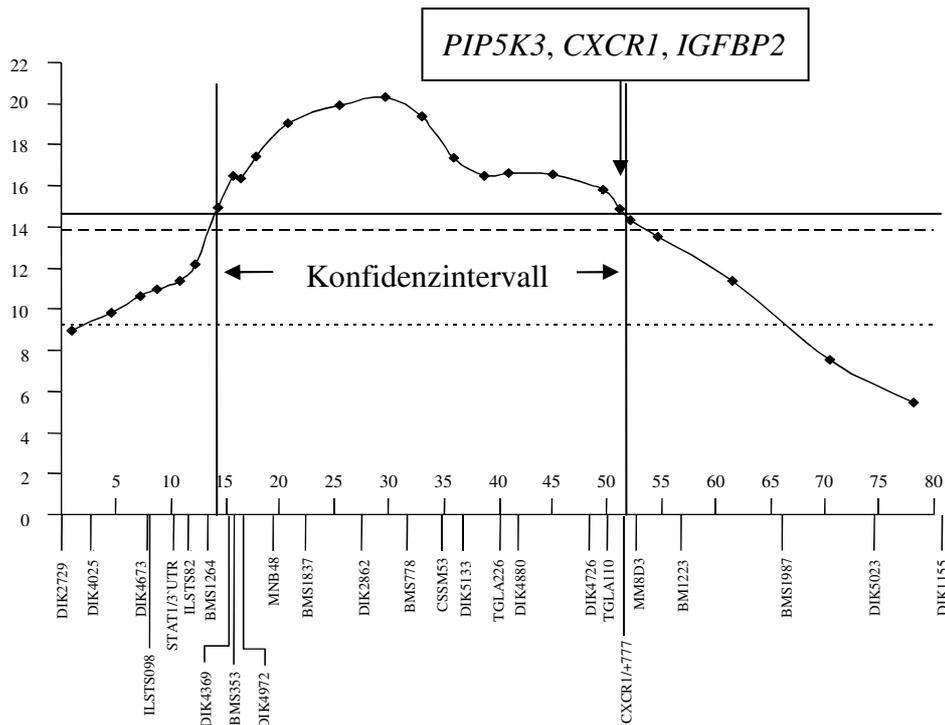


Abbildung 43: Kurve der Kopplungsanalyse auf BTA02. Eingezeichnet sind das 38 cM große Konfidenzintervall des vorderen QTL-Peaks sowie die ungefähre Lage der untersuchten Kandidatengene. Die durchgezogene Linie gibt die Begrenzung des Konfidenzintervalls an, die gestrichelte Linie die genomweite Signifikanzgrenze sowie die gepunktete Linie die chromosomweite Signifikanzgrenze.

Der von Cobanoglu et al. (2006) beschriebene Polymorphismus in der 3'UTR des *STAT1* wurde für die Untersuchung ausgewählt, da in der Studie ein knapp über der Signifikanzgrenze liegender p-Wert für den Einfluss des Genotyps auf die Höhe der SCC bei Holstein Friesians gefunden wurde. Da *STAT1* – wie nachgewiesen – bei der Entstehung von Infektionen eine Rolle spielt (Durbin et al., 1996; Meraz et al., 1996) und die Funktion seiner Liganden im Immungeschehen und der Pathogenese von Mastitiden offensichtlich ist (Taylor et al., 1997; Paape et al., 2003c), war das Gen bereits zu Beginn der Kartierungsstudien ein funktionelles Kandidatengene. Der SNP repräsentierte zudem auf Grund der geschätzten Allelfrequenz für C von 0,6 in der Dt. Holstein Population auch für Kartierungsstudien einen geeigneten Marker, weshalb alle 10 Familien typisiert und die Ergebnisse der Typisierung mit in die Kartierung des QTLs aufgenommen wurden. Hierdurch wurde eine feinere Kartierung zwischen den Markern ILSTS098 und ILSTS82 gewährleistet, welche nach Einbezug weiterer Marker (Multiplex 5, Tabelle 25) ergab, dass in dem vorderen Bereich kein QTL vorhanden war (Abbildung 43). Dieses Ergebnis stimmt mit dem Ergebnis der Assoziationsanalyse für den SNP *STAT1/3'UTR* überein.

Das Gen *CXCR1* wurde primär auf Grund der funktionellen Rolle des IL-8-Rezeptors A im Entzündungsgeschehen ausgewählt. Die potentielle Relevanz des Rezeptors wurde durch gefundene Assoziationen zwischen Mutationen in *CXCR1* und Mastitis bzw. der Höhe der SCC bestätigt (Youngerman et al., 2004a; Leyva-Baca et al., 2008b). Da das Gen *CXCR1* nicht bei den für diese Arbeit verwendeten Expressionstudien (Hartman, persönlich Mitteilung) untersucht wurde, konnte keine Aussage über eine differente Expression des Gens in diesem Tiermaterial getroffen werden.

Bei der Auswahl der SNPs wurde die Entscheidung für die SNPs *CXCR1/5`UTR/-1768* und *CXCR1/+777* getroffen, da für beide SNPs in der Literatur eine Assoziation mit Mastitis bzw. dem SCS beschrieben wurde (Youngerman et al., 2004a; Leyva-Baca et al., 2008b).

Der SNP *CXCR1/Ex1/+199* wurde ausgewählt, da es sich um einen nicht-synonymen SNP mit einem Blossum-Score von 0 handelte, welcher zudem eine geschätzte Allelfrequenz für C von 0,56 in der Population Dt. Holstein aufwies.

Da der SNP *CXCR1/5`UTR/-96* eine Allelfrequenz für A von 0,53 in der Population Dt. Holstein besaß und eine potentielle Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor C/EBP (*CCAAT/enhancer binding protein family of basic region/leucin zipper transcriptional factors*) darstellte, schien er im Rahmen der behandelten Fragestellung attraktiv. Die Begründung lag in dem Wissen, dass bei C/EBPε-defizienten Mäusen die Migration neutrophiler Granulozyten im Gegensatz zu Wild-Typ Mäusen wesentlich reduziert und C/EBPε demnach für diese Funktion bedeutend ist (Lekstrom-Himes und Xanthopoulos, 1999). Ogorevc et al. (2008) gehen – basierend auf Expressionstudien und der Lage von *C/EBPβ* in QTL-Regionen – von einer potentiellen Rolle des Gens bei Mastitisempfindlichkeit aus. Da die Funktion des IL-8-Rezeptors A bei der Migration eine wichtige Voraussetzung darstellt, besteht die Möglichkeit, dass es durch die Mutation in der potentiellen C/EBP-Bindungsstelle zu einem Defekt in der Funktionalität des Rezeptors kommt und eine hierdurch gestörte Migration dazu führt, dass die Kühe nicht mehr effektiv auf eindringende Erreger reagieren können. Die Tatsache, dass der TFSEARCH-Score bei der Base A an der polymorphen Position des potenziellen Bindungsmotifs unter dem angewandten Schwellenwert lag (81,5) und die Base G einen Score von 89,1 erreichte, sprach für eine solche Hypothese.

IGFBP2 erfüllte alle angewandten Auswahlkriterien. Als funktionelles Kandidatengen kam *IGFBP2* basierend auf der von Föll et al. (1998) sowie Hettmer et al. (2005) postulierten Funktion des Gens als lokaler Wachstumsfaktor bei der Proliferation und Aktivierung

mononukleärer Zellen in Frage, welche bei der Entstehung von intramammären Infektionen eine Rolle spielen (Sordillo und Streicher, 2002). Der Nachweis steigender IGFBP2-Konzentrationen im Blut nach *E. coli*-LPS-Injektion sowie in der Milch infizierter Euter (Shuster et al., 1995; Lang et al., 1997; Meyer, 2006) wies überdies auf eine Beteiligung von IGFBP2 bei Infektionen, insbesondere solcher der Milchdrüse, hin. Ferner bestätigte die nachgewiesene differente Expression von *IGFBP2* in den Expressionsstudien (Hartman, persönliche Mitteilung) die Auswahl des Gens als funktionelles Kandidatengen.

Das Fehlen der in der genomischen Sequenz von *IGFBP2* (NC_007300) des Rindes angegebenen Exons II und III in der mRNA (NW_174555) des Gens ist durch eine falsche Angabe in der PubMed-Datenbank zu erklären. Da auch das humane Gen nur aus vier Exons besteht, deren Sequenz sich nicht in dem Bereich der Exons II und III des Rindes befinden, sondern den Exons I, IV, V und VI dieses entsprechen, ist es durchaus wahrscheinlich, dass die in der Sequenz des Rinds angegebenen Sequenzabschnitte keine Exons darstellen. Eine weitere Erklärung für das Fehlen der Exons II und III in der mRNA könnte das Herausspleißen der Exons während des Spleißens der prä-mRNA sein. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten in der das Exon III umgebenden Sequenz am Ende des Intron II bzw. am Anfang des Introns III die zu 99 % als Spleißdonor- bzw. -akzeptorstellen vorkommenden Basen AG bzw. GT (Baten et al., 2006) nachgewiesen werden. Auch vor dem Exon II konnte am angegebenen Ende des Introns I eine potentielle Spleißakzeptorstelle (AG) bestätigt werden. Am angegebenen Beginn des Intron II war jedoch die als Spleißdonorstelle vorkommende Basenabfolge GT nicht vorhanden. Es ist allerdings bekannt, dass die Basenabfolge GC, wie sie am Beginn des Introns II gefunden wurde, die einzige Mutation in der Spleißdonorstelle ist, durch welche ein korrektes Spleißen in 20 % der Fälle weiterhin möglich ist (Chen und Chasin, 1993). In 80 % der Fälle kommt es durch diese Basenabfolge jedoch zum *Exon Skipping*, welches eine weitere Erklärung für das Fehlen der Exons II und III in der mRNA darstellt. Auch beim Exon III besteht die Möglichkeit, dass in der der mRNA-Sequenz NW_174555 zugrunde liegenden DNA, Mutationen in der Spleißakzeptor- bzw. -donorstelle zu einem *Exon Skipping* geführt haben. Da bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Tiere in der Nähe der Exons keine Mutationen nachgewiesen wurden, ist diese Theorie jedoch eher unwahrscheinlich und favorisiert die Vermutung, dass die in der Pubmed-Datenbank als Exon II und III beschriebenen Genbereiche keinen Exons entsprechen.

Bei den innerhalb dieser Arbeit untersuchten Tieren wurden trotz der Sequenzierung aller Exonbereiche nur im Intron 1 bzw. Intron 3 Polymorphismen nachgewiesen. Es ist daher davon auszugehen, dass das Gen beim Rind vor allem in kodierenden Regionen einen hohen Monomorphiegrad aufweist. Auch Untersuchungen innerhalb anderer Spezies sprechen für eine geringe Variabilität in eben diesen Genregionen. So wurden in der Literatur bisher nur wenige Polymorphismen bekannt, bzw. lagen diese beim Huhn in nicht-kodierenden Bereichen (Li et al., 2006; Leng et al., 2009).

Auf die Untersuchung der Bereiche inmitten der Intronstruktur von *IGFBP2* wurde verzichtet. Es wird zwar vermutet, dass Polymorphismen in solchen Gebieten gegebenenfalls eine Wirkung auf die mRNA-Stabilität haben können, die Wahrscheinlichkeit, dass eine solche Mutation den Phänotyp beeinflusst, wird von Tabor et al. (2002) jedoch als sehr gering eingestuft. Die Erwartungen diesbezüglich sind wiederum bei Polymorphismen in Intron-Exon-Grenzbereichen höher (Risch, 2000). Da innerhalb der vorliegenden Arbeit diese Bereiche, inklusiv aller Exons des Gens, sequenziert wurden, kann davon ausgegangen werden, dass alle relevanten Bereiche von *IGFBP2* auf das Vorhandensein von Polymorphismen untersucht wurden.

Die SNPs in Intron 3 wurden für weiterführende Analysen nicht ausgewählt, da sie sich in einem Bereich befanden, welcher sich bei der Analyse mit dem Vista Browser als gering konserviert herausstellte. Überdies wurde von keinem der 3 Polymorphismen das Auswahlkriterium, die Lage in einer potentiell relevanten Transkriptionsfaktorbindungsstelle, hinreichend erfüllt. Der an Position +55 im ersten Intron des Gens gefundene SNP wurde für die Assoziationsanalyse ausgewählt, da er sowohl beim Rind als auch beim Menschen und der Maus in einer potentiellen Bindungsstelle des Transkriptionsfaktors NF-kappaB lag. Wie erwähnt, birgt eine solche Mutation eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Expression des Gens in den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Expressionsstudien. Die Tatsache, dass NF-kappaB bei coliformen intramammären Infektionen in der frühen Phase der Immunantwort essentiell ist (Notebaert et al., 2008), lässt gerade diesem TF eine hohe Priorität zukommen. Sequenzmotive für Transkriptionsfaktoren liegen üblicherweise in der Nachbarschaft des *transcription starting points* des Promotors, der sich in der 5`UTR der Gene befindet (Geldermann, 2005). Für NF-kappaB konnte jedoch durch ein *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA) (Garner und Revzin, 1981) eine funktionelle Bindungsstelle im ersten Intron des *Multi Drug Resistance*-Gens (*MDR1*) nachgewiesen werden (Bentires-Alj et al., 2003). Diese Erkenntnis steigerte die Erwartung, dass es sich auch bei dem gefundenen SNP im ersten Intron von *IGFBP2* um eine funktionelle Bindungsstelle handelt. Die

Überschreitung des Schwellenwerts des TFSEARCH-Scores bei Vorhandensein der Base A beim Rind und Mensch und die hohe Differenz der Scores zwischen den beiden Basensprachen ferner für eine potentielle Relevanz der Mutation im ersten Intron von *IGFBP2* für die Bindung von NF- kappaB.

Das Gen *PIP5K3* wurde als Kandidatengen ausgewählt, da es differentiell exprimiert wurde und in dem untersuchten QTL lag. Es kommt daher sowohl als funktionelles, als auch positionelles Kandidatengen in Frage. Seine Funktion im Säugetier ist bisher jedoch nicht hinreichend untersucht worden, um einen tatsächlichen Zusammenhang mit immunologischen Geschehen begründen zu können. Daher ist auch die Erklärung der differentiellen Expression schwierig. Die Tatsache, dass das Gen in T-Lymphozyten des Menschen stark exprimiert wird (Su et al., 2004), und die in der Literaturübersicht angesprochenen Funktionen von *PIP5K3* im Bezug auf Vakuolen/Lysosomen bieten jedoch mögliche Anhaltspunkte.

Für *PIP5K3* wurden Nonsense-Mutationen in Exons als Ursache für die *François-Neetens Fleck Corneal Dystrophy* (CFD) nachgewiesen (Li et al., 2005). Die Möglichkeit eines durch Mutation bedingten Proteinabbruchs konnte bei den im bovinen *PIP5K3* gefundenen SNPs jedoch ausgeschlossen werden, da die durch die Mutation veränderten Basentriplets keinem der 3 bekannten Stopcodons entsprachen. Bei den in den Exons des Gens gefundenen Polymorphismen handelte es sich um 2 nicht-synonyme Mutationen (*PIP5K3/Ex19/+58* und *PIP5K3/Ex26/+69*) sowie um eine synonyme Mutation (*PIP5K3/Ex19/+792*). Der Polymorphismus *PIP5K3/Ex19/+792* wurde auf Grund der geringen Wahrscheinlichkeit, dass ein synonymer SNP mit Krankheiten assoziiert ist (Tabor et al., 2002), von der weiteren Untersuchung ausgeschlossen. Der SNP *PIP5K3/Ex19/+58* wurde infolge seiner geringen Allelfrequenz nicht weiter untersucht, da ein Polymorphismus für Kandidatengenstudien eine Frequenz von mindestens 5 % aufweisen sollte (Risch, 2000). Da die Mutation *PIP5K3/Ex26/+69* eine Allelfrequenz von 14 % für das Allel G aufwies, wurden die Nachkommen der für diesen SNP heterozygoten Bullen untersucht. Der SNP *PIP5K3/Int18/-112* wurde nicht weiter analysiert, da es keinen Hinweis auf eine relevante Funktion gab.

5.5 Assoziationsanalyse der Kandidatengene

Durch die Varianzkomponentenanalyse mit den Genotypen des jeweiligen SNPs als fixem Effekt konnte direkt der Einfluss des putativen QTLs (SNP) geprüft werden. Mittels dieser Methode bestand die Möglichkeit direkt abzuschätzen, ob andere Gene eine Rolle spielen, bzw. wie hoch der Anteil des putativen QTLs an der genetischen Varianz ist. Da diese

Analyse danach ausgerichtet war, ein populationsweites LD zu suchen, wurde für die Untersuchung innerhalb der heterozygoten Familien ein weiteres Modell genutzt. Mit der Berechnung der Assoziation für jede der 3 Laktationen einzeln wurde außerdem dem Fakt Rechnung getragen, dass die SCC in den verschiedenen Laktationen nicht dieselbe Heritabilität hat (Haile-Mariam et al., 2001; Carlén et al., 2004). Dies wird auch in der deutschen Zuchtwertschätzung, in der verschiedene Werte für die Heritabilität in der 1. und 2. im Gegensatz zur 3. Laktation angewendet werden, berücksichtigt (VIT, 2009).

Für keinen der untersuchten SNP konnte eine signifikante Assoziation zwischen dem Genotypen und der Höhe der somatischen Zellzahl gefunden werden. Wie oben angesprochen, lagen die ausgewählten Gene zwar in dem Konfidenzintervall des endgültigen QTL-Bereichs, dieser Bereich erstreckte sich jedoch über 38 cM. Ein solcher Bereich kann immer noch 200 bis 400 potentielle Kandidatengene enthalten (Georges, 2007), wodurch die Wahrscheinlichkeit, aus diesen Genen das ursächliche Gen auszuwählen, stark eingeschränkt wird. Basierend auf der Meinung, dass ein quantitatives Merkmal von einigen Hauptgenen und vielen Genen mit sehr geringem Effekt beeinflusst wird (Farrall, 2004), besteht die Möglichkeit, dass der Einfluss der Gene bzw. der untersuchten Mutationen auf den Phänotypen für das Auffinden einer statistischen Signifikanz zu gering ist (Cardon, 2006). Bei Genen mit geringem Effekt ist für die Feststellung einer Assoziation vor allem die Größe des Tiermaterials entscheidend (Risch und Merikangas, 1996a). Long und Langley (1999) geben jedoch an, dass ab einer Probenzahl von 500 Tieren Assoziationsstudien genug statistische Power besitzen um ursächliche Polymorphismen mit geringem Effekt (< 5 %) zu detektieren. Da in der vorliegenden Arbeit knapp 600 Tiere genutzt wurden, kann davon ausgegangen werden, dass die Erweiterung des Tiermaterials keinen weiteren statistischen Vorteil gebracht hätte. Betrachtet man außerdem die Tatsache, dass auch bei einem relativ kleinen genotypischen Risiko (die erhöhte Chance, dass ein Individuum mit einem bestimmten Genotyp die Erkrankung hat) von nur 1,5 mit weniger als 1000 Proben eine Assoziation nachgewiesen werden kann (Risch und Merikangas, 1996a), ist anzunehmen, dass, sollten die untersuchten SNPs doch einen genetischen Effekt ausüben, dieser extrem gering sein muss und daher eher keine züchterische Relevanz besitzt.

Die Mittelwerte der DYDs für die Genotypen aller drei für den SNP *CXCRI/5'UTR/-1768* heterozygoten Familien zeigen in den einzelnen Laktationen eine typische Verteilung, wie sie bei einem geringen genetischen Effekt des SNPs auf ein Merkmal zu erwarten ist (Abbildung

44). In allen 3 Laktationen liegt eine gleichgerichtete Genotypverteilung vor. Demnach ist bei Tieren mit dem Genotyp AT der niedrigste DYD-Wert bzw. die höchste SCC zu erwarten. Tiere mit dem Genotyp AA haben einen höheren DYD und Tiere mit dem Genotyp TT den höchsten, d.h. die niedrigste SCC. Auf Grund der geringen Unterschiede der Genotypen AA und AT kann dies jedoch nicht statistisch abgesichert werden. Dies zeigte sich gerade in der 1. Laktation, in welcher der Wert knapp über der Signifikanzgrenze lag ($p=0,055$).

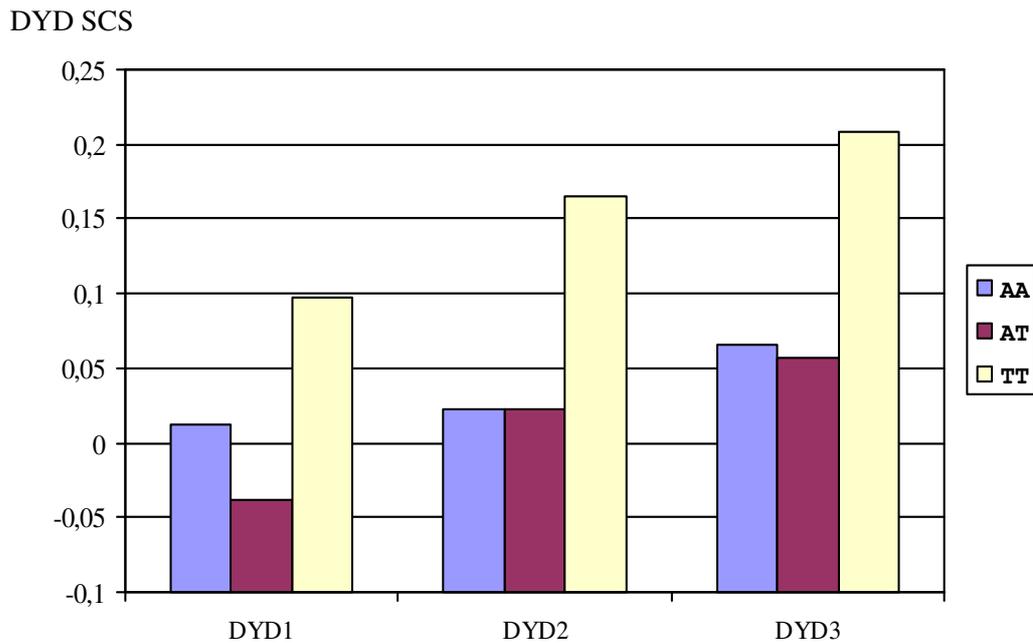


Abbildung 44: Mittelwerte der DYDs für die Genotypen des SNPs *CXCR1/5`UTR/-1768* in der 1. (DYD1); 2. (DYD2) und 3. Laktation (DYD3). Eingeflossen sind die Daten der 3 für diesen SNP heterozygoten Familien ADR-MAS 2, 5 und 6.

Abbildung 45 zeigt jedoch, dass dieses Ergebnis nur auf Grund der Zusammenfassung der Familiendaten zu einem Datenmaterial entstanden ist und nicht die eigentliche Genotypassoziation widerspiegelt. Bei der getrennten Betrachtung der Verteilung der Mittelwerte für die Genotypen von *CXCR1/5`UTR/-1768* in den heterozygoten Familien (Abbildung 45, 1. Laktation) zeigt sich, dass, im Gegensatz zu den Familien ADR-MAS 5 und 6, in der Familie ADR-MAS 2 der Genotyp AT nicht mit dem niedrigsten DYD-Wert d.h. der höchsten SCC assoziiert ist und daher die oben aufgestellte Vermutung nicht zutrifft.

Dieses Ergebnis verdeutlicht die Relevanz der Berechnung innerhalb der einzelnen Familien, da bei einer Assoziation der Genotypen mit einem bestimmten Merkmal auch die Genotypverteilung zwischen den einzelnen Familien eine gleichgerichtete Tendenz aufweisen muss. Es kann daher ausgeschlossen werden, dass für den SNP *CXCR1/5`UTR/-1768* der

oben diskutierte Fall zutrifft. Ebenso konnte dies für alle weiteren untersuchten Polymorphismen ausgeschlossen werden.

DYD SCS

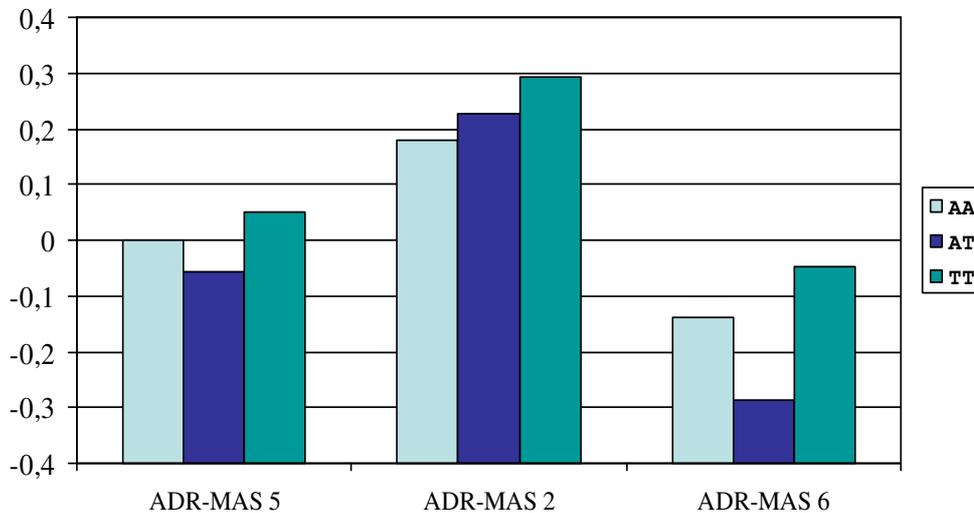


Abbildung 45: DYD-Mittelwerte der 1. Laktation für die Genotypen des SNPs *CXCR1/5'UTR/-1768* in den für diesen SNP heterozygoten Familien ADR-MAS 2, 5 und 6.

Eine weitere Erklärung für die Ergebnisse der Assoziationsanalyse kann darin liegen, dass es sich bei den untersuchten Polymorphismen nicht um ursächliche Mutationen handelt. Basierend auf der These der *Purifying Selection* (Thomas et al., 2003) ist die Wahrscheinlichkeit tatsächlich ursächliche Mutationen zu finden unabhängig von den verwendeten Auswahlkriterien generell relativ gering.

In der vorliegenden Arbeit bestand ein Auswahlkriterium für Kandidatengene in der Bestimmung von Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren. Die Untersuchungen zur Lage der SNPs in potentiellen Transkriptionsfaktoren wurden *in silico* mit dem Programm TFSEARCH 1.3 (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>) durchgeführt. Dieses sucht hoch korrelierte Sequenzfragmente basierend auf Informationen aus der TF-Datenbank TRANSFAC. Je nach Grad der Übereinstimmung mit einer TF-Bindungsstelle und der Wahrscheinlichkeit des zufälligen Auftretens der Bindungsstelle (je kürzer die Bindungssequenz, desto häufiger tritt sie auf) bekommt ein „Treffer“ eine Wertungszahl zwischen 1 und 100. Dabei ist 100 der Wert bestmöglicher Übereinstimmung bzw. unwahrscheinlichster Zufälligkeit des Auftretens (Eggers, 2003). Bei den untersuchten Sequenzen bewirkte die Mutation zwar einen Anstieg des Scores über den Schwellenwert, der Score überschritt jedoch nicht den Wert 90. Überdies können die Ergebnisse einer *in-silico*-Analyse niemals beweisend für die funktionelle Bedeutung einer solchen Sequenz sein, da

Bindungssequenzen in der Regel kürzer als 10 Basenpaare sind und daher im Genom auch zufällig vorkommen können, ohne eine Funktion zu erfüllen (Weitzman, 2003). Um mit Sicherheit sagen zu können, ob es sich um eine Bindungsstelle handelt, wäre die Durchführung eines EMSA nötig, mit dessen Hilfe durch den Nachweis von Protein-Nukleinsäure-Interaktionen die funktionelle Bedeutung einer Sequenz als Bindungsstelle für Transkriptionsfaktoren belegt werden kann (Garner und Revzin, 1981; Bentires-Alj et al., 2003).

Für die Einschätzung der Relevanz der AS-Austausche wurde die Blossum62-Matrix angewendet. Da es sich bei dieser Matrix um eine Ähnlichkeits-Matrix handelt, kann mit Hilfe der Scores eine Aussage über die Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer Substitution und damit auch indirekt über die mögliche Auswirkung einer solchen auf die Proteinfunktion getroffen werden. Positive Scores deuten an, dass es sich bei dem Austausch um eine konservierende Substitution handelt, während negative Scores eher nicht-konservierende Substitutionen angeben (Henikoff und Henikoff, 1992). Die Ergebnisse gaben einen Hinweis auf eine mögliche Bedeutung der AS-Austausche. Die Tatsache, dass die erreichten Scores alle zwischen 0 und 2 lagen, und die Ergebnisse der Assoziationsanalyse lassen schlussendlich jedoch die Annahme zu, dass es sich bei den untersuchten SNPs um konservierende Substitutionen handelt.

Einen weiteren Hinweis auf die Vermutung, dass es sich bei den untersuchten Mutationen in den UTRs nicht um ursächliche Mutationen handelt, geben die Ergebnisse des durchgeführten *Phylogenetic Footprinting* (Tagle et al., 1988), welches durch Sequenzvergleiche von Genen verschiedener Spezies sichtbare Konservierungen biologisch relevanter Motive nutzt (Weitzman, 2003). Stark konservierte Sequenzen weisen auf eine funktionelle Bedeutung des Bereiches hin, wohingegen Bereiche mit geringer Konservierung, wie es bei den vorliegenden SNPs der Fall ist, eher gegen eine solche sprechen (Tabor et al., 2002; McCauley et al., 2007).

Da in den heterozygoten Familien für alle 3 Laktationen beim SNP *STAT1/3`UTR* und für die erste Laktation beim SNP *IGFBP2/Int1/+55* eine signifikante Interaktion zwischen Genotyp und Vater festgestellt wurde, bestand die Vermutung, dass die beiden Marker mit dem ursächlichen SNP gekoppelt sind. Bei einer solchen Kopplung liegt ein Kopplungsungleichgewicht (LD) in den einzelnen Familien vor, wobei die Kopplung der jeweiligen Allele in den einzelnen Familien genau gegenteilig sein kann. Die im Ergebnisteil in Abbildung 42 abgebildeten Mittelwertverteilung bezüglich des SNP *STAT1/3`UTR* in den

Familien ADR-MAS 2 und 4 zeigt ein solches Bild. Allein betrachtet kann man von einer für die Familie ADR-MAS 2 familienspezifischen Kopplung des Allels T mit einem hohen DYD für SCC ausgehen, wohingegen in der Familie ADR-MAS 4 das Allel C mit dem Allel des QTL für hohe somatische Zellzahl gekoppelt ist. Bei einer solchen Verteilung besteht – im Gegensatz zur Familienebene – auf Populationsebene ein Kopplungsgleichgewicht zwischen dem Markerallel und dem QTL, wodurch die fehlende Signifikanz bei den Berechnungen zu erklären ist. Betrachtet man jedoch die Mittelwertverteilung aller heterozygoten Familien, so wird deutlich, dass diese Hypothese auf den SNP *STAT1/3`UTR* nicht zutrifft, da in jeder Familie eine andere Verteilung der Mittelwerte der DYDs für die einzelnen Genotypen vorherrscht. Gleiches gilt auch für den SNP *IGFBP2/Int1/+55*.

Die Tatsache, dass für die SNPs *CXCR1/5`UTR/-1768* und *CXCR1/+777* in anderem Tiermaterial eine Assoziation mit der SCC gefunden werden konnte, dies innerhalb dieser Arbeit jedoch nicht bestätigt wurde, spiegelt eine allgemeine Erkenntnis im Bezug auf Assoziationsstudien wieder. Die Kritik vieler Wissenschaftler an Assoziationsstudien bezieht sich auf die mangelnde Reproduzierbarkeit von Ergebnissen in unabhängigen Studien (Ioannidis et al., 2001; Tabor et al., 2002). Ein Grund hierfür kann in der Größe des untersuchten Tiermaterials liegen. In der Studie von Youngerman et al. (2004a) wurden die Daten von 37 Holstein Friesian Kühen genutzt, wohingegen in der vorliegenden Arbeit die Daten von insgesamt 608 genotypisierten Bullen und je nach Laktation die Daten von 833.336 bis 404.832 Kühen der Rasse Dt. Holstein eingingen. Ein weiterer Grund für eine fehlende Reproduzierbarkeit kann in der untersuchten Population bzw. der Definition des Phänotypen liegen (Tabor et al., 2002). Häufig werden in unabhängigen Studien unterschiedliche Populationen untersucht, in denen die untersuchte DNA-Variante mit einem unterschiedlichen relativen Risiko assoziiert sein kann, wodurch die fehlende Reproduzierbarkeit auf Grund biologischer Differenz resultierten (Tabor et al., 2002). In den angesprochenen Studien wurden kanadische und US-amerikanische Holstein Friesian untersucht. Nach Hanslik et al. (2000) sind trotz intensivem Genfluss *New World*- und *Old World*-Populationen der Rasse Holstein Friesian signifikant unterschiedlich. Den gleichen Trend konnten Kaupe et al. (2004) bei der Untersuchung des *DGATI*-Locus feststellen. Demnach ist es möglich, dass auch in der vorliegenden Arbeit die fehlende Reproduzierbarkeit durch biologische Differenzen in den untersuchten Populationen entstanden ist. Auch die Tatsache, dass eine funktionelle Bedeutung der SNPs anhand Genotyp-spezifischer Unterschiede in der Funktion neutrophiler Granulozyten (Rambeaud und Pighetti, 2005; Rambeaud et al., 2006) bzw. einer Genotyp-

spezifischen Genexpression (Leyva-Baca et al., 2008a) gefunden wurde, könnte durch diese Hypothese begründet sein. Sowohl die Untersuchungen bezüglich der funktionellen Bedeutung des SNPs *CXCRI/+777* sowie des SNPs *CXCRI/5'UTR/-1768* wurden in denselben Arbeitsgruppen durchgeführt, welche auch die jeweilige Assoziation des Genotyps mit der Höhe der somatischen Zellzahl feststellten. Es handelt sich bei den Untersuchungen demnach nicht um unabhängige Studien. Aus diesem Grund sind die Verwendung von gleichem Tiermaterial bei den Assoziationsanalysen und den weiterführenden funktionellen Analysen und damit der Einfluss des Tiermaterials auf die Ergebnisse nicht auszuschließen.

Die Definition des Phänotyps kann ein weiterer Grund sein, weshalb Youngerman et al. (2004a) im Gegensatz zu der vorliegenden Studie und der Studie von Leyva-Baca et al. (2007; 2008b) eine Assoziation des SNP *CXCRI/+777* und der somatischen Zellzahl gefunden haben. In der vorliegenden Studie und den Studien von Leyva-Baca et al. (Leyva-Baca et al., 2007; Leyva-Baca et al., 2008b) beruht der SCS auf einem 305 Tage Durchschnitt, bei welchem durch ein Random-Regression-Testtagsmodell auch der Laktationszeitpunkt berücksichtigt wird. Aus der Veröffentlichung von Youngerman et al. (2004a) geht jedoch nicht hervor, ob es sich bei dem genutzten SCS auch um einen Laktationsdurchschnitt oder um Einzelmessungen handelt. Zahlreiche Untersuchungen zeigen, dass die Heritabilität der SCC je nach Zeitpunkt der Laktation differiert (Emanuelson et al., 1988; Rogers et al., 1995a; Haile-Mariam et al., 2001). Rogers et al. (1995a) gehen sogar davon aus, dass es sich bei der SCC in früher und später Laktation nicht um das gleiche Merkmal handelt. Sollten die Messungen in der Studie von Youngerman et al. (2004a) innerhalb eines bestimmten Zeitpunkts – gegebenenfalls mit hoher Heritabilität – durchgeführt worden sein, ist es möglich, dass hierdurch, im Vergleich zur Verwendung von regressierten Laktationsdurchschnitten, eine Assoziation gefunden werden konnte.

Anhand der für den SNP *CXCRI/5'UTR/-1768* diskutierten Analyse der Assoziationsergebnisse in den einzelnen Familien kann der Vorteil von Familienmaterial gegenüber Proben von unverwandten Tieren verdeutlicht werden. Sind Informationen über die Zugehörigkeit zu den einzelnen Familien vorhanden, kann die Verteilung der Genotypen innerhalb dieser geprüft werden. So werden wie im vorliegenden Fall eine falsche Einschätzung der Genotypverteilung und damit eine fälschlicherweise gefundene Assoziation vermieden. In den Studien von Youngerman et al. (2004a) und Leyva-Baca et al. (2008b) wurde nicht mit Familienmaterial gearbeitet, weshalb nicht ausgeschlossen werden kann, dass die gefundenen Assoziationen keine echten Assoziationen darstellen, sondern auf der Zusammensetzung des Tiermaterials beruhen.

Der im Rahmen dieser Arbeit untersuchte SNP *CXCR1/5`UTR/-96* wurde in den von Leyva-Baca et al. (2008b) zur Detektion von Polymorphismen sequenzierten Pools nicht gefunden. Diese Pools wurden aus Tieren mit extrem hohen bzw. extrem niedrigen DYDs gebildet, um so eine maximale genetische Varianz für das Merkmal zu erhalten (Leyva-Baca et al., 2008b). Die Arbeitsgruppe konnte nachweisen, dass eine SNP Detektion mit dieser Methode auch für Allelfrequenzen von 1 % möglich ist (Leyva et al., 2006). In einer anderen Studie wurde jedoch gezeigt, dass bei selektivem DNA-Pooling (*selective DNA pooling*) die Sensitivität einer Sequenzierung nach Sanger (Sanger et al., 1977) nicht ausreicht, um seltene Allele zu finden (Fakhrai-Rad et al., 2004). Auf Grund der Allelfrequenz des SNPs *CXCR1/5`UTR/-96* (Frequenz für A = 0,53) kann jedoch ausgeschlossen werden, dass der SNP bei Leyva-Baca et al. (2008b) wegen einer zu geringen Frequenz nicht erkannt wurde. Aus demselben Grund kann auch ausgeschlossen werden, dass die eingesetzte Tierzahl für das Auffinden des SNPs nicht ausreichte.

Detilleux et al. (2002) postulierten, dass es möglich ist, dass ein Gen Kühen eine Resistenz gegenüber spezifischen Pathogenen vermittelt, gegenüber anderen Pathogenen jedoch nicht. Durch die Natur des Merkmals SCC wird bei dessen Einsatz im Rahmen von Assoziationsstudien nicht zwischen den ursächlichen Pathogenen unterschieden. Es ist daher nicht auszuschließen, dass die untersuchten Gene die angesprochene pathogenspezifische Resistenz vermitteln, diese im Rahmen der vorliegenden Studie auf Grund des verwendeten Merkmals jedoch nicht aufgefunden werden konnte. Zur Überprüfung dieser These müssten Daten über Mastitiden und der ihnen zugrunde liegenden Pathogene genutzt werden.

Auch wenn die genomische Selektion mit Hilfe von SNP-Chips schon routinemäßig in der Zuchtwertschätzung eingesetzt wird und somit derzeit die seit 2005 durchgeführte markergestützte Selektion abgelöst hat (Reinhardt et al., 2011), sehen Fries und Pausch (2011) das eigentliche Ziel darin, möglichst die kausale DNA-Variation von Merkmalsvariationen festzustellen. Vor allem im Hinblick auf die züchterische Verbesserung von Gesundheitsmerkmalen messen die Autoren der expliziten Berücksichtigung von QTN an Stelle von QTLs eine hohe Bedeutung bei. Die rasante Weiterentwicklung der SNP-Chips und die damit zur Verfügung stehende hohe Dichte an Markern ermöglicht hierbei eine immer kostengünstigere und erfolgsversprechende Durchführung von Assoziationsstudien und letztendlich die Detektion einer der kausalen Genvarianten für die Mastitisresistenz beim Rind. Auch durch den Einsatz von SNP-Chips zur Untersuchung des in der vorliegenden

DISKUSSION

Arbeit beschriebenen QTLs ist es möglich, deutlich mehr potentiell kausale Genvarianten zu untersuchen und somit möglicherweise die ursächliche Variante des auf BTA02 detektieren QTL für SCC aufzufinden.

6 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, den von Bennewitz et al. (2003) auf BTA02 gefundenen QTL für die SCS beim Rind mittels weiterer Marker zu validieren und feiner zu kartieren. Unter Einbezug von Expressionsdaten, welche im Rahmen eines Teilprojektes bei Kühen mit einer genetisch differenten Prädisposition für Mastitis gewonnen wurden, sollten anschließend positionelle und funktionelle Kandidatengene innerhalb dieses QTLs ausgewählt werden und potenziell merkmalsassoziierte Varianten innerhalb dieser Gene auf eine Assoziation mit der Höhe der somatischen Zellzahl in der Rasse Dt. Holstein überprüft werden.

Durch die Anwendung eines Kopplungsgleichgewichts konnte der QTL für SCS auf BTA02 bestätigt und das Konfidenzintervall (Thomsen et al., 2000; Bennewitz et al., 2003) des QTLs von 128 cM auf 38 cM reduziert werden. Dies wurde durch den Einbezug weiterer sieben Familien und eine Erhöhung der Markeranzahl um das 4fache erreicht. Eingesetzt wurde ein *Granddaughter Design* mit insgesamt 10 Familien und 1121 nachkommengeprüften Söhnen, welche mit Hilfe von insgesamt 27 Markern (2 SNPs, 25 Mikrosatelliten) typisiert wurden. Des Weiteren wurde im Zuge einer Einzelmarkerregression ein signifikanter Einfluss der Marker (ILSTS098, $p < 0.05$; BMS778, $p < 0.01$) auf den QTL gefunden, wobei jedoch nur der Marker *BMS778* einen starken Effekt auf die QTL-Varianz ausübte.

Die Berechnung der exakten Markerpositionen ergab eine für die deutsche Holstein-Population spezifische Markerkarte für BTA02, die für weitere Analysen zur Klärung der Einflüsse dieses Chromosoms auf ökonomisch bedeutende Merkmale genutzt werden kann.

Innerhalb des genomweit-signifikanten, 38 cM großen Konfidenzintervalls des 1. QTL-Peaks wurden die Gene *Interleukin 8- Rezeptor A (CXCR1)*, *Insulin-Like-Growth-Factor-Bindungsprotein-2 (IGFBP2)* und *Phosphatidylinositol-3-Phosphate /Phosphatidylinositol 5-Kinase, Type III (PIP5K3)* als Kandidatengene ausgewählt und auf mögliche merkmalsbeeinflussende Genvarianten hin untersucht. Die Auswahl der Gene wurde hierbei durch den Einbezug der Genexpressionsdaten und Informationen über den funktionellen Hintergrund der Gene optimiert.

Für die molekulargenetische Charakterisierung der Kandidatengene wurde eine PCR-Direktsequenzierung durchgeführt. Innerhalb der sequenzierten Bereiche wurden 11

Mutationen detektiert, von denen sieben anhand der von Tabor et al. (2002) beschriebenen Kriterien für eine Assoziationsanalyse ausgewählt und mit Hilfe des vorhandenen Tiermaterials untersucht wurden. Zusätzlich wurde die Relevanz eines von Cobanoglu et al. (2006) beschriebenen Polymorphismus in *STAT1* geprüft.

Für keinen der untersuchten SNPs wurde eine signifikante Assoziation mit der somatischen Zellzahl gefunden. Auch die in der kanadischen bzw. amerikanischen Holstein Friesian Population gefundene Assoziation der Polymorphismen im Gen *CXCR1* (Youngerman et al., 2004a; Leyva-Baca et al., 2008b) und die mögliche Relevanz des Polymorphismus in *STAT1* (Cobanoglu et al., 2006) konnte nicht bestätigt werden.

Weitere Untersuchungen von Kandidatengen in der unmittelbaren Umgebung des Markers BMS778 sind in Betracht zu ziehen.

7 Summary

Aim of this study was the verification and the refined mapping of the QTL for SCS on BTA02, detected by Bennewitz et al. (2003). Following this, a selection of positional and functional candidate genes in the refined area should be made using expression data of cattle with a different predisposition to mastitis. Subsequently variants of these candidate genes should be analysed for their possible associations with somatic cell score in the Holstein Frisian population.

Using linkage analysis the QTL could be verified. Furthermore a successful reduction of the confidence interval from 128 cM (Thomsen et al., 2000; Bennewitz et al., 2003) to 38 cM was realised by increasing the number of markers 4-fold and analysing additional seven families. A granddaughter design of 10 German Holstein grandsire families with 1121 progeny tested sons - which were typed with 27 markers (2 SNPs, 25 microsatellites) - was used. Furthermore, two individual markers with a significant effect (ILSTS098, $p < 0.05$; BMS778, $p < 0.01$) on the QTL were found by regression analysis. However the marker ILSTS098 explained only a very small portion of the QTL variance, while BMS778 had a much greater effect.

Calculating the exact position of the used markers a specific marker map for the German Holstein population could be built, which may be used as a tool for further analysis of the potential influence of BTA02 on economically important traits.

Within the 38 cM confidence interval of the first QTL peak the following candidate genes were chosen and analysed for polymorphisms: *Interleukin 8- Receptor A (CXCR1)*, *Insulin-Like-Growth-Factor -Bindungsprotein-2 (IGFBP2)* and *Phosphatidylinositol-3-Phosphate /Phosphatidylinositol 5-Kinase, Type III (PIP5K3)*. This selection of genes was made by using expression data and considering their function in the metabolic pathway.

To detect polymorphisms, the candidate genes were sequenced. Within the sequenced areas 11 polymorphisms were detected. Applying the criteria of Tabor et al. (2002) seven of this polymorphisms were selected for association analysis. Additionally the relevance of a SNP in STAT1 detected by Cobanolgu et al. (2006) was tested. For all polymorphisms screening methods were established.

SUMMARY

Association studies did not reveal significant association between the polymorphisms and the somatic cell score. The association of two polymorphism in *CXCR1* found in the American and Canadian Holstein Friesian population (Youngerman et al., 2004a; Leyva-Baca et al., 2008b) and the potential relevance of the SNP in *STAT1* could not be confirmed in this study.

Further investigations of candidate genes in the QTL region now narrowed to 38 cM are considered with the region around the marker BMS778 as a suitable starting point.

8 Literatur

- Abdallah, J. M., Goffinet, B., Cierco-Ayrolles, C. and Perez-Enciso, M.** (2003): Linkage disequilibrium fine mapping of quantitative trait loci: a simulation study. *Genet Sel Evol* 35: 513-532.
- Abiola, O., Angel, J. M., Avner, P., Bachmanov, A. A., Belknap, J. K., Bennett, B., Blankenhorn, E. P., Blizard, D. A., Bolivar, V., Brockmann, G. A., Buck, K. J., Bureau, J. F., Casley, W. L., Chesler, E. J., Cheverud, J. M., Churchill, G. A., Cook, M., Crabbe, J. C., Crusio, W. E., Darvasi, A., de Haan, G., Dermant, P., Doerge, R. W., Elliot, R. W., Farber, C. R., Flaherty, L., Flint, J., Gershenfeld, H., Gibson, J. P., Gu, J., Gu, W., Himmelbauer, H., Hitzemann, R., Hsu, H. C., Hunter, K., Iraqi, F. F., Jansen, R. C., Johnson, T. E., Jones, B. C., Kempermann, G., Lammert, F., Lu, L., Manly, K. F., Matthews, D. B., Medrano, J. F., Mehrabian, M., Mittlemann, G., Mock, B. A., Mogil, J. S., Montagutelli, X., Morahan, G., Mountz, J. D., Nagase, H., Nowakowski, R. S., O'Hara, B. F., Osadchuk, A. V., Paigen, B., Palmer, A. A., Peirce, J. L., Pomp, D., Rosemann, M., Rosen, G. D., Schalkwyk, L. C., Seltzer, Z., Settle, S., Shimomura, K., Shou, S., Sikela, J. M., Siracusa, L. D., Spearow, J. L., Teuscher, C., Threadgill, D. W., Toth, L. A., Toyne, A. A., Vadasz, C., Van Zant, G., Wakeland, E., Williams, R. W., Zhang, H. G. and Zou, F.** (2003): The nature and identification of quantitative trait loci: a community's view. *Nat Rev Genet* 4: 911-916.
- Ahuja, S. K. and Murphy, P. M.** (1996): The CXC chemokines growth-regulated oncogene (GRO) alpha, GRObeta, GROgamma, neutrophil-activating peptide-2, and epithelial cell-derived neutrophil-activating peptide-78 are potent agonists for the type B, but not the type A, human interleukin-8 receptor. *J Biol Chem* 271: 20545-20550.
- Andersson, L., Archibald, A., Ashburner, M., Audun, S., Barendse, W., Bitgood, J., Bottema, C., Broad, T., Brown, S., Burt, D., Charlier, C., Copeland, N., Davis, S., Davisson, M., Edwards, J., Eggen, A., Elgar, G., Eppig, J. T., Franklin, I., Grewe, P., Gill, T., 3rd, Graves, J. A., Hawken, R., Hetzel, J., Hilyard, A., Jacob, H., Jaswinska, L., Jenkins, N., Kunz, H., Levan, G., Lie, O., Lyons, L., Maccarone, P., Mellersh, C., Montgomery, G., Moore, S., Moran, C., Morizot, D., Nicholas, F., O'Brien, S., Parsons, Y., Peters, J., Postlethwait, J., Raymond, M., Shook, L., Sugimoto, Y., Szpirer, C., Tate, M., Taylor, J., VandeBerg, J., Wakefield, M., Wienberg, J. and Womack, J.** (1996): Comparative genome organization of vertebrates. The First International Workshop on Comparative Genome Organization. *Mamm Genome* 7: 717-734.
- Andersson, L.** (2001): Genetic dissection of phenotypic diversity in farm animals. *Nat Rev Genet* 2: 130-138.
- Andersson, L. and Georges, M.** (2004): Domestic-animal genomics: deciphering the genetics of complex traits. *Nat Rev Genet* 5: 202-212.
- Antoniou, E., Gallagher, D., Jr., Taylor, J., Davis, S., Womack, J. and Grosz, M.** (2002): A comparative map of bovine chromosome 25 with human chromosomes 7 and 16. *Cytogenet Genome Res* 97: 128-132.
- Asai, K., Kai, K., Rikiishi, H., Sugawara, S., Maruyama, Y., Yamaguchi, T., Ohta, M. and Kumagai, K.** (1998): Variation in CD4+ T and CD8+ T lymphocyte subpopulations in bovine mammary gland secretions during lactating and non-lactating periods. *Vet Immunol Immunopathol* 65: 51-61.

- Ashwell, M. S., Rexroad JR., C. E., Miller, R. H., Vanraden, P. M. and Da, Y. (1997): Detection of loci affecting milk production and health traits in an elite US Holstein population using microsatellite markers. *Anim Genet* 28: 216-222.
- Ashwell, M. S., Heyen, D. W., Sonstegard, T. S., Van Tassell, C. P., Da, Y., VanRaden, P. M., Ron, M., Weller, J. I. and Lewin, H. A. (2004): Detection of quantitative trait loci affecting milk production, health, and reproductive traits in Holstein cattle. *J Dairy Sci* 87: 468-475.
- Ashwell, M. S., Heyen, D. W., Weller, J. I., Ron, M., Sonstegard, T. S., Van Tassell, C. P. and Lewin, H. A. (2005): Detection of quantitative trait loci influencing conformation traits and calving ease in Holstein-Friesian cattle. *J Dairy Sci* 88: 4111-4119.
- Auernhammer, C. J. and Strasburger, C. J. (1995): Effects of growth hormone and insulin-like growth factor I on the immune system. *Eur J Endocrinol* 133: 635-645.
- Baes, C. and Reinsch, N. (2007): Computing the condensed conditional gametic QTL relationship matrix and its inverse. *Arch Tierz* 50: 294-308.
- Baes, C., Görtz, I., Mayer, M., Weimann, C., Liu, Z., Reinhardt, F., Erhardt, G. and Reinsch, N. (2010): Refined mapping of quantitative trait loci for somatic cell score on BTA02 in the German Holstein. *J Anim Breed Genet* 127: 180-188.
- Ball, A. O. and Chapman, R. W. (2003): Population genetic analysis of white shrimp, *Litopenaeus setiferus*, using microsatellite genetic markers. *Mol Ecol* 12: 2319-2330.
- Banus, H. A., Vandebriel, R. J., de Ruiter, H., Dormans, J. A., Nagelkerke, N. J., Mooi, F. R., Hoebee, B., van Kranen, H. J. and Kimman, T. G. (2006): Host genetics of *Bordetella pertussis* infection in mice: significance of Toll-like receptor 4 in genetic susceptibility and pathobiology. *Infect Immun* 74: 2596-2605.
- Banus, S., Vandebriel, R. J., Pennings, J. L., Gremmer, E. R., Wester, P. W., van Kranen, H. J., Breit, T. M., Demant, P., Mooi, F. R., Hoebee, B. and Kimman, T. G. (2007) Comparative gene expression profiling in two congenic mouse strains following *Bordetella pertussis* infection. *BMC Microbiol* 2007 7: 88 DOI: 10.1186/1471-2180-7-88.
- Bar, R. S., Booth, B. A., Boes, M. and Dake, B. L. (1989): Insulin-like growth factor-binding proteins from vascular endothelial cells: purification, characterization, and intrinsic biological activities. *Endocrinology* 125: 1910-1920.
- Barton, N. H. and Turelli, M. (1989): Evolutionary quantitative genetics: how little do we know? *Annu Rev Genet* 23: 337-370.
- Baten, A. K., Chang, B. C., Halgamuge, S. K. and Li, J. (2006) Splice site identification using probabilistic parameters and SVM classification. *BMC Bioinformatics* 2006 7 (Suppl 5): S15 DOI: 10.1186/1471-2105-7-S5-S15.
- Beaudeau, F., Fourichon, C., Seegers, H. and Bareille, N. (2002): Risk of clinical mastitis in dairy herds with a high proportion of low individual milk somatic-cell counts. *Prev Vet Med* 53: 43-54.
- Bennewitz, J., Reinsch, N., Grohs, C., Leveziel, H., Malafosse, A., Thomsen, H., Xu, N., Looft, C., Kühn, C., Brockmann, G. A., Schwerin, M., Weimann, C., Hiendleder, S., Erhardt, G., Medjugorac, I., Russ, I., Förster, M., Brenig, B., Reinhardt, F., Reents, R., Averdunk, G., Blümel, J., Boichard, D. and Kalm, E. (2003): Combined analysis of data from two granddaughter designs: A simple strategy for QTL confirmation and increasing experimental power in dairy cattle. *Genet Sel Evol* 35: 319-338.
- Bentires-Alj, M., Barbu, V., Fillet, M., Chariot, A., Relic, B., Jacobs, N., Gielen, J., Merville, M. P. and Bours, V. (2003): NF-kappaB transcription factor induces drug resistance through MDR1 expression in cancer cells. *Oncogene* 22: 90-97.

- Bloemhof, S., de Jong, G. and de Haas, Y.** (2009): Genetic parameters for clinical mastitis in the first three lactations of Dutch Holstein cattle. *Vet Microbiol* 134: 165-171.
- Blum, J. W. and Baumrucker, C. R.** (2008): Insulin-like growth factors (IGFs), IGF binding proteins, and other endocrine factors in milk: role in the newborn. *Adv Exp Med Biol* 606: 397-422.
- Bodoh, G. W., Battista, W. J. and Schultz, L. H.** (1976): Variation in Somatic Cell Counts in Dairy Herd Improvement Milk Samples. *J Dairy Sci* 59: 1119-1123.
- Boettcher, P. J., Dekkers, J. C. and Kolstad, B. W.** (1998): Development of an udder health index for sire selection based on somatic cell score, udder conformation, and milking speed. *J Dairy Sci* 81: 1157-1168.
- Boffelli, D., Nobrega, M. A. and Rubin, E. M.** (2004): Comparative genomics at the vertebrate extremes. *Nat Rev Genet* 5: 456-465.
- Boguski, M. S. and Schuler, G. D.** (1995): ESTablishing a human transcript map. *Nat Genet* 10: 369-371.
- Boichard, D., Grohs, C., Bourgeois, F., Cerqueira, F., Faugeras, R., Neau, A., Rupp, R., Amigues, Y., Boscher, M. Y. and Leveziel, H.** (2003): Detection of genes influencing economic traits in three French dairy cattle breeds. *Genet Sel Evol* 35: 77-101.
- Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M. and Davis, R. W.** (1980): Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 32: 314-331.
- Bourner, M. J., Busby, W. H., Jr., Siegel, N. R., Krivi, G. G., McCusker, R. H. and Clemmons, D. R.** (1992): Cloning and sequence determination of bovine insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2): comparison of its structural and functional properties with IGFBP-1. *J Cell Biochem* 48: 215-226.
- Brade, W.** (2005): Nutzungsdauer und Abgangsursachen von Holsteinkühen: Konsequenzen für die Züchtung? *Praktischer Tierarzt* 86: 658-667.
- Burvenich, C., Paape, M. J., Hoeben, D., Dosogne, H., Massart-Leen, A. M. and Blum, J.** (1999): Modulation of the inflammatory reaction and neutrophil defense of the bovine lactating mammary gland by growth hormone. *Domest Anim Endocrinol* 17: 149-159.
- Burvenich, C., Van Merris, V., Mehrzad, J., Diez-Fraile, A. and Duchateau, L.** (2003): Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. *Vet Res* 34: 521-564.
- Cahalan, M. D. and Lewis, R. S.** (1988): Role of potassium and chloride channels in volume regulation by T lymphocytes. *Soc Gen Physiol Ser* 43: 281-301.
- Cardon, L. R.** (2006): Genetics. Delivering new disease genes. *Science* 314: 1403-1405.
- Carlén, E., Strandberg, E. and Roth, A.** (2004): Genetic parameters for clinical mastitis, somatic cell score, and production in the first three lactations of Swedish holstein cows. *J Dairy Sci* 87: 3062-3070.
- Cartegni, L., Chew, S. L. and Krainer, A. R.** (2002): Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet* 3: 285-298.
- Castillo-Juarez, H., Oltenacu, P. A. and Cienfuegos-Rivas, E. G.** (2002): Genetic and phenotypic relationships among milk production and composition traits in primiparous Holstein cows in two different herd environments. *Livest Prod Sci* 78: 223-231.
- Chamberlain, J. S., Gibbs, R. A., Ranier, J. E., Nguyen, P. N. and Caskey, C. T.** (1988): Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res* 16: 11141-11156.
- Chen, I. T. and Chasin, L. A.** (1993): Direct selection for mutations affecting specific splice sites in a hamster dihydrofolate reductase minigene. *Mol Cell Biol* 13: 289-300.

- Clayton, T. M., Hilla, S. M., Dentona, L. A., Watsonb, S. K. and Urquhartb, A. J.** (2004): Primer binding site mutations affecting the typing of STR loci contained within the AMPFISTR® SGM Plus™ kit. *Forensic Sci Int* 139: 255-259.
- Cobanoglu, O., Zaitoun, I., Chang, Y. M., Shook, G. E. and Khatib, H.** (2006): Effects of the signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) gene on milk production traits in Holstein dairy cattle. *J Dairy Sci* 89: 4433-4437.
- Coffey, E. M., Vinson, W. E. and Pearson, R. E.** (1986): Somatic cell counts and infection rates for cows of varying somatic cell count in initial test of first lactation. *J Dairy Sci* 69: 552-555.
- Colleau, J. J. and Le Bihan-Duval, E.** (1995): A simulation study of selection methods to improve mastitis resistance of dairy cows. *J Dairy Sci* 78: 659-671.
- Dakin, E. E. and Avise, J. C.** (2004): Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity* 93: 504-509.
- Damaj, B. B., McColl, S. R., Neote, K., Songqing, N., Ogborn, K. T., Hebert, C. A. and Naccache, P. H.** (1996): Identification of G-protein binding sites of the human interleukin-8 receptors by functional mapping of the intracellular loops. *Faseb Journal* 10: 1426-1434.
- Darnell, J. E., Jr., Kerr, I. M. and Stark, G. R.** (1994): Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264: 1415-1421.
- Darvasi, A., Weinreb, A., Minke, V., Weller, J. I. and Soller, M.** (1993): Detecting marker-QTL linkage and estimating QTL gene effect and map location using a saturated genetic map. *Genetics* 134: 943-951.
- Davis, G. P. and DeNise, S. K.** (1998): The impact of genetic markers on selection. *J Anim Sci* 76: 2331-2339.
- de Haas, Y., Janss, L. L. and Kadarmideen, H. N.** (2007): Genetic and phenotypic parameters for conformation and yield traits in three Swiss dairy cattle breeds. *J Anim Breed Genet* 124: 12-19.
- de Haas, Y., Ouweltjes, W., ten Napel, J., Windig, J. J. and de Jong, G.** (2008): Alternative somatic cell count traits as mastitis indicators for genetic selection. *J Dairy Sci* 91: 2501-2511.
- Decker, T., Stockinger, S., Karaghiosoff, M., Muller, M. and Kovarik, P.** (2002): IFNs and STATs in innate immunity to microorganisms. *J Clin Invest* 109: 1271-1277.
- Dekkers, J. C.** (2004): Commercial application of marker- and gene-assisted selection in livestock: strategies and lessons. *J Anim Sci* 82 E-Suppl: E313-328.
- Detilleux, J. C.** (2002): Genetic factors affecting susceptibility of dairy cows to udder pathogens. *Vet Immunol Immunopathol* 88: 103-110.
- Don, R. H., Cox, P. T., Wainwright, B. J., Baker, K. and Mattick, J. S.** (1991): 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res* 19: 4008.
- Dosogne, H., Vangroenweghe, F., Mehrzad, J., Massart-Leen, A. M. and Burvenich, C.** (2003): Differential leukocyte count method for bovine low somatic cell count milk. *J Dairy Sci* 86: 828-834.
- Du, F. X., DeNise, S. K. and Woodward, B. W.** (2002): Heterozygosity for genes influencing a quantitative trait. *J Anim Sci* 80: 1478-1488.
- Durbin, J. E., Hackenmiller, R., Simon, M. C. and Levy, D. E.** (1996): Targeted disruption of the mouse Stat1 gene results in compromised innate immunity to viral disease. *Cell* 84: 443-450.

- Dürr, J. W., Monardes, H. G., Cue, R. I. and Philpot, J. C.** (1997): Culling in Quebec Holstein herds. 1. Study of phenotypic trends in herd life. *Can J Anim Sci* 77: 593–600.
- DVG** (1994): Leitlinien zur Bekämpfung der Mastitis des Rindes als Bestandsproblem. Sachverständigenausschuß "Subklinische Mastitis" des Arbeitskreises Eutergesundheit der Fachgruppe Milchhygiene des Arbeitskreises Lebensmittelhygiene. Hrsg.: DVG Gießen.
- DVG** (2002): Leitlinien zur Bekämpfung der Mastitis des Rindes als Herdenproblem. Sachverständigenausschuß: „Subklinische Mastitis“ des Arbeitskreises Eutergesundheit der Fachgruppe Milchhygiene des Arbeitskreises Lebensmittelhygiene. Hrsg.: DVG Gießen.
- Efe, J. A., Botelho, R. J. and Emr, S. D.** (2005): The Fab1 phosphatidylinositol kinase pathway in the regulation of vacuole morphology. *Curr Opin Cell Biol* 17: 402-408.
- Egger-Danner, C.** (2008). Gesundheitsmonitoring Rind - Aktuelles. Seminar des Ausschusses für Genetik der ZAR, Zentrale Arbeitsgemeinschaft österreichischer Rinderzüchter, Salzburg, Österreich. <http://zar.at/article/articleview/44278/1/16>. Stand Oktober 2010.
- Eggers, J. H.** (2003). Isolierung, Sequenzierung und Charakterisierung der genomischen Region von Frunx2, dem Fugu-rubripes Ortholog des humanen RUNX2-Gens. Albert-Ludwigs-Universität Freiburg.
- Ellegren, H.** (2008): Comparative genomics and the study of evolution by natural selection. *Mol Ecol* 17: 4586-4596.
- Elo, K., Vilkki, J., de Koning, D. J., Velmala, R., Honkatukia, M., Moisio, S., Karkkainen, H. and Maki-Tanila, A.** (1998). Mapping quantitative trait loci for production, health and fertility traits in Finnish Ayrshire dairy cattle. In: Book of Abstracts of the 49th Meeting of the European Association for Animal Production. Warsaw, Polen. Hrsg.: EAAP, 19.
- Emanuelson, U., Danell, B. and Philipsson, J.** (1988): Genetic parameters for clinical mastitis, somatic cell counts, and milk production estimated by multiple-trait restricted maximum likelihood. *J Dairy Sci* 71: 467-476.
- Essl, A.** (1998): Longevity in dairy cattle breeding: a review. *Livest Prod Sci* 57: 79–89
- Evans, R. D. and Berry, D. P.** (2006). Genetic parameters for somatic cell score and its genetic association with milk production and udder conformation. Annual Meeting of the Agricultural Research Forum, Tullamore, Irland.
- Fakhrai-Rad, H., Zheng, J., Willis, T. D., Wong, K., Suyenaga, K., Moorhead, M., Eberle, J., Thorstenson, Y. R., Jones, T., Davis, R. W., Namsaraev, E. and Faham, M.** (2004): SNP discovery in pooled samples with mismatch repair detection. *Genome Res* 14: 1404-1412.
- Falconer, D. S.** (1960): Introduction to quantitative genetics. Hrsg.: O. Boyd Edingburgh/London.
- Farnir, F., Coppieters, W., Arranz, J. J., Berzi, P., Cambisano, N., Grisart, B., Karim, L., Marcq, F., Moreau, L., Mni, M., Nezer, C., Simon, P., Vanmanshoven, P., Wagenaar, D. and Georges, M.** (2000): Extensive genome-wide linkage disequilibrium in cattle. *Genome Res* 10: 220-227.
- Farrall, M.** (2004): Quantitative genetic variation: a post-modern view. *Hum Mol Genet* 13 Spec No 1: R1-7.
- Fisher, R. A.** (1918): The correlation between relatives under the supposition of Mendelian inheritance. *Trans R Soc Edinburgh* 52: 399–433.
- Flint, J. and Mott, R.** (2001): Finding the molecular basis of quantitative traits: successes and pitfalls. *Nat Rev Genet* 2: 437-445.

- Föll, J. L., Dannecker, L., Zehrer, C., Hettmer, S., Berger, J., Elmlinger, M., Niethammer, D., Ranke, M. B. and Dannecker, G. E.** (1998): Activation-dependent expression of the insulin-like growth factor binding protein-2 in human lymphocytes. *Immunology* 94: 173-180.
- Forgac, M.** (1998): Structure, function and regulation of the vacuolar (H⁺)-ATPases. *FEBS Lett* 440: 258-263.
- Fries, R. and Pausch, H.** (2011): Individuelle Genomsequenzierung von Nutztieren - auf dem Weg zur genomischen Selektion 2.0. *Züchtungskunde* 83: 371-381.
- Garner, M. M. and Revzin, A.** (1981): A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the *Escherichia coli* lactose operon regulatory system. *Nucleic Acids Res* 9: 3047-3060.
- Geldermann, H.** (1975): Investigations on Inheritance of Quantitative Characters in Animals by Gene Markers I. Methods. *Theor Appl Genet* 46: 313-330.
- Geldermann, H.** (2005): Tier-Biotechnologie. Hrsg.: Utb Stuttgart.
- Georges, M., Nielsen, D., Mackinnon, M., Mishra, A., Okimoto, R., Pasquino, A. T., Sargeant, L. S., Sorensen, A., Steele, M. R., Zhao, X. and et al.** (1995): Mapping quantitative trait loci controlling milk production in dairy cattle by exploiting progeny testing. *Genetics* 139: 907-920.
- Georges, M.** (2001): Recent progress in livestock genomics and potential impact on breeding programs. *Theriogenology* 55: 15-21.
- Georges, M.** (2007): Mapping, fine mapping, and molecular dissection of quantitative trait Loci in domestic animals. *Annu Rev Genomics Hum Genet Journal of Animal Science* 8: 131-162.
- Gerstein, M. and Zheng, D.** (2006): The real life of pseudogenes. *Sci Am* 295: 48-55.
- Gibson, C. A., Staley, M. D. and Baumrucker, C. R.** (1999): Identification of IGF binding proteins in bovine milk and the demonstration of IGFBP-3 synthesis and release by bovine mammary epithelial cells. *J Anim Sci* 77: 1547-1557.
- Gilmour, A. R., Gogel, B. J., Cullis, B. R. and Thompson, R.** (2006). ASReml User Guide Release 2.0 VSN International Ltd. Hemel Hempstead, HP1 1ES, UK.
- Gomez-Raya, L., Klungeland, H., Vage, D. L., Olsaker, V., Fimland, E., Klemetsdal, G., Ronningen, K. and Lien, S.** (1998). Mapping QTL for milk production traits in Norwegian cattle. In: *Proceedings of the 6th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, Armidale, Australien. 429-432.
- Gordon, J. R., Li, F., Zhang, X., Wang, W., Zhao, X. and Nayyar, A.** (2005): The combined CXCR1/CXCR2 antagonist CXCL8(3-74)K11R/G31P blocks neutrophil infiltration, pyrexia, and pulmonary vascular pathology in endotoxemic animals. *J Leukoc Biol* 78: 1265-1272.
- Görtz, I., Baes, C., Weimann, C., Reinsch, N. and Erhardt, G.** (2009): Association between single nucleotide polymorphisms in the CXCR1 gene and somatic cell score in Holstein dairy cattle. *J Dairy Sci* 92: 4018-4022.
- Grisart, B., Coppieters, W., Farnir, F., Karim, L., Ford, C., Berzi, P., Cambisano, N., Mni, M., Reid, S., Simon, P., Spelman, R., Georges, M. and Snell, R.** (2002): Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle: identification of a missense mutation in the bovine DGAT1 gene with major effect on milk yield and composition. *Genome Res* 12: 222-231.
- Grosse, W. M., Kappes, S. M., Laegreid, W. W., Keele, J. W., Chitko-McKown, C. G. and Heaton, M. P.** (1999): Single nucleotide polymorphism (SNP) discovery and linkage mapping of bovine cytokine genes. *Mamm Genome* 10: 1062-1069.
- Gulyas, L. and Iváncsics, J.** (2001): Zusammenhänge zwischen der somatischen Zellzahl und einigen eutermorphologischen Eigenschaften. *Arch Tierz* 44: 15-22.

- Haile-Mariam, M., Goddard, M. E. and Bowman, P. J.** (2001): Estimates of genetic parameters for daily somatic cell count of Australian dairy cattle. *J Dairy Sci* 84: 1255-1264.
- Haliassos, A., Chomel, J. C., Grandjouan, S., Kruh, J., Kaplan, J. C. and Kitzis, A.** (1989): Detection of minority point mutations by modified PCR technique: a new approach for a sensitive diagnosis of tumor-progression markers. *Nucleic Acids Res* 17: 8093-8099.
- Hanslik, S., Harr, B., Brem, G. and Schlötterer, C.** (2000): Microsatellite analysis reveals substantial genetic differentiation between contemporary New World and Old World Holstein Friesian populations. *Anim Genet* 31: 31-38.
- Harder, B., Bennewitz, J., Hinrichs, D. and Kalm, E.** (2006): Genetic parameters for health traits and their relationship to different persistency traits in German Holstein dairy cattle. *J Dairy Sci* 89: 3202-3212.
- Harmon, R. J.** (1994): Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. *J Dairy Sci* 77: 2103-2112.
- Harp, J. A., Waters, T. E. and Goff, J. P.** (2004): Lymphocyte subsets and adhesion molecule expression in milk and blood of periparturient dairy cattle. *Vet Immunol Immunopathol* 102: 9-17.
- Henikoff, S. and Henikoff, J. G.** (1992): Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 10915-10919.
- Heringstad, B., Klemetsdal, G. and Ruane, J.** (2000): Selection for mastitis resistance in dairy cattle: a review with focus on the situation in the Nordic countries. *Livest Prod Sci* 64: 95-106.
- Heringstad, B., Gianola, D., Chang, Y. M., Odegard, J. and Klemetsdal, G.** (2006): Genetic associations between clinical mastitis and somatic cell score in early first-lactation cows. *J Dairy Sci* 89: 2236-2244.
- Heringstad, B., Klemetsdal, G. and Steine, T.** (2007): Selection responses for disease resistance in two selection experiments with Norwegian red cows. *J Dairy Sci* 90: 2419-2426.
- Hettmer, S., Dannecker, L., Foell, J., Elmlinger, M. W. and Dannecker, G. E.** (2005): Effects of insulin-like growth factors and insulin-like growth factor binding protein-2 on the in vitro proliferation of peripheral blood mononuclear cells. *Hum Immunol* 66: 95-103.
- Heyen, D. W., Weller, J. I., Ron, M., Band, M., Beever, J. E., Feldmesser, E., Da, Y., Wiggans, G. R., VanRaden, P. M. and Lewin, H. A.** (1999): A genome scan for QTL influencing milk production and health traits in dairy cattle. *Physiol Genomics* 1: 165-175.
- Hiendleder, S., Lewalski, H., Wassmuth, R. and Janke, A.** (1998): The complete mitochondrial DNA sequence of the domestic sheep (*Ovis aries*) and comparison with the other major ovine haplotype. *Journal of mole* 47: 441-448.
- Hiendleder, S., Bauersachs, S., Boulesteix, A., Blum, H., Arnold, G. J., Frohlich, T. and Wolf, E.** (2005): Functional genomics: tools for improving farm animal health and welfare. *Rev Sci Tech* 24: 355-377.
- Hisaeda, K., Hagiwara, K., Eguchi, J., Yamanaka, H., Kirisawa, R. and Iwai, H.** (2001): Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha levels in sera and whey of cattle with naturally occurring coliform mastitis. *J Vet Med Sci* 63: 1009-1011.
- Hoeben, D., Burvenich, C., Trevisi, E., Bertoni, G., Hamann, J., Bruckmaier, R. M. and Blum, J. W.** (2000): Role of endotoxin induced coliform mastitis in periparturient cows. *J Dairy Res* 67: 503-514.

- Hoeflich, A., Nedbal, S., Blum, W. F., Erhard, M., Lahm, H., Brem, G., Kolb, H. J., Wanke, R. and Wolf, E.** (2001a): Growth inhibition in giant growth hormone transgenic mice by overexpression of insulin-like growth factor-binding protein-2. *Endocrinology* 142: 1889-1898.
- Hoeflich, A., Reisinger, R., Lahm, H., Kiess, W., Blum, W. F., Kolb, H. J., Weber, M. M. and Wolf, E.** (2001b): Insulin-like growth factor-binding protein 2 in tumorigenesis: protector or promoter? *Cancer Res* 61: 8601-8610.
- Holmberg, M. and Andersson-Eklund, L.** (2004): Quantitative trait loci affecting health traits in Swedish dairy cattle. *J Dairy Sci* 87: 2653-2659.
- Hospido, A. and Sonesson, U.** (2005): The environmental impact of mastitis: a case study of dairy herds. *Sci Total Environ* 343: 71-82.
- Hu, Y., Kaisaki, P. J., Argoud, K., Wilder, S. P., Wallace, K. J., Woon, P. Y., Blancher, C., Tarnow, L., Groop, P. H., Hadjadj, S., Marre, M., Parving, H. H., Farrall, M., Cox, R. D., Lathrop, M., Vionnet, N., Bihoreau, M. T. and Gauguier, D.** (2009) Functional annotations of diabetes nephropathy susceptibility loci through analysis of genome-wide renal gene expression in rat models of diabetes mellitus. *BMC Med Genomics* 2009 2: 41 DOI: 10.1186/1755-8794-2-41.
- Ikejima, K., Qu, W., Stachlewitz, R. F. and Thurman, R. G.** (1997): Kupffer cells contain a glycine-gated chloride channel. *Am J Physiol* 272: G1581-1586.
- Interbull** (2009): Description of National Genetic Evaluation Systems for dairy cattle traits as applied in different Interbull member countries. http://www-interbull.slu.se/national_ges_info2/framesida-ges.htm. Stand Juni 2009.
- Ioannidis, J. P., Ntzani, E. E., Trikalinos, T. A. and Contopoulos-Ioannidis, D. G.** (2001): Replication validity of genetic association studies. *Nat Genet* 29: 306-309.
- Jann, O. C., King, A., Corrales, N. L., Anderson, S. I., Jensen, K., Ait-Ali, T., Tang, H., Wu, C., Cockett, N. E., Archibald, A. L. and Glass, E. J.** (2009) Comparative genomics of Toll-like receptor signalling in five species. *BMC Genomics* 2009 10: 216 DOI: 10.1186/1471-2164-10-216.
- Jiang, B., Hattori, N., Liu, B., Kitagawa, K. and Inagaki, C.** (2002): Expression of swelling- and/or pH-regulated chloride channels (ClC-2, 3, 4 and 5) in human leukemic and normal immune cells. *Life Sci* 70: 1383-1394.
- Jones, G. M. and Bailey, T. L.** (1998): Understanding the basics of mastitis. Virginia Cooperative Extension Publication No. 404-233, Virginia State University, USA, pp: 1-7.
- Jones, J. I. and Clemmons, D. R.** (1995): Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* 16: 3-34.
- Kalm, E.** (2002): Development of cattle breeding strategies in Europe. *Arch Tierz* 45: 5-12.
- Karim, L., Takeda, H., Lin, L., Druet, T., Arias, J. A. C., Baurain, D., Cambisano, N., Davis, S. R., Farnir, F., Grisart, B., Harris, B. L., Keehan, M. D., Littlejohn, R. J., Spelman, R. J., Georges, M. and Coppieters, W.** (2011): Variants modulating the expression of a chromosome domain encompassing PLAG1 influence bovine stature. *Nat Genet* 43: 405-413.
- Kaupe, B., Winter, A., Fries, R. and Erhardt, G.** (2004): DGAT1 polymorphism in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle breeds. *J Dairy Res* 71: 182-187.
- Kay, S. J., Collins, K. A., Anderson, J. C. and Grant, A. J.** (1977): The effect of intergroup movement of dairy cows on bulk-milk somatic cell number. *J Dairy Res* 44: 589-593.
- Keane, O. M., Zadissa, A., Wilson, T., Hyndman, D. L., Greer, G. J., Baird, D. B., McCulloch, A. F., Crawford, A. M. and McEwan, J. C.** (2006) Gene expression profiling of naive sheep genetically resistant and susceptible to gastrointestinal nematodes. *BMC Genomics* 2006 7: 42 DOI: 10.1186/1471-2164-7-42.

- Keane, O. M., Dodds, K. G., Crawford, A. M. and McEwan, J. C.** (2008): Identifying genes for intestinal nematode resistance using transcriptional profiling. *Dev Biol (Basel)* 132: 205-212.
- Kehrli, M. E., Jr. and Shuster, D. E.** (1994): Factors affecting milk somatic cells and their role in health of the bovine mammary gland. *J Dairy Sci* 77: 619-627.
- Khatkar, M. S., Thomson, P. C., Tammen, I. and Raadsma, H. W.** (2004): Quantitative trait loci mapping in dairy cattle: review and meta-analysis. *Genet Sel Evol* 36: 163-190.
- Klaus, F., Laufer, J., Czarkowski, K., Strutz-Seebohm, N., Seebohm, G. and Lang, F.** (2009): PIKfyve-dependent regulation of the Cl⁻ channel ClC-2. *Biochem Biophys Res Commun* 381: 407-411.
- Klungland, H., Sabry, A., Heringstad, B., Olsen, H. G., Gomez-Raya, L., Vage, D. I., Olsaker, I., Odegard, J., Klemetsdal, G., Schulman, N., Vilkki, J., Ruane, J., Aasland, M., Ronningen, K. and Lien, S.** (2001): Quantitative trait loci affecting clinical mastitis and somatic cell count in dairy cattle. *Mamm Genome* 12: 837-842.
- Koivula, M., Mantysaari, E. A., Negussie, E. and Serenius, T.** (2005): Genetic and phenotypic relationships among milk yield and somatic cell count before and after clinical mastitis. *J Dairy Sci* 88: 827-833.
- Kolbehdari, D., Wang, Z., Grant, J. R., Murdoch, B., Prasad, A., Xiu, Z., Marques, E., Stothard, P. and Moore, S. S.** (2008): A whole-genome scan to map quantitative trait loci for conformation and functional traits in Canadian Holstein bulls. *J Dairy Sci* 91: 2844-2856.
- Kolbehdari, D., Wang, Z., Grant, J. R., Murdoch, B., Prasad, A., Xiu, Z., Marques, E., Stothard, P. and Moore, S. S.** (2009): A whole genome scan to map QTL for milk production traits and somatic cell score in Canadian Holstein bulls. *J Anim Breed Genet* 126: 216-227.
- Kooijman, R., Hooghe-Peters, E. L. and Hooghe, R.** (1996): Prolactin, growth hormone, and insulin-like growth factor-I in the immune system. *Adv Immunol* 63: 377-454.
- Kovarik, P., Stoiber, D., Novy, M. and Decker, T.** (1998): Stat1 combines signals derived from IFN-gamma and LPS receptors during macrophage activation. *Embo J* 17: 3660-3668.
- Kühn, C., Bennewitz, J., Reinsch, N., Thomsen, H., Looft, C., Brockmann, G., Schwerin, M., Weimann, C., Hiendleder, S., Erhardt, G., Medjugorac, I., Förster, M., Brenig, B., Reinhardt, F., Reents, R., Russ, I., Averdunk, G., Blümel, J. and Kalm, E.** (2002): Quantitative Trait Loci Mapping of Functional Traits in the German Holstein Cattle Population. *J Dairy Sci* 86: 360-368.
- Kühn, C., Bennewitz, J., Reinsch, N., Xu, N., Thomsen, H., Looft, C., Brockmann, G. A., Schwerin, M., Weimann, C., Hiendleder, S., Erhardt, G., Medjugorac, I., Förster, M., Brenig, B., Reinhardt, F., Reents, R., Russ, I., Averdunk, G., Blümel, J. and Kalm, E.** (2003): Quantitative trait loci mapping of functional traits in the German Holstein cattle population. *J Dairy Sci* 86: 360-368.
- Kühn, C., Reinhardt, F. and Schwerin, M.** (2008): Marker assisted selection of heifers improved milk somatic cell count compared to selection on conventional pedigree breeding values. *Arch Tierz* 1: 22-32.
- Laevens, H., Deluyker, H., Schukken, Y. H., De Meulemeester, L., Vandermeersch, R., De Muelenaere, E. and De Kruif, A.** (1997): Influence of parity and stage of lactation on the somatic cell count in bacteriologically negative dairy cows. *J Dairy Sci* 80: 3219-3226.
- Lander, E. S. and Green, P.** (1987): Construction of multilocus genetic linkage maps in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 2363-2367.

- Lang, C. H., Pollard, V., Fan, J., Traber, L. D., Traber, D. L., Frost, R. A., Gelato, M. C. and Prough, D. S.** (1997): Acute alterations in growth hormone-insulin-like growth factor axis in humans injected with endotoxin. *Am J Physiol* 273: 371-378.
- Lee, J., Horuk, R., Rice, G. C., Bennett, G. L., Camerato, T. and Wood, W. I.** (1992): Characterization of two high affinity human interleukin-8 receptors. *J Biol Chem* 267: 16283-16287.
- Lee, S. H. and van der Werf, J. H.** (2004): Efficient designs for fine-mapping of quantitative trait loci using combined linkage disequilibrium and linkage. *Genet Sel Evol* 36: 145-161.
- Lee, S. H. and van der Werf, J. H.** (2005): The role of pedigree information in combined linkage disequilibrium and linkage mapping of quantitative trait loci in a general complex pedigree. *Genetics* 169: 455-466.
- Lee, S. H. and van der Werf, J. H.** (2006): Simultaneous fine mapping of multiple closely linked quantitative trait Loci using combined linkage disequilibrium and linkage with a general pedigree. *Genetics* 173: 2329-2337.
- Leitner, G., Shoshani, E., Krifucks, O., Chaffer, M. and Saran, A.** (2000): Milk leucocyte population patterns in bovine udder infection of different aetiology. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 47: 581-589.
- Lekstrom-Himes, J. and Xanthopoulos, K. G.** (1999): CCAAT/enhancer binding protein epsilon is critical for effective neutrophil-mediated response to inflammatory challenge. *Blood* 93: 3096-3105.
- Leng, L., Wang, S., Li, Z., Wang, Q. and Li, H.** (2009): A polymorphism in the 3'-flanking region of insulin-like growth factor binding protein 2 gene associated with abdominal fat in chickens. *Poult Sci* 88: 938-942.
- Leyva-Baca, I., Schenkel, F., Sharma, B. S., Jansen, G. B. and Karrow, N. A.** (2007): Identification of single nucleotide polymorphisms in the bovine CCL2, IL8, CCR2 and IL8RA genes and their association with health and production in Canadian Holsteins. *Anim Genet* 38: 198-202.
- Leyva-Baca, I., Pighetti, G. and Karrow, N. A.** (2008a): Genotype-specific IL8RA gene expression in bovine neutrophils in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide challenge. *Anim Genet* 39: 298-300.
- Leyva-Baca, I., Schenkel, F., Martin, J. and Karrow, N. A.** (2008b): Polymorphisms in the 5' upstream region of the CXCR1 chemokine receptor gene, and their association with somatic cell score in Holstein cattle in Canada. *J Dairy Sci* 91: 407-417.
- Leyva, I., Schenkel, F. S., Sharma, B. S., Jansen, G. B. and Karrow, N. A.** (2006). Evaluation of DNA pooling for low frequency SNP detection and the association of a SNP in the CXCR2 chemokine receptor gene with health and production traits in Canadian Holstein bulls. In: *Proceedings of the 8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, Belo Horizonte, Brazil.
- Li, F., Zhang, X. and Gordon, J.** (2002): CXCL8(3-73)K11R/G31P antagonizes ligand binding to the neutrophil CXCR1 and CXCR2 receptors and cellular responses to CXCL8/IL-8q. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293: 939-944.
- Li, S., Tiab, L., Jiao, X., Munier, F. L., Zografos, L., Frueh, B. E., Sergeev, Y., Smith, J., Rubin, B., Meallet, M. A., Forster, R. K., Hejtmancik, J. F. and Schorderet, D. F.** (2005): Mutations in PIP5K3 are associated with Francois-Neetens mouchetee fleck corneal dystrophy. *Am J Hum Genet* 77: 54-63.
- Li, Z. H., Li, H., Zhang, H., Wang, S. Z., Wang, Q. G. and Wang, Y. X.** (2006): Identification of a single nucleotide polymorphism of the insulin-like growth factor binding protein 2 gene and its association with growth and body composition traits in the chicken. *J Anim Sci* 84: 2902-2906.

- Lien, S., Rogne, S. and Brovold, M. J. A., P.** (1990): A method for isolation of DNA from frozen (A.I.) bulls semen. *J Anim Breed Genet* 107: 74.
- Lien, S., Alestrom, P., Klungland, H. and Rogne, S.** (1992): Detection of multiple beta-casein (CASB) alleles by amplification created restriction sites (ACRS). *Anim Genet* 23: 333-338.
- Liu, Z., Womack, J. E. and Antoniou, E.** (2003): A high-resolution comparative RH map of the telomeric end of bovine chromosome 2 with human chromosomes 1 and 2. *Cytogenet Genome Res* 103: 89-93.
- Löhner, L.** (1939): Über das spezifische Gewicht der Leukozyten und Thrombozyten. *Pflügers Arch Eur J Phy* 242: 509-514.
- Long, A. D., Lyman, R. F., Langley, C. H. and Mackay, T. F.** (1998): Two sites in the Delta gene region contribute to naturally occurring variation in bristle number in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 149: 999-1017.
- Long, A. D. and Langley, C. H.** (1999): The power of association studies to detect the contribution of candidate genetic loci to variation in complex traits. *Genome Res* 9: 720-731.
- Lukacs, G. L., Rotstein, O. D. and Grinstein, S.** (1990): Phagosomal acidification is mediated by a vacuolar-type H(+)-ATPase in murine macrophages. *J Biol Chem* 265: 21099-21107.
- Lund, M. S., Guldbbrandtsen, B., Buitenhuis, A. J., Thomsen, B. and Bendixen, C.** (2008): Detection of quantitative trait loci in Danish Holstein cattle affecting clinical mastitis, somatic cell score, udder conformation traits, and assessment of associated effects on milk yield. *J Dairy Sci* 91: 4028-4036.
- Lund, T., F., Miglior, J. C., Dekkers, M. and Burnside, E. B.** (1994): Genetic relationship between clinical mastitis, somatic cell count, and udder conformation in Danish Holsteins. *Livest Prod Sci* 39: 243-251.
- Mackay, I. and Powell, W.** (2007): Methods for linkage disequilibrium mapping in crops. *Trends Plant Sci* 12: 57-63.
- Mackay, T. F.** (2001): The genetic architecture of quantitative traits. *Annu Rev Genet* 35: 303-339.
- Maeno, E., Ishizaki, Y., Kanaseki, T., Hazama, A. and Okada, Y.** (2000): Normotonic cell shrinkage because of disordered volume regulation is an early prerequisite to apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 9487-9492.
- Mark, T., Fikse, W. F., Emanuelson, U. and Philipsson, J.** (2002): International genetic evaluations of Holstein sires for milk somatic cell and clinical mastitis. *J Dairy Sci* 85: 2384-2392.
- Matukumalli, L. K., Lawley, C. T., Schnabel, R. D., Taylor, J. F., Allan, M. F., Heaton, M. P., O'Connell, J., Moore, S. S., Smith, T. P., Sonstegard, T. S. and Van Tassell, C. P.** (2009): Development and characterization of a high density SNP genotyping assay for cattle. *PLoS One* 4: e5350.
- McCauley, J. L., Kenealy, S. J., Margulies, E. H., Schnetz-Boutaud, N., Gregory, S. G., Hauser, S. L., Oksenberg, J. R., Pericak-Vance, M. A., Haines, J. L. and Mortlock, D. P.** (2007) SNPs in Multi-species Conserved Sequences (MCS) as useful markers in association studies: a practical approach. *BMC Genomics* 2007 8: 266 DOI: 10.1186/1471-2164-8-266.
- Mehrzdad, J., Duchateau, L. and Burvenich, C.** (2004): Viability of milk neutrophils and severity of bovine coliform mastitis. *J Dairy Sci* 87: 4150-4162.
- Mehrzdad, J., Duchateau, L. and Burvenich, C.** (2005): High milk neutrophil chemiluminescence limits the severity of bovine coliform mastitis. *Vet Res* 36: 101-116.

- Mehrzad, J., Janssen, D., Duchateau, L. and Burvenich, C.** (2008): Increase in *Escherichia coli* inoculum dose accelerates CD8+ T-cell trafficking in the primiparous bovine mammary gland. *J Dairy Sci* 91: 193-201.
- Mellman, I., Fuchs, R. and Helenius, A.** (1986): Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Annu Rev Biochem* 55: 663-700.
- Menegazzi, R., Busetto, S., Decleva, E., Cramer, R., Dri, P. and Patriarca, P.** (1999): Triggering of chloride ion efflux from human neutrophils as a novel function of leukocyte beta 2 integrins: relationship with spreading and activation of the respiratory burst. *J Immunol* 162: 423-434.
- Meraz, M. A., White, J. M., Sheehan, K. C., Bach, E. A., Rodig, S. J., Dighe, A. S., Kaplan, D. H., Riley, J. K., Greenlund, A. C., Campbell, D., Carver-Moore, K., DuBois, R. N., Clark, R., Aguet, M. and Schreiber, R. D.** (1996): Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway. *Cell* 84: 431-442.
- Meuwissen, T. H. and Goddard, M. E.** (2000): Fine mapping of quantitative trait loci using linkage disequilibria with closely linked marker loci. *Genetics* 155: 421-430.
- Meuwissen, T. H. and Goddard, M. E.** (2001): Prediction of identity by descent probabilities from marker-haplotypes. *Genet Sel Evol* 33: 605-634.
- Meuwissen, T. H., Karlsen, A., Lien, S., Olsaker, I. and Goddard, M. E.** (2002): Fine mapping of a quantitative trait locus for twinning rate using combined linkage and linkage disequilibrium mapping. *Genetics* 161: 373-379.
- Meyer, T.** (2006). Vergleichende Untersuchungen zum Lactoferringehalt und dem Bindungsprotein-2 insulinhaltiger Wachstumsfaktoren (IGFBP-2) in Kuh- und Ziegenmilch. Landwirtschaftliche Fakultät Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Milom, S. R., Blum, W. F. and Gunn, A. J.** (2008): Temporal changes in insulin-like growth factors I and II and in insulin-like growth factor binding proteins 1, 2, and 3 in human milk. *Horm Res* 69: 307-311.
- Moen, T., Hayes, B., Baranski, M., Berg, P. R., Kjolglum, S., Koop, B. F., Davidson, W. S., Omholt, S. W. and Lien, S.** (2008) A linkage map of the Atlantic salmon (*Salmo salar*) based on EST-derived SNP markers. *BMC Genomics* 2008 9: 223 DOI: 10.1186/1471-2164-9-223.
- Mrode, R. A. and Swanson, G. J. T.** (1996): Genetic and statistical properties of somatic cell count and its suitability as an indirect means of reducing the incidence of mastitis in dairy cattle. *Animal Breeding Abstract* 64: 847-856.
- Mullis, K. B. and Faloona, F. A.** (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335-350.
- Murdoch, C. and Finn, A.** (2000): Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood* 95: 3032-3043.
- Murphy, P. M.** (1997): Neutrophil receptors for interleukin-8 and related CXC chemokines. *Semin Hematol* 34: 311-318.
- Nacy, C. A. and Meltzer, M. S.** (1991): T-cell-mediated activation of macrophages. *Curr Opin Immunol* 3: 330-335.
- Nakajima, Y., Mikami, O., Yoshioka, M., Motoi, Y., Ito, T., Ishikawa, Y., Fuse, M., Nakano, K. and Yasukawa, K.** (1997): Elevated levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and interleukin-6 (IL-6) activities in the sera and milk of cows with naturally occurring coliform mastitis. *Res Vet Sci* 62: 297-298.
- Nanda, A., Gukovskaya, A., Tseng, J. and Grinstein, S.** (1992): Activation of vacuolar-type proton pumps by protein kinase C. Role in neutrophil pH regulation. *J Biol Chem* 267: 22740-22746.

- National Mastitis Council** (1996). Current concepts of bovine mastitis. National Mastitis Council, Washington, D. C.
- Newton, C. R. and Graham, A.** (1994): PCR. Bios Scientific Publishers Limited. Hrsg.: Oxford.
- Nicot, A. S. and Laporte, J.** (2008): Endosomal phosphoinositides and human diseases. *Traffic* 9: 1240-1249.
- Nielsen, U. S., Pedersen, G. A., Pedersen, J. and Jensen, J.** (1997). Genetic correlation among health traits in different lactations. International workshop on genetic improvement of functional traits in cattle, Uppsala, Schweden.
- Notebaert, S., Carlsen, H., Janssen, D., Vandenabeele, P., Blomhoff, R. and Meyer, E.** (2008): In vivo imaging of NF-kappaB activity during *Escherichia coli*-induced mammary gland infection. *Cell Microbiol* 10: 1249-1258.
- O'Brien, S. J.** (1991): Mammalian genome mapping: lessons and prospects. *Curr Opin Genet Dev* 1: 105-111.
- Odegard, J., Heringstad, B. and Klemetsdal, G.** (2004): Short communication: bivariate genetic analysis of clinical mastitis and somatic cell count in Norwegian dairy cattle. *J Dairy Sci* 87: 3515-3517.
- Ogorevc, J., Kunej, T. and Dovc, P.** (2008): An integrated map of cattle candidate genes for mastitis: a step forward to new genetic markers. *Acta Agric. Slov. Supl.*2: 85-91.
- Olsen, H. G., Lien, S., Svendsen, M., Nilsen, H., Roseth, A., Aasland Opsal, M. and Meuwissen, T. H.** (2004): Fine mapping of milk production QTL on BTA6 by combined linkage and linkage disequilibrium analysis. *J Dairy Sci* 87: 690-698.
- Olsen, H. G., Nilsen, H., Hayes, B., Berg, P. R., Svendsen, M., Lien, S. and Meuwissen, T.** (2007) Genetic support for a quantitative trait nucleotide in the ABCG2 gene affecting milk composition of dairy cattle. *BMC Genet* 2007 8: 32 DOI: 10.1186/1471-2156-8-32.
- Olsson, S. O., Baekbo, P., Hansson, S. O., Rautala, H. and Osteras, O.** (2001): Disease recording systems and herd health schemes for production diseases. *Acta Vet Scand Suppl* 94: 51-60.
- Oviedo-Boyso, J., Valdez-Alarcón, J. J., Cajero-Juárez, M., Ochoa-Zarzosa, A., López-Meza, J. E., Bravo-Patiño, A. and Baizabal-Aguirre, V. M.** (2007): Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. *Journal of Infection* 54: 399-409.
- Paape, M., Mehrzad, J., Zhao, X., Dettloux, J. and Burvenich, C.** (2002): Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 7: 109-121.
- Paape, M. J., Shafer-Weaver, K., Capuco, A. V., Van Oostveldt, K. and Burvenich, C.** (2000): Immune surveillance of mammary tissue by phagocytic cells. *Adv Exp Med Biol* 480: 259-277.
- Paape, M. J., Bannerman, D. D., Zhao, X. and Lee, J. W.** (2003a): The bovine neutrophil: Structure and function in blood and milk. *Vet Res* 34: 597-627.
- Paape, M. J., Bannerman, D. D., Zhao, X. and Lee, J. W.** (2003b): The bovine neutrophil: Structure and function in blood and milk. *Veterinary Research* 34: 597-627.
- Paape, M. J., Bannerman, D. D., Zhao, X. and Lee, J. W.** (2003c): The bovine neutrophil: Structure and function in blood and milk. *Vet Res* 34: 597-627.
- Peter, C.** (2005). Molekulargenetische Charakterisierung von Schafrassen Europas und des Nahen Ostens auf der Basis von Mikrosatelliten. Dissertation Fachbereich Veterinärmedizin, Justus-Liebig Universität, Gießen, VVB Laufersweiler Verlag, Wettenberg (ISBN 3-8359-5006-1).

- Philipsson, J., Ral, G. and Berglund, B.** (1995): Somatic cell count as a selection criterion for mastitis resistance in dairy cattle. *Livest Prod Sci* 41: 195-200.
- Philipsson, J. and Lindhé, B.** (2003): Experiences of including reproduction and health traits in Scandinavian dairy cattle breeding programmes. *Livest Prod Sci* 83: 99-112.
- Phillips, P. C.** (1999): From complex traits to complex alleles. *Trends Genet* 15: 6-8.
- Phipps, D. J., Branch, D. R. and Schlichter, L. C.** (1996): Chloride-channel block inhibits T lymphocyte activation and signalling. *Cell Signal* 8: 141-149.
- Plym Forshell, K. and Osteras, O.** (2001). Trend in norwegian udder health data during 1975 through 2000. In: *The proceedings of the 2nd International Symposium on Mastitis and Milk Quality*, Vancouver B.C., Kanada. 321-325.
- Politis, I., Zhao, X., McBride, B. W. and Burton, J. H.** (1992): Function of bovine mammary macrophages as antigen-presenting cells. *Vet Immunol Immunopathol* 30: 399-410.
- Pösö, J. and Mäntysaari, E. A.** (1996): Relationships between clinical mastitis, somatic cell score, and production for the first three lactations of Finnish Ayrshire. *J Dairy Sci* 79: 1284-1291.
- Prinzenberg, E.-M.** (1998). Entwicklung von Gendiagnoseverfahren für seltene Milchproteinvarianten beim Rind unter Berücksichtigung des Vorkommens bei vom Aussterben bedrohten Rassen. Dissertation Fachbereich Veterinärmedizin, Justus-Liebig Universität, Gießen, Fachverlag Köhler, Gießen, ISBN 3-922306-68-3.
- Rajaram, S., Baylink, D. J. and Mohan, S.** (1997): Insulin-like growth factor-binding proteins in serum and other biological fluids: regulation and functions. *Endocr Rev* 18: 801-831.
- Rambeaud, M. and Pighetti, G. M.** (2005): Impaired neutrophil migration associated with specific bovine CXCR2 genotypes. *Infect Immun* 73: 4955-4959.
- Rambeaud, M., Clift, R. and Pighetti, G. M.** (2006): Association of a bovine CXCR2 gene polymorphism with neutrophil survival and killing ability. *Vet Immunol Immunopathol* 111: 231-238.
- Rambeaud, M. and Pighetti, G. M.** (2007): Differential calcium signaling in dairy cows with specific CXCR1 genotypes potentially related to interleukin-8 receptor functionality. *Immunogenetics* 59: 53-58.
- Reinhardt, F., Liu, Z., Seefried, F., Rensing, S. and Reents, R.** (2011): Genomische Selektion: Stand der Implementierung bei Deutschen Holstein. *Züchtungskunde* 83: 28-256.
- Reinsch, N., Xu, N., Thomsen, H., Looft, C., Kalm, E., Grupe, S., Kuhn, C., Schwerin, M., Leyhe, B., Hiendleder, S., Erhardt, G., Medjugorac, I., Russ, I., Forster, M., Brenig, B., Reents, R. and Averdunk, G.** (1998). First results on somatic cell count loci from the ADR bovine mapping project. In: *Proceedings of the 6th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, Armidale, Australien. 426-428.
- Reinsch, N.** (1999): A multiple-species, multiple-project database for genotypes at codominant loci. *J Anim Breed Genet* 116: 425-435.
- Riollet, C., Rainard, P. and Poutrel, B.** (2000): Kinetics of cells and cytokines during immune-mediated inflammation in the mammary gland of cows systemically immunized with *Staphylococcus aureus* alpha-toxin. *Inflamm Res* 49: 486-496.
- Risch, N. and Merikangas, K.** (1996a): The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* 273: 1516-1517.
- Risch, N. and Merikangas, K.** (1996b): The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* 273: 1516-1517.

- Risch, N. J.** (2000): Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature* 405: 847-856.
- Rivas, A. L., Quimby, F. W., Coksaygan, O., Olmstead, L. and Lein, D. H.** (2000): Longitudinal evaluation of CD4+ and CD8+ peripheral blood and mammary gland lymphocytes in cows experimentally inoculated with *Staphylococcus aureus*. *Can J Vet Res* 64: 232-237.
- Rodriguez-Zas, S. L., Southey, B. R., Heyen, D. W. and Lewin, H. A.** (2002): Interval and composite interval mapping of somatic cell score, yield, and components of milk in dairy cattle. *J Dairy Sci* 85: 3081-3091.
- Rogers, G. W., Hargrove, G. L., Lawlor, T. J., Jr. and Ebersole, J. L.** (1991): Correlations among linear type traits and somatic cell counts. *J Dairy Sci* 74: 1087-1091.
- Rogers, G. W., Hargrove, G. L. and Cooper, J. B.** (1995a): Correlations among somatic cell scores of milk within and across lactations and linear type traits of Jerseys. *J Dairy Sci* 78: 914-920.
- Rogers, G. W., Nash, D. L., Sischo, W. M., Cooper, J. B., Hargrove, G. L. and Keown, J. F.** (1995b). Clinical mastitis and sire predicted transmitting abilities for somatic cell score. In: *Book of Abstracts of the 46th Annual Meeting of European Association for Animal Production, Prague, Tschechien*. 18.
- Rogers, G. W., Banos, G., Nielsen, U. S. and Philipsson, J.** (1998): Genetic correlations among somatic cell scores, productive life, and type traits from the United States and udder health measures from Denmark and Sweden. *J Dairy Sci* 81: 1445-1453.
- Ron, M., Feldmesser, E., Golik, M., Tager-Cohen, I., Kliger, D., Reiss, V., Domochofsky, R., Alus, O., Seroussi, E., Ezra, E. and Weller, J. I.** (2004): A complete genome scan of the Israeli Holstein population for quantitative trait loci by a daughter design. *J Dairy Sci* 87: 476-490.
- Ron, M., Israeli, G., Seroussi, E., Weller, J. I., Gregg, J. P., Shani, M. and Medrano, J. F.** (2007) Combining mouse mammary gland gene expression and comparative mapping for the identification of candidate genes for QTL of milk production traits in cattle. *BMC Genomics* 2007 8: 183 DOI: 10.1186/1471-2164-8-183.
- Ron, M. and Weller, J. I.** (2007): From QTL to QTN identification in livestock--winning by points rather than knock-out: a review. *Anim Genet* 38: 429-439.
- Ross, M., Francis, G. L., Szabo, L., Wallace, J. C. and Ballard, F. J.** (1989): Insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins inhibit the biological activities of IGF-1 and IGF-2 but not des-(1-3)-IGF-1. *Biochem J* 258: 267-272.
- Royal, M. D., Darwash, A. O., Flint, A. P. E., Webb, R. and Woolliams, J. A.** (2000): Declining fertility in dairy cattle: changes in traditional and endocrine parameters of fertility. *Anim Sci* 70: 487-501.
- Rozen, S. and Skaletsky, H. J.** (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Hrsg.: Krawetz and Misener. Humana Press, Totowa, NJ, 365-386.
- Rupp, R. and Boichard, D.** (1999): Genetic parameters for clinical mastitis, somatic cell score, production, udder type traits, and milking ease in first lactation Holsteins. *J Dairy Sci* 82: 2198-2204.
- Rupp, R. and Boichard, D.** (2003): Genetics of resistance to mastitis in dairy cattle. *Vet Res* 34: 671-688.
- Saad, A. M. and Ostensson, K.** (1990): Flow cytometric studies on the alteration of leukocyte populations in blood and milk during endotoxin-induced mastitis in cows. *Am J Vet Res* 51: 1603-1607.

- Sahana, G., de Koning, D. J., Guldbrandtsen, B., Sorensen, P. and Lund, M. S.** (2006): The efficiency of mapping of quantitative trait loci using cofactor analysis in half-sib design. *Genet Sel Evol* 38: 167-182.
- Sahana, G., Lund, M. S., Andersson-Eklund, L., Hastings, N., Fernandez, A., Iso-Touru, T., Thomsen, B., Viitala, S., Sorensen, P., Williams, J. L. and Vilkki, J.** (2008): Fine-mapping QTL for mastitis resistance on BTA9 in three Nordic red cattle breeds. *Anim Genet* 39: 354-362.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. and Arnheim, N.** (1985): Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T.** (1989): *Molecular cloning - a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. Hrsg.:
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R.** (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *PNAS* 74: 5463-5467.
- Sarikaya, H., Schlamberger, G., Meyer, H. H. and Bruckmaier, R. M.** (2006): Leukocyte populations and mRNA expression of inflammatory factors in quarter milk fractions at different somatic cell score levels in dairy cows. *J Dairy Sci* 89: 2479-2486.
- Schindler, C. and Strehlow, I.** (2000): Cytokines and STAT signaling. *Adv Pharmacol* 47: 113-174.
- Schnabel, R. D., Sonstegard, T. S., Taylor, J. F. and Ashwell, M. S.** (2005): Whole-genome scan to detect QTL for milk production, conformation, fertility and functional traits in two US Holstein families. *Anim Genet* 36: 408-416.
- Schrooten, C., Bovenhuis, H., Coppieters, W. and Van Arendonk, J. A.** (2000): Whole genome scan to detect quantitative trait loci for conformation and functional traits in dairy cattle. *J Dairy Sci* 83: 795-806.
- Schulman, N. F., Moio, S. M., De Koning, D. J., Elo, K., Mäki-Tanila, A. and Vilkki, J.** (2002). QTL for health traits in Finnish Ayrshire cattle. In: *Proceedings of the 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, Montpellier, France. 9-19.
- Schulman, N. F., Viitala, S. M., de Koning, D. J., Virta, J., Maki-Tanila, A. and Vilkki, J. H.** (2004): Quantitative trait Loci for health traits in Finnish Ayrshire cattle. *J Dairy Sci* 87: 443-449.
- Schutz, M. M.** (1994): Genetic evaluation of somatic cell scores for United States dairy cattle. *J Dairy Sci* 77: 2113-2129.
- Schwerin, M., Fries, R., Simianer, H., Swalwe, H. and Wimmers, K.** (2006): Die strukturelle und funktionelle Genomanalyse – neue Wege zum Verstehen des Phänotyps - -Stand und Perspektiven-. *Züchtungskunde* 78: 1-16.
- Seyfert, H. M., Kühn, C. and Schwerin, M.** (2008): Mit HighTech zur Eutergesundheit - Forschungsverbünde untersuchen immunologische Schutzmechanismen des Euters des Rindes und deren genetische Grundlagen. *ForschungsReport* 1: 26-29.
- Shafer-Weaver, K. A., Corl, C. M. and Sordillo, L. M.** (1999): Shifts in bovine CD4+ subpopulations increase T-helper-2 compared with T-helper-1 effector cells during the postpartum period. *J Dairy Sci* 82: 1696-1706.
- Sheldrake, R. F., Hoare, R. J. and McGregor, G. D.** (1983): Lactation stage, parity, and infection affecting somatic cells, electrical conductivity, and serum albumin in milk. *J Dairy Sci* 66: 542-547.
- Shook, G. E. and Schutz, M. M.** (1994): Selection on somatic cell score to improve resistance to mastitis in the United States. *J Dairy Sci* 77: 648-658.
- Shtrichman, R. and Samuel, C. E.** (2001): The role of gamma interferon in antimicrobial immunity. *Curr Opin Microbiol* 4: 251-259.

- Shu, Y., Dhillon, S., Ke, X., Collins, A. R. and Day, I. N. M.** (2001): An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res* 29(17): E88.
- Shuster, D. E., Kehrl, M. E., Jr. and Baumrucker, C. R.** (1995): Relationship of inflammatory cytokines, growth hormone, and insulin-like growth factor-I to reduced performance during infectious disease. *Proc Soc Exp Biol Med* 210: 140-149.
- Simianer, H., Solbu, H. and Schaeffer, L. R.** (1991): Estimated Genetic Correlations between Disease and Yield Traits in Dairy Cattle. *J Dairy Sci* 74: 4358-4365.
- Sing, C. F. and Rothmann, E. D.** (1975): A consideration of chi-square test of Hardy-Weinberg equilibrium in a non-multinomial situation. *Ann Hum Genet* 39: 141-145.
- Slatko, B. E.** (1994): Thermal cycle dideoxy DNA sequencing. *Methods Mol Biol* 31: 35-45.
- Sobiraj, A., Ostertag, H.-U., Peip, D., Bostedt, H. and Kielwein, G.** (1988): Klinische und bakteriologische Untersuchungsbefunde zur Mastitishäufigkeit erstmalig laktierender Rinder intra und postpartum. *Tierärztl. Praxis* 16: 243-249.
- Søndergaard, E., Sørensen, M. K., Mao, I. L. and Jensen, J.** (2002): Genetic parameters of production, feed intake, body weight, body composition, and udder health in lactating dairy cows. *Livest Prod Sci* 77: 23-34.
- Sordillo, L. M. and Babiuk, L. A.** (1991): Controlling acute *Escherichia coli* mastitis during the periparturient period with recombinant bovine interferon gamma. *Vet Microbiol* 28: 189-198.
- Sordillo, L. M. and Streicher, K. L.** (2002): Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 7: 135-146.
- Sorensen, L. P., Guldbrandtsen, B., Thomasen, J. R. and Lund, M. S.** (2008): Pathogen-specific effects of quantitative trait loci affecting clinical mastitis and somatic cell count in Danish Holstein cattle. *J Dairy Sci* 91: 2493-2500.
- Spelman, R. J. and Bovenhuis, H.** (1998): Moving from QTL experimental results to the utilization of QTL in breeding programmes. *Anim Genet* 29: 77-84.
- Stoop, W. M., Schennink, A., Visker, M. H., Mullaart, E., van Arendonk, J. A. and Bovenhuis, H.** (2009): Genome-wide scan for bovine milk-fat composition. I. Quantitative trait loci for short- and medium-chain fatty acids. *J Dairy Sci* 92: 4664-4675.
- Strandberg, E. and Shook, G. E.** (1989): Genetic and economic responses to breeding programs that consider mastitis. *J Dairy Sci* 72: 2136-2142.
- Su, A. I., Wiltshire, T., Batalov, S., Lapp, H., Ching, K. A., Block, D., Zhang, J., Soden, R., Hayakawa, M., Kreiman, G., Cooke, M. P., Walker, J. R. and Hogenesch, J. B.** (2004): A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *PNAS* 101: 6062-6067.
- Suriyasathaporn, W., Schukken, Y. H., Nielen, M. and Brand, A.** (2000): Low somatic cell count: a risk factor for subsequent clinical mastitis in a dairy herd. *J Dairy Sci* 83: 1248-1255.
- Swallow, C. J., Grinstein, S. and Rotstein, O. D.** (1990a): A vacuolar type H(+)-ATPase regulates cytoplasmic pH in murine macrophages. *J Biol Chem* 265: 7645-7654.
- Swallow, C. J., Grinstein, S., Sudsbury, R. A. and Rotstein, O. D.** (1990b): Modulation of the macrophage respiratory burst by an acidic environment: the critical role of cytoplasmic pH regulation by proton extrusion pumps. *Surgery* 108: 363-369.
- Szyda, J., Ptak, E., Komisarek, J. and Zarnecki, A.** (2008): Practical application of daughter yield deviations in dairy cattle breeding. *J Appl Genet* 49: 183-191.
- Tabor, H. K., Risch, N. J. and Myers, R. M.** (2002): Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations. *Nat Rev Genet* 3: 391-397.
- Tagle, D. A., Koop, B. F., Goodman, M., Slightom, J. L., Hess, D. L. and Jones, R. T.** (1988): Embryonic epsilon and gamma globin genes of a prosimian primate (*Galago*

- crassicaudatus). Nucleotide and amino acid sequences, developmental regulation and phylogenetic footprints. *J Mol Biol* 203: 439-455.
- Targowski, S. P.** (1983): Role of immune factors in protection of mammary gland. *J Dairy Sci* 66: 1781-1789.
- Taylor, B. C., Dellinger, J. D., Cullor, J. S. and Stott, J. L.** (1994): Bovine milk lymphocytes display the phenotype of memory T cells and are predominantly CD8+. *Cell Immunol* 156: 245-253.
- Taylor, B. C., Keefe, R. G., Dellinger, J. D., Nakamura, Y., Cullor, J. S. and Stott, J. L.** (1997): T cell populations and cytokine expression in milk derived from normal and bacteria-infected bovine mammary glands. *Cell Immunol* 182: 68-76.
- Thomas, J. W., Touchman, J. W., Blakesley, R. W., Bouffard, G. G., Beckstrom-Sternberg, S. M., Margulies, E. H., Blanchette, M., Siepel, A. C., Thomas, P. J., McDowell, J. C., Maskeri, B., Hansen, N. F., Schwartz, M. S., Weber, R. J., Kent, W. J., Karolchik, D., Bruen, T. C., Bevan, R., Cutler, D. J., Schwartz, S., Elnitski, L., Idol, J. R., Prasad, A. B., Lee-Lin, S. Q., Maduro, V. V., Summers, T. J., Portnoy, M. E., Dietrich, N. L., Akhter, N., Ayele, K., Benjamin, B., Cariaga, K., Brinkley, C. P., Brooks, S. Y., Granite, S., Guan, X., Gupta, J., Haghghi, P., Ho, S. L., Huang, M. C., Karlins, E., Laric, P. L., Legaspi, R., Lim, M. J., Maduro, Q. L., Masiello, C. A., Mastrian, S. D., McCloskey, J. C., Pearson, R., Stantripop, S., Tionson, E. E., Tran, J. T., Tsurgeon, C., Vogt, J. L., Walker, M. A., Wetherby, K. D., Wiggins, L. S., Young, A. C., Zhang, L. H., Osoegawa, K., Zhu, B., Zhao, B., Shu, C. L., De Jong, P. J., Lawrence, C. E., Smit, A. F., Chakravarti, A., Haussler, D., Green, P., Miller, W. and Green, E. D.** (2003): Comparative analyses of multi-species sequences from targeted genomic regions. *Nature* 424: 788-793.
- Thomsen, H., Reinsch, N., Xu, N., Looft, C., Grupe, S., Kühn, C., Brockmann, G. A., Schwerin, M., Leyhe-Horn, B., Hiendleder, S., Erhardt, G., Medjugorac, I., Russ, I., Förster, M., Brenig, B., Reinhardt, F., Reents, R., Blümel, J., Averdunk, G. and Kalm, E.** (2000): A male bovine linkage map for the ADR granddaughter design. *J Anim Breed Genet* 117: 289-306.
- Thomsen, H., Reinsch, N., Xu, N., Looft, C., Grupe, S., Kühn, C., Brockmann, G. A., Schwerin, M., Leyhe-Horn, B., Hiendleder, S., Erhardt, G., Medjugorac, I., Russ, I., Förster, M., Brenig, B., Reinhardt, F., Reents, R., Blümel, J., Averdunk, G. and Kalm, E.** (2001): Comparison of estimated breeding values, daughter yield deviations and de-regressed proofs within a whole genome scan for QTL. *J Anim Breed Genet* 118: 357-370.
- Togashi, K., Kataoka, T. and Nagai, K.** (1997): Characterization of a series of vacuolar type H(+)-ATPase inhibitors on CTL-mediated cytotoxicity. *Immunol Lett* 55: 139-144.
- Toker, A. and Cantley, L. C.** (1997): Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature* 387: 673-676.
- van Buul-Offers, S. C. and Kooijman, R.** (1998): The role of growth hormone and insulin-like growth factors in the immune system. *Cell Mol Life Sci* 54: 1083-1094.
- Van der Ven, L. T., Roholl, P. J., Reijnen-Gresnigt, M. G., Bloemen, R. J. and van Buul-Offers, S. C.** (1997): Expression of insulin-like growth factor II (IGF-II) and histological changes in the thymus and spleen of transgenic mice overexpressing IGF-II. *Histochem Cell Biol* 107: 193-203.
- Vecht, U., Shook, G. E., Politiek, R. D., Grootenhuis, G., Koops, W. J. and Groothuis, D. G.** (1985): Effect of bull selection for somatic cell count in first lactation on cell counts and pathogens in later lactations. *J Dairy Sci* 68: 2995-3003.
- Vincze, T., Posfai, J. and Roberts, R. J.** (2003): NEBcutter: A program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Res* 31: 3688-3691.

- Vink, J. M. and Boomsma, D. I.** (2002): Gene finding strategies. *Biol Psychol* 61: 53-71.
- VIT** (2009). Zuchtwertschätzung funktionale Nutzungsdauer. In: Beschreibung der Zuchtwertschätzung für Milchleistungsmerkmale, Zellzahl, Exterieurmerkmale, Nutzungsdauer und Zuchtleistungsmerkmale, www.vit.de.
- VIT** (2011). Zuchtwertschätzung funktionale Nutzungsdauer. In: Beschreibung der Zuchtwertschätzung für Milchleistungsmerkmale, Zellzahl, Exterieurmerkmale, Nutzungsdauer und Zuchtleistungsmerkmale, www.vit.de.
- Wang, X., Tomso, D. J., Chorley, B. N., Cho, H. Y., Cheung, V. G., Kleeberger, S. R. and Bell, D. A.** (2007): Identification of polymorphic antioxidant response elements in the human genome. *Hum Mol Genet* 16: 1188-1200.
- Ward, A. N.** (1938): Preliminary Report on Inheritance to Severe Udder Infection (Mastitis). *New Zealand J Sci Technol* 20: 109A-114A.
- Weikard, R., Goldammer, T., Laurent, P., Womack, J. E. and Kühn, C.** (2006) A gene-based high-resolution comparative radiation hybrid map as a framework for genome sequence assembly of a bovine chromosome 6 region associated with QTL for growth, body composition, and milk performance traits. *BMC Genomics* 2006 7: 53 DOI: 10.1186/1471-2164-7-53.
- Weitzman, J. B.** (2003): Tracking evolution's footprints in the genome. *J Biol* 2: 9.
- Weller, J. I., Kashi, Y. and Soller, M.** (1990): Power of daughter and granddaughter designs for determining linkage between marker loci and quantitative trait loci in dairy cattle. *J Dairy Sci* 73: 2525-2537.
- Weller, J. I., Saran, A. and Zeliger, Y.** (1992): Genetic and environmental relationships among somatic cell count, bacterial infection, and clinical mastitis. *J Dairy Sci* 75: 2532-2540.
- Weller, J. I.** (2007). Marker-assisted selection in dairy cattle. In: *Marker-Assisted Selection: Current Status and Future Perspectives in Crops, Livestock, Forestry and Fish*. Hrsg.: E. P. Guimarães, Ruane, J., Scherf, B. D., Sonnino, A. and Dargie, J. D. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rom, Italien.
- Wiesner, E. and Ribbeck, R.** (2000): *Lexikon der Veterinärmedizin*. Hrsg.: E. Verlag Stuttgart.
- Williams, J. L.** (2005): The use of marker-assisted selection in animal breeding and biotechnology. *Rev Sci Tech* 24: 379-391.
- Wittmann, S. L., Pfaffl, M. W., Meyer, H. H. D. and Bruckmaier, R. M.** (2002): 5-Lipoxygenase, cyclooxygenase-2 and tumor necrosis factor alpha gene expression in somatic milk cells. *Milchwissenschaft* 57: 63-66.
- Youngerman, S. M., Saxton, A. M., Oliver, S. P. and Pighetti, G. M.** (2004a): Association of CXCR2 polymorphisms with subclinical and clinical mastitis in dairy cattle. *J Dairy Sci* 87: 2442-2448.
- Youngerman, S. M., Saxton, A. M. and Pighetti, G. M.** (2004b): Novel single nucleotide polymorphisms and haplotypes within the bovine CXCR2 gene. *Immunogenetics* 56: 355-359.
- Yuan, J., Wegenka, U. M., Luttkien, C., Buschmann, J., Decker, T., Schindler, C., Heinrich, P. C. and Horn, F.** (1994): The signalling pathways of interleukin-6 and gamma interferon converge by the activation of different transcription factors which bind to common responsive DNA elements. *Mol Cell Biol* 14: 1657-1668.
- Zecconi, A., Bronzo, V., Piccinini, R., Spreafico, G. and Ruffo, G.** (1994): Phagocytic activity of bovine polymorphonuclear leukocytes *J Dairy Res* 61: 271-279.
- Zhang, Q., Boichard, D., Hoeschele, I., Ernst, C., Eggen, A., Murkve, B., Pfister-Genskow, M., Witte, L. A., Grignola, F. E., Uimari, P., Thaller, G. and Bishop,**

- M. D.** (1998): Mapping quantitative trait loci for milk production and health of dairy cattle in a large outbred pedigree. *Genetics* 149: 1959-1973.
- Zhao, H. H., Fernando, R. L. and Dekkers, J. C.** (2007): Power and precision of alternate methods for linkage disequilibrium mapping of quantitative trait loci. *Genetics* 175: 1975-1986.
- Zhu, M. and Zhao, S.** (2007): Candidate gene identification approach: progress and challenges. *Int. J. Biol. Sci.* 3: 420-427.
- Ziegle, J. S., Su, Y., Corcoran, K. P., Nie, L., Mayrand, P. E., Hoff, L. B., McBride, L. J., Kronick, M. N. and Diehl, S. R.** (1992): Application of automated DNA sizing technology for genotyping microsatellite loci. *Genomics* 14: 1026-1031.

9 Anhang

Tabelle A 1: QTL für die somatische Zellzahl bei Milchkühen

BTA	Population	Merkmal	Position cM	Design	Statistische Methode	Referenz
1	Finnish Ayrshire	EBV	59	GDD	Multiple Markerregression	Schulman et al., 2004
1	US-HF	DYD	80/126	GDD	Composite Interval Mapping	Rodriguez-Zas et al., 2002
1	Dt. Milchkühe	EBV	125	GDD	Einzel-Markerregression	Reinsch et al., 1998
2	Dt. H und Fr. HF	DYD	99/100	GDD	Multiple Markerregression	Bennewitz et al., 2003
3	Finnish Ayrshire	EBV	109	GDD	Multiple Markerregression	Schulman et al., 2004
3	NI. HF	EBV	171	GDD	Multiple Markerregression	Schrooten et al., 2000
4	US-HF	DYD	10 (0-46)	GDD	LS and VC- Methode	Zhang et al., 1998
5	Dk. HF	EBV	52,7	GDD	***	Lund et al., 2008
5	US-HF	*	54	GDD	Regressions-Interval-Analyse	Ashwell et al., 2004
5	US-HF	DYD	36	GDD	Composite Interval Mapping	Rodriguez-Zas et al., 2002
5	US-HF	DYD	100	GDD	Markereffekt Across Families	Heyen et al., 1999
6	Dk. HF	EBV	125,9	GDD	***	Lund et al., 2008
7	Isr. HF	*	51	DD	ANOVA	Ron et al., 2004
7	US-HF	*	67	GDD	Regressions-Interval-Analyse	Ashwell et al., 2004
7	Dt. H	DYD	107	GDD	Multiple Markerregression	Kühn et al., 2003
7	US-HF	DYD	124	GDD	Markereffekt Across Families	Heyen et al., 1999
8	Dt. Milchkühe	EBV	17	GDD	Einzel-Markerregression	Reinsch et al., 1998
8	N. Milchkühe	*	31	GDD	Multiple Markerregression	Klungland et al., 2001
8	Dk. HF	EBV	38,2	GDD	***	Lund et al., 2008
9	Se. Milchkühe	DYD	**	GDD	LS-Intervallmapping	Holmberg und Andersson-Eklund, 2004
10	Dt. H	DYD	49	GDD	Multiple Markerregression	Kühn et al., 2003
10	Fr. H	DYD	86	GDD	Intervall Mapping	Boichard et al., 2003
11	US-HF	DYD	38	GDD	Composite Interval Mapping	Rodriguez-Zas et al., 2002
11	Finnish Ayrshire	EBV	68	GDD	Multiple Markerregression	Schulman et al., 2004
11	Se. Milchkühe	DYD	**	GDD	LS-Intervallmapping	Holmberg und Andersson-Eklund, 2004
12	US-HF	DYD	52	GDD	Composite Interval Mapping	Rodriguez-Zas et al., 2002

Legende Seite 154

Fortsetzung Tabelle A 1

BTA	Population	Merkmal	Position cM	Design	Statistische Methode	Referenz
12	Isr. HF	*	**	DD	ANOVA	Ron et al., 2004
13	US-HF	DYD	**	GDD	Composite Interval Mapping	Rodriguez-Zas et al., 2002
13	Dk. HF	EBV	58,5	GDD	***	Lund et al., 2008
14	US-HF	DYD	21 (0-65)	GDD	LS and VC- Methode	Zhang et al., 1998
14	US-HF	DYD/DSD	37	GDD	Marker Association-Across Families	Ashwell et al., 1997
15	US-HF	*	34	GDD	Regressions-Interval-Analyse	Ashwell et al., 2004
15	Fr. HF	DYD	40	GDD	Intervall Mapping	Boichard et al., 2003
15	US-HF	DYD	43	GDD	Composite Interval Mapping	Rodriguez-Zas et al., 2002
16	US-HF	DYD	51	GDD	Composite Interval Mapping	Rodriguez-Zas et al., 2002
18	US-HF	DYD/DSD	78	GDD	Marker Association-Across Families	Ashwell et al., 1997
18	Nl. HF	EBV	70	GDD	Multiple Markerregression	Schrooten et al., 2000
18	US-HF	DYD	80	GDD	Composite Interval Mapping	Rodriguez-Zas et al., 2002
19	Dt. H	DYD	141	GDD	Multiple Markerregression	Bennewitz et al., 2003
19	Dt. H und Fr. HF	DYD	50	GDD	Multiple Markerregression	Bennewitz et al., 2003
20	US-HF	DYD	**	GDD	Composite Interval Mapping	Rodriguez-Zas et al., 2002
20	US-HF	*	29	GDD	Regressions-Interval-Analyse	Ashwell et al., 2004
20	US-HF	DYD	82	GDD	Composite Interval Mapping	Rodriguez-Zas et al., 2002
20	Isr. HF	*	**	DD	ANOVA	Ron et al., 2004
21	US-HF	DYD	33	GDD	Composite Interval Mapping	Rodriguez-Zas et al., 2002
21	US-HF	DYD	32	GDD	Markereffekt Across Families	Heyen et al., 1999
21	Finnish Ayrshire	EBV	51	GDD	Multiple Markerregression	Schulman et al., 2004
21	US-HF	DYD	84	GDD	Composite Interval Mapping	Rodriguez-Zas et al., 2002
22	US-HF	DYD	**	GDD	Markereffekt Across Families	Heyen et al., 1999
22	US-HF	DYD	44	GDD	Markereffekt Across Families	Heyen et al., 1999
22	Dk. HF	EBV	47,6	GDD	***	Lund et al., 2008
22	US-HF	*	80	GDD	Regressions-Interval-Analyse	Ashwell et al., 2004
23	US-HF	DYD/DSD	35	GDD	Marker association-Across Families	Ashwell et al., 1997
23	US-HF	*	41	GDD	Regressions-Interval-Analyse	Ashwell et al., 2004
23	US-HF	DYD/DSD	51	GDD	Marker Association-Across Families	Ashwell et al., 1997
23	Isr. HF	*	52	DD	ANOVA	Ron et al., 2004

Legende Seite 154

Fortsetzung Tabelle A 1

BTA	Population	Merkmal	Position cM	Design	Statistische Methode	Referenz
23	US-HF	DYD	52	GDD	Markerereffekt Across Families	Heyen et al., 1999
23	Dk. HF	EBV	52,3	GDD	***	Lund et al., 2008
23	US-HF	DYD/DSD	67	GDD	Marker Association-Across Families	Ashwell et al., 1997
23	US-HF	DYD/DSD	64	GDD	Marker Association-Across Families	Ashwell et al., 1997
23	Se. Milchkühe	DYD	**	GDD	LS-Intervallmapping	Holmberg und Andersson-Eklund, 2004
24	Finnish Ayrshire	EBV	28	GDD	Multiple Markerregression	Schulman et al., 2004
24	US-HF	DYD/DSD	40,7	GDD	Marker Association-Across Families	Ashwell et al., 1997
25	US-HF	DYD/DSD	11,7	GDD	Marker Association-Across	Ashwell et al., 1997
26	US-HF	*	27	GDD	Regressions-Interval-Analy	Ashwell et al., 2004
26	US-HF	DYD	14	GDD	LS and VC- Methode	Zhang et al., 1998
27	US-HF	DYD	20	GDD	Composite Interval Mapping	Rodriguez-Zas et al., 2002
27	Dt. H	DYD	8	GDD	Multiple Markerregression	Kühn et al. 2002
27	Finnish Ayrshire	EBV	1	GDD	Multiple Markerregression	Schulman et al., 2002
28	Isr. HF	*	**	DD	ANOVA	Ron et al., 2004
29	Finnish Ayrshire	EBV	16	GDD	Multiple Markerregression	Schulman et al., 2002
29	US-HF	*	50	GDD	Regressions-Interval-Analyse	Ashwell et al., 2004

* = Berechnung in Paper beschrieben

** = Keine Kartenlokalisierung angegeben

*** = verschiedene statistische Modelle angewendet

Fetgedruckt = QTL-Bereich konnte in voneinander unabhängigen Studien bestätigt werden

US-HF = US-amerikanische Holstein Friesian; Dt. Milchkühe = Deutsch Holstein, deutsches Fleckvieh, deutsches Braunvieh

Dt. H = Deutsch Holstein; Fr. HF = französische Holstein Friesian; Ni. HF = niederländische Holstein Friesian

Isr. HF = israelische Holstein Friesian; N. Milchkühe = norwegische Milchkühe; Se. Milchkühe = schwedische Milchkühe

ANHANG

Tabelle A 2: DNA-Proben von Rindern verschiedener Rassen, die zur Polymorphismensuche eingesetzt wurden

Rasse	Prob_ID	Rasse	Prob_ID
Dt. Holstein	Bianca	Dt. Holstein	H 2871
	H 23		H 2941
	H 75		H 3061
	H 190		H 3099
	H 209		H 3236
	H 267		H 3256
	H 288		H 3319
	H 326		H 3434
	H 407		H 3437
	H 417		H 3602
	H 429		H 3663
	H 497		H 3761
	H 660		H 3802
	H 706		H 3961
	H 711	Dt. Angus	DA grün 2
	H 731		DA grün 14
	H 1007		DA blau 24
	H 1041		DA blau 26
	H 1052	Fleckvieh	FLV blau 1
	H 1111		FLV gelb 5
H 1415	FLV blau 18		
H 1634	FLV blau 19		
H 1727	White Fulani	WF 9	
H 1948		WF 31	
H 2851	Bunaji	B 7	
H 2864		B 54	

ANHANG

Tabelle A 3: Genutzte Marker für die vorläufige QTL-Berechnung auf BTA02. Die Position in cM gibt die Lage der Marker in der gesamten Kopplungskarte des MARC_USDA von BTA02 wieder, wobei 0 cM dem Beginn des Chromosoms entspricht.

Marker	Position (cM)	Intervall * (Nr.)
DIK2729	50,87	1
DIK4025	56,912	2
ILSTS098	60,259	3
ILSTS82	63,967	4
BMS353	68,653	5
DIK4972	69,771	6
BMS1837	72,497	7
MNB48	72,497	8
BMS778	74,84	9
DIK2862	75,326	10
DIK4676	77,631	11
CSSM53	79,613	12
DIK5133	79,613	13
TGLA226	85,848	14
DIK4880	87,486	15
DIK4726	88,784	16
TGLA110	92,484	17
MM8D3	96,134	18
BM1223	100,176	19
BMS1987	107,475	20
DIK5023	112,059	21
DIK1155	117,962	

* = Zwischen zwei Markern befindliches Intervall

ANHANG

Tabelle A 4: Allele und Allelfrequenzen der untersuchten Mikrosatelliten

Mikrosatellit	Anzahl Allele	Allel	Allelfrequenz
BM1223	6	163	76,72
		169	0,14
		171	0,05
		175	22,02
		177	0,04
		179	1,03
BMS1264	3	137	40,57
		143	27,5
		147	31,93
BMS1837	6	91	38,21
		97	0,31
		98	0,04
		101	6,68
		103	5,07
		107	49,69
BMS1987	4	111	67,49
		113	0,54
		121	31,2
		125	0,77
BMS353	5	113	29,59
		117	27,22
		119	0,22
		121	0,04
		125	42,93
BMS778	8	141	0,18
		143	3,87
		151	15,47
		153	16,68
		157	46,54
		159	14,61
		161	2,61
		163	0,04

ANHANG

Tabelle A 4 (Fortsetzung)

Mikrosatellit	Anzahl Allele	Allel	Allelfrequenz
CSSM53	5	100	21,41
		102	54,76
		106	0,13
		110	23,65
		114	0,04
DIK1155	4	199	0,04
		201	67,67
		203	11,85
		205	20,44
DIK2729	4	245	1,25
		255	70,19
		257	25,61
		259	2,95
DIK2862	10	154	0,09
		156	0,14
		158	11,54
		160	0,05
		162	58,75
		164	0,81
		166	22,23
		168	0,27
		170	0,14
		172	6
DIK4025	8	201	0,18
		203	87,59
		205	6,68
		206	0,04
		207	3,9
		208	0,09
		209	1,34
		211	0,18
DIK4369	6	191	37,27
		193	36,19
		195	6,05
		197	0,63
		199	0,36
		201	19,49

ANHANG

Tabelle A 4 (Fortsetzung)

Mikrosatellit	Anzahl Allele	Allel	Allelfrequenz
DIK4673	6	223	3,9
		225	26,75
		227	28,33
		231	40,66
		237	0,32
		238	0,05
DIK4676	4	199	2,83
		201	95,68
		203	1,08
		205	0,4
DIK4726	7	178	0,63
		182	0,49
		184	2,51
		186	81,63
		188	7,8
		190	6,9
		192	0,04
DIK4880	5	141	3,34
		145	50,9
		147	31,62
		149	1,85
		153	12,29
DIK4972	5	221	6,67
		225	0,05
		233	36,79
		241	5,95
		243	50,54
DIK5023	4	173	43,08
		175	42,46
		177	9,6
		179	4,87
		173	43,08

ANHANG

Tabelle A 4 (Fortsetzung)

Mikrosatellit	Anzahl Allele	Allel	Allelfrequenz
DIK5133	7	201	0,05
		203	17,97
		205	9,01
		207	47,57
		209	0,09
		211	24,23
		213	1,08
ILSTS098	9	163	54,47
		165	0,49
		167	1,48
		171	0,58
		173	8,27
		179	0,09
		183	8,01
		187	25
		189	1,61
ILSTS82	7	103	0,04
		107	25,43
		109	0,13
		111	20,5
		115	1,88
		117	9,09
		119	42,93
MM8D3	7	139	12,72
		141	0,49
		143	59,95
		145	2,69
		147	3,99
		149	17,79
		151	2,37

ANHANG

Tabelle A 4 (Fortsetzung)

Mikrosatellit	Anzahl Allele	Allel	Allelfrequenz
MNB48	11	161	0,05
		165	0,19
		167	11,91
		169	14,7
		177	0,23
		179	0,23
		185	0,05
		187	16,79
		189	53,35
		191	2,37
		193	0,14
TGLA110	5	156	1,7
		158	76,45
		160	3,66
		164	18,14
		166	0,04
TGLA226	5	142	20,69
		144	19,08
		146	51,65
		148	1,03
		154	7,55

Tabelle A 5: Genotypen der Väter bezüglich aller 25 untersuchten Mikrosatelliten

	DIK2729	DIK4025	DIK4673	ILSTS98	ILSTS82	BMSI264	DIK4369	BMS353	DIK4972
ADR II - BC	255/255	203/203	227/231	163/163	107/117	137/147	191/191	113/125	233/243
ADR II - BD	255/257	203/203	227/227	163/163	107/119	143/147	191/201	113/125	221/243
ADR II - DA	255/255	203/203	231/231	187/187	111/119	137/143	191/193	117/125	243/243
ADR-MAS 1	255/255	203/205	227/227	163/167	119/119	137/137	191/195	113/125	233/243
ADR-MAS 2	255/257	203/203	225/231	163/183	111/119	137/143	193/193	113/117	233/243
ADR-MAS 3	255/257	203/207	227/231	163/163	107/119	143/147	191/193	117/117	233/243
ADR-MAS 4	257/257	203/203	225/225	163/173	107/119	137/143	191/193	125/125	233/243
ADR-MAS 5	255/257	203/203	227/231	163/183	107/119	137/143	193/201	113/117	233/241
ADR-MAS 6	255/259	203/203	225/225	163/173	107/119	143/147	191/193	117/125	233/243
ADR-MAS 7	255/257	203/203	225/225	163/189	115/119	137/143	193/195	113/117	233/243

Fortsetzung Tabelle A 5

	<i>MNB48</i>	<i>BMS1837</i>	<i>DIK2862</i>	<i>BMS778</i>	<i>DIK4676</i>	<i>CSSM53</i>	<i>DIK5133</i>	<i>TGLA226</i>	<i>DIK4880</i>
ADR II - BC	167/189	091/107	162/166	153/157	201/201	100/102	203/211	144/146	147/153
ADR II - BD	189/189	101/107	162/166	153/157	201/201	100/110	207/211	144/146	145/153
ADR II - DA	169/189	107/107	162/162	151/157	201/201	102/102	205/207	146/146	145/145
ADR-MAS 1	167/189	091/091	162/162	143/157	201/201	100/110	207/211	142/142	141/147
ADR-MAS 2	187/189	091/107	162/172	151/159	201/201	102/110	207/211	146/146	145/147
ADR-MAS 3	187/189	103/107	162/172	159/161	201/201	102/102	207/211	142/146	145/153
ADR-MAS 4	187/189	091/107	162/166	157/157	201/201	102/102	203/207	146/154	145/147
ADR-MAS 5	167/189	091/107	158/162	151/153	201/201	100/110	203/207	144/146	145/147
ADR-MAS 6	197/187	091/107	162/166	143/157	201/201	102/110	207/211	142/146	145/145
ADR-MAS 7	169/169	091/107	158/172	157/159	199/201	102/110	203/207	142/144	145/145

Legende Seite 164

Fortsetzung Tabelle A 5

	<i>DIK4726</i>	<i>TGLA110</i>	<i>MM8D3</i>	<i>BMI223</i>	<i>BMS1987</i>	<i>DIK5023</i>	<i>DIK1155</i>
ADR II - BC	186/186	158/158	143/143	163/175	111/111	173/175	201/205
ADR II - BD	186/186	158/158	143/143	163/175	111/111	173/173	202/206
ADR II - DA	186/186	158/164	143/149	163/163	111/121	173/175	202/202
ADR-MAS 1	186/188	160/164	149/151	163/163	111/111	175/177	201/201
ADR-MAS 2	186/186	158/158	143/143	163/163	121/121	175/175	201/201
ADR-MAS 3	186/186	158/158	143/143	163/163	111/121	173/175	203/203
ADR-MAS 4	186/190	158/158	139/143	163/163	111/111	173/177	201/205
ADR-MAS 5	186/186	158/158	143/143	175/175	111/111	173/179	203/205
ADR-MAS 6	186/186	158/164	139/143	163/163	111/121	173/175	201/201
ADR-MAS 7	186/188	158/158	139/143	163/175	111/121	173/175	201/205

Fettgedruckte Genotypen= heterozygot
 ADR-MAS 5-7 = rekonstruierte Genotypen

Tabelle A 6: SNP-Allelfrequenz in den einzelnen Familien und im gesamten Probenmaterial

Familie	CXCR1/5'UTR/-96		CXCR1/5'UTR/-1768		CXCR1/Ex1/+199		CXCR1/+777		IGFBP2Int1/+55		STAT1/3'UTR	
	Allel A	Allel G	Allel A	Allel T	Allel C	Allel T	Allel G	Allel C	Allel A	Allel G	Allel T	Allel C
ADR II-BC	0,22	0,78	0,08	0,92	0,22	0,78	0,21	0,79	0,47	0,53	0,14	0,86
ADR II-BD	0,51	0,49	0,11	0,89	0,53	0,47	0,49	0,51	0,24	0,76	0,17	0,83
ADR II-DA	0,57	0,43	0,11	0,89	0,57	0,43	0,43	0,57	0,42	0,58	0,63	0,37
ADR-MAS 1	0,48	0,52	0,06	0,94	0,52	0,48	0,51	0,49	0,68	0,32	0,47	0,53
ADR-MAS 2	0,56	0,44	0,34	0,66	0,55	0,45	0,52	0,48	0,45	0,55	0,37	0,63
ADR-MAS 3	0,57	0,43	0,09	0,91	0,58	0,42	0,54	0,46	0,23	0,77	0,46	0,54
ADR-MAS 4	0,61	0,39	0,16	0,84	0,64	0,36	0,64	0,36	0,35	0,65	0,43	0,57
ADR-MAS 5	0,53	0,47	0,30	0,70	0,49	0,51	0,48	0,52	0,48	0,52	0,18	0,82
ADR-MAS 6	0,50	0,50	0,25	0,75	0,47	0,53	0,44	0,56	0,53	0,47	0,16	0,84
ADR-MAS 7	0,51	0,49	0,07	0,93	0,47	0,53	0,40	0,60	0,24	0,76	0,14	0,86
Gesamt	0,50	0,50	0,15	0,85	0,50	0,50	0,52	0,48	0,41	0,59	0,32	0,68
Hetero gesamt	0,54	0,46	0,30	0,70	0,54	0,46	0,49	0,51	0,45	0,55	0,43	0,57

ANHANG

Tabelle A 7: Genotypfrequenzen im gesamten Probenmaterial und in den heterozygoten Familien

SNP	Gesamt		Heterozygote Familien	
	Genotyp	Frequenz	Genotyp	Frequenz
<i>CXCR1/5'UTR/-96</i>	GG	0,25	GG	0,23
	GA	0,50	GA	0,56
	AA	0,25	AA	0,21
<i>CXCR1/5'UTR/-1768</i>	AA	0,03	AA	0,10
	AT	0,24	AT	0,39
	TT	0,73	TT	0,51
<i>CXCR1/Ex1/+199</i>	TT	0,27	TT	0,22
	TC	0,48	TC	0,49
	CC	0,25	CC	0,29
<i>CXCR1/+777</i>	GG	0,29	GG	0,25
	GC	0,49	GC	0,49
	CC	0,22	CC	0,26
<i>IGFBP2/Int1/+55</i>	GG	0,33	GG	0,29
	GA	0,51	GA	0,50
	AA	0,16	AA	0,21
<i>STAT1/3'UTR</i>	TT	0,10	TT	0,27
	TC	0,43	TC	0,28
	CC	0,47	CC	0,45

ANHANG

Tabelle A 8: Allel- und Genotypfrequenzen für den SNP *PIP5K3/Ex26/+69* in den heterozygoten Familien

Familie	Allelfrequenz		Genotypfrequenz		
	G	T	GG	GT	TT
ADR-MAS 1	0,23	0,77	0,02	0,41	0,57
ADR-MAS 6	0,08	0,92	0	0,16	0,84
Gesamt	0,16	0,84	0,01	0,29	0,70

Tabelle A 9: Ergebnisse der Assoziationsanalyse in einem 20 cM großen den jeweiligen SNP umschließenden Fenster

QTL*	<i>CXCR1/5`UTR/-96</i>					<i>CXCR1/5`UTR/-1768</i>				
	LR	QTLV	GenV	QTL-		LR	QTLV	GenV	QTL-	
				Anteil	ResV				Anteil	ResV
1	9,800	0,034	0,245	13,88%	0,00026	21,498	0,026	0,186	13,90%	0,013
2	9,082	0,030	0,245	12,44%	0,00026	20,686	0,036	0,201	17,96%	0,011
3	8,742	0,029	0,245	11,70%	0,00025	20,628	0,035	0,200	17,57%	0,011
4	8,392	0,027	0,245	11,17%	0,00024	20,374	0,036	0,201	17,81%	0,010
5	8,348	0,027	0,244	11,08%	0,00025	20,272	0,038	0,203	18,61%	0,010
6	8,178	0,028	0,244	11,31%	0,00025	20,212	0,034	0,199	16,85%	0,011
7	8,054	0,028	0,244	11,53%	0,00026	19,972	0,033	0,198	16,43%	0,011
8	7,756	0,028	0,244	11,36%	0,00027	19,442	0,037	0,202	18,07%	0,011
9	7,456	0,027	0,244	11,13%	0,00030	18,898	0,042	0,208	20,41%	0,011
10	7,150	0,026	0,244	10,76%	0,00033	18,272	0,051	0,217	23,58%	0,010
11	6,984	0,026	0,244	10,64%	0,00034	18,016	0,054	0,220	24,55%	0,010

Legende Seite 169

ANHANG

Tabelle A 9 (Fortsetzung)

QTL*	<i>CXCRI/5`UTR/-96</i>					<i>CXCRI/5`UTR/-1768</i>				
	LR	QTLV	GenV	QTL- Anteil	ResV	LR	QTLV	GenV	QTL- Anteil	ResV
12	6,804	0,026	0,244	10,49%	0,00035	17,664	0,058	0,224	25,92%	0,010
13	6,500	0,025	0,245	10,21%	0,00038	17,006	0,068	0,235	28,94%	0,009
14	6,352	0,025	0,245	10,07%	0,00035	16,682	0,067	0,234	28,77%	0,009
15	6,194	0,024	0,245	9,95%	0,00032	16,358	0,065	0,231	27,96%	0,009
16	6,100	0,024	0,245	9,94%	0,00029	16,072	0,063	0,229	27,31%	0,009
17	5,998	0,024	0,245	9,97%	0,00027	15,642	0,059	0,226	26,22%	0,009
18	6,028	0,025	0,245	10,24%	0,00025	15,436	0,055	0,221	24,89%	0,009
19	6,000	0,026	0,244	10,48%	0,00024	15,116	0,052	0,217	23,76%	0,010
20	6,040	0,026	0,244	10,78%	0,00023	14,838	0,049	0,214	22,88%	0,010
21	6,066	0,028	0,245	11,27%	0,00021	14,456	0,045	0,210	21,62%	0,010
22	10,038	0,034	0,245	13,81%	0,00012	11,624	0,0003	0,204	0,13%	0,00013
23	9,388	0,030	0,245	12,43%	0,00012	10,678	0,0003	0,208	0,12%	0,00013
24	9,186	0,029	0,245	11,98%	0,00012	10,314	0,0002	0,210	0,12%	0,00012
25	8,946	0,028	0,245	11,61%	0,00011	9,932	0,0002	0,211	0,12%	0,00012
26	8,978	0,028	0,245	11,55%	0,00011	9,932	0,0002	0,211	0,12%	0,00012
27	8,808	0,029	0,244	11,79%	0,00012	9,756	0,0003	0,210	0,12%	0,00013
28	8,676	0,029	0,244	11,99%	0,00012	9,590	0,0003	0,209	0,13%	0,00014
29	8,368	0,029	0,244	11,79%	0,00012	9,192	0,0003	0,209	0,15%	0,00015
30	8,068	0,028	0,244	11,52%	0,00013	8,848	0,0003	0,210	0,16%	0,00017

Legende Seite 169

ANHANG

Tabelle A 9 (Fortsetzung)

QTL	<i>CXCRI/5'UTR/-96</i>					<i>CXCRI/5'UTR/-1768</i>				
	LR	QTLV	GenV	QTL-Anteil	ResV	LR	QTLV	GenV	QTL-Anteil	ResV
31	7,790	0,027	0,244	11,15%	0,00014	8,598	0,0003	0,211	0,17%	0,00017
32	7,634	0,027	0,245	11,04%	0,00014	8,462	0,0004	0,211	0,17%	0,00018
33	7,466	0,027	0,245	10,90%	0,00014	8,318	0,0004	0,211	0,17%	0,00018
34	7,178	0,026	0,245	10,62%	0,00014	8,094	0,0004	0,211	0,18%	0,00019
35	6,996	0,026	0,245	10,52%	0,00014	7,932	0,0004	0,212	0,17%	0,00018
36	6,760	0,025	0,245	10,41%	0,00013	7,714	0,0004	0,212	0,17%	0,00018
37	6,576	0,025	0,245	10,39%	0,00013	7,568	0,0003	0,212	0,16%	0,00017
38	6,364	0,025	0,245	10,36%	0,00012	7,458	0,0003	0,212	0,16%	0,00017
39	6,286	0,026	0,245	10,58%	0,00012	7,430	0,0003	0,211	0,15%	0,00016
40	6,136	0,026	0,245	10,74%	0,00011	7,328	0,0003	0,211	0,15%	0,00016
41	6,042	0,027	0,245	10,92%	0,00010	7,292	0,0003	0,210	0,14%	0,00015
42	5,918	0,028	0,245	11,26%	0,00010	7,232	0,0003	0,209	0,14%	0,00014

LR = Likelihood-Ratio-Testergebnisse

QTLV = QTL-Varianz (2x gametische Varianz)

GenV = totale genetische Varianz (polygene Varianz + 2x gametische Varianz)

QTL-Anteil = QTLV/GenV

ResV = Restvarianz

Danksagung

Ich danke Herrn Professor Erhardt für die freundliche Überlassung des Themas, die Betreuung der Arbeit und die konstruktive Kritik bei der Durchsicht des Manuskripts.

Christina danke ich für die wissenschaftliche Unterstützung bei der vorliegenden Arbeit und die intensiven und anregenden Gespräche in unserem gemeinsamen Büro.

Christine danke ich für die geduldige Einführung in die Geheimnisse der QTL-Feinkartierung und die immer wieder gewährte Hilfe bei allen statistischen Fragen. Für diese möchte ich auch Horst danken.

Mein Dank gilt Renate dafür, dass sie immer den Überblick über die zahlreichen Proben hatte und mir damit sicherlich viel Zeit erspart hat. Außerdem möchte ich ihr, Margarete, Anja und auch den anderen Mitarbeitern für die Hilfe bei der Durchführung der Laborarbeiten danken. Danke Margarete, dass du dich gelegentlich um meine kleine Bestie gekümmert hast und ich so die Möglichkeit hatte weiteren tierärztlichen Tätigkeiten nachzugehen. Gesine danke ich für ihre Hilfe bei vielen diese Arbeit betreffenden Dingen. Meinen Doktorandenkolleginnen danke ich für die schöne und lustige Zeit am Institut, vor allem in den Pausen und bei den „geselligen“ Abenden der DGFZ-Tagungen. Karen danke ich dafür, dass ich durch sie auch die Tierzucht in Frankreich kennenlernen konnte.

Ich bin dankbar für die Möglichkeit, assoziiertes Mitglied im Graduiertenkolleg 455 „Molekulare Veterinärmedizin“ gewesen sein zu können.

Pablo, Dir danke ich dafür, dass Du mich ohne Wenn und Aber in allen Dingen unterstütz. Außerdem danke ich Dir, dass du ohne langes Zögern deine Zukunftspläne für mich auf den Kopf gestellt hast und ich so nicht zuletzt diese Arbeit anfertigen konnte.

Meiner Schwester Nadine möchte ich dafür danken, dass sie mich für die beste Tierärztin aller Zeiten hält und sie genau weiß, wie sie mich motivieren und aufmuntern kann.

Vor allem möchte ich aber den Menschen danken, ohne die das alles gar nicht denkbar gewesen wäre: Meinen Eltern danke ich dafür, dass sie mir ermöglicht haben, meinen Traum zu verwirklichen, immer an mich geglaubt haben und immer für mich da sind. Ich danke ihnen dafür, dass ich auch heute noch fragen kann „wie es meinem Hamster geht“!

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation vollständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.



edition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5874-6



9 17 8 3 8 3 5 19 5 8 7 4 6