

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

Betreuer: Prof. Dr. G. Erhardt

Genetische Diversität bei europäischen, asiatischen und afrikanischen Schaf- und Ziegenrassen am κ -Kasein-(*CSN3*) und Interleukin-2-Genort (*IL2*)

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

Eingereicht von

Katja Hartmann, geb. Gutscher
Tierärztin aus Ludwigsburg

Gießen 2010

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

Dekan:

Prof. habil. Dr. Dr. G. Baljer

Gutachter:

Prof. Dr. Dr. G. Erhardt

PD Dr. Hermann Willems

Tag der Disputation:

19.02.2010

Die Untersuchungen wurden durch Mittel der Europäischen Union gefördert
(ECONOGENE QLK5-CT-2001-02461)

Teile dieser Arbeit wurden in folgenden Publikationen verwendet:

- CAPPUCIO, I., PARISET, L., AJMONE-MARSAN, P., DUNNER, S., CORTES, O., ERHARDT, G., LÜHKEN, G., GUTSCHER, K., JOOST, S., NIJMAN, I.J., LENSTRA, A., ENGLAND, P.R., ZUNDEL, S., OBEXER-RUFF, G., BEJA-PEREIRA, A., VALENTINI, A. and THE ECONOGENE CONSORTIUM** (2006): Allele frequencies and diversity parameters of 27 single nucleotide polymorphisms within and across breeds. *Mol Ecol Notes* 6, 992-997.
- CHESSA, S., BUDELLI, E., GUTSCHER, K., CAROLI, A. and ERHARDT, G.** (2003): Short communication: Simultaneous identification of five kappa-casein (CSN3) alleles in domestic goat by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism. *J Dairy Sci* 86, 3726-3729.
- PARISET, L., CAPPUCIO, I., AJMONE-MARSAN, P., BRUFORD, M.W., DUNNER, S., CORTES, O., ERHARDT, G., PRINZENBERG, E.-M., GUTSCHER, K., JOOST, S., PINTO-JUMA, G., NIJMAN, I.J., LENSTRA, A., PEREZ, T., VALENTINI, A. and THE ECONOGENE CONSORTIUM** (2006): Characterization of 37 breed-specific single-nucleotide polymorphisms in sheep. *J Heredity* 97, 531-534.
- PRINZENBERG, E.-M., GUTSCHER, K., CHESSA, S., CAROLI, A. and ERHARDT, G.** (2005): Caprine Kappa-Casein (CSN3) Polymorphism: New Developments in Molecular Knowledge. *J Dairy Sci* 88, 1490-1498.

Meiner Familie

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	V
TABELLENVERZEICHNIS	VIII
VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN	XI
1 EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG	1
2 LITERATURÜBERSICHT.....	3
2.1 Landwirtschaftliche Nutzierrassen als genetische Ressourcen	3
2.1.1 Entstehung der genetischen Diversität bei landwirtschaftlichen Nutztieren	3
2.1.2 Bedeutung tiergenetischer Ressourcen (Animal genetic resources / AnGR)	4
2.1.3 Möglichkeiten der Erhaltung von AnGR.....	5
2.1.3.1 In-situ-Erhaltung	6
2.1.3.2 Ex-situ-lebend-Erhaltung	7
2.1.3.3 Ex-situ-Erhaltung	7
2.1.3.4 Überstaatliche, staatliche und gesellschaftliche Aktivitäten zum Erhalt von Haustierrassen	8
2.2 Gefährdete Schaf- und Ziegenrassen	10
2.2.1 Situation bedrohter Rassen	10
2.2.2 Gründe für die Erhaltung von Schaf- und Ziegenrassen	12
2.2.2.1 Identifikation von funktionellen Genen anhand genetischer Polymorphismen	14
2.2.2.2 Lokale Adaptation und genetische Polymorphismen.....	15
2.3 Möglichkeiten der Erfassung und Charakterisierung genetischer Diversität.....	17
2.3.1 Proteinpolymorphismen (Allozyme)	17
2.3.2 Mitochondriale DNA.....	18
2.3.3 Random amplified polymorphic DNA (RAPD).....	18
2.3.4 Amplified fragment length polymorphism (AFLP)	19
2.3.5 Mikrosatelliten	19
2.3.6 Single Nucleotide Polymorphism (SNP).....	20
2.3.6.1 Molekularbiologische Verfahren zur Detektion und zur Genotypisierung von SNPs in Kandidatengenen.....	22
2.3.7 Biometrische Methoden zur Beschreibung und Schätzung der genetischen Diversität	26
2.4 Genetische Diversität beim kleinen Wiederkäuer in Europa, Asien und Afrika	28
2.4.1 Charakterisierung genetischer Diversität beim kleinen Wiederkäuer in Europa.....	28
2.4.2 Charakterisierung genetischer Diversität beim kleinen Wiederkäuer in Asien	30
2.4.3 Charakterisierung genetischer Diversität beim kleinen Wiederkäuer in Afrika	30

2.5	Kaseingene beim Wiederkäuer	32
2.5.1	Aufbau des Kaseingenclusters	32
2.5.2	Das κ-Kaseingen (<i>CSN3</i>) beim kleinen Wiederkäuer	33
2.5.2.1	Struktur und Aufbau.....	33
2.5.3	Vorkommen von genetischen Varianten beim kleinen Wiederkäuer	33
2.5.3.1	Die <i>CSN3</i> Varianten bei der Ziege.....	33
2.5.3.2	Das κ -Kasein-Gen (<i>CSN3</i>) beim Schaf.....	38
2.5.3.3	Struktur und Funktion des Genproduktes	38
2.5.4	Untersuchungen von κ-Kaseingenvarianten im Rahmen von Evolutionsstudien beim Wiederkäuer	41
2.6	Interleukin-2-Gen beim kleinen Wiederkäuer	42
2.6.1	Lokalisation und Struktur bei Schaf und Ziege	42
2.6.2	Mutationen in translatierten Genabschnitten	43
2.6.3	Mutationen in nicht translatierten Genabschnitten	43
2.6.4	Bedeutung genetischer Varianten in immunmodulatorisch wirksamen Zytokinen des spezifischen Abwehrsystems	43
2.6.4.1	Aufgaben und Funktion des Interleukin-2	43
2.6.4.2	Einfluss von genetischen Varianten im Interleukin-2-Gen beim Menschen	44
2.6.4.3	Einfluss genetischer Varianten des <i>IL2</i> auf die Fitness bei Tieren	45
2.6.4.4	Evolution des <i>IL2</i> beim Wiederkäuer	46
3	MATERIAL UND METHODEN	47
3.1	Probenmaterial	47
3.1.1	Proben zur Entwicklung eines PCR-SSCP-Protokolls zur Analyse des κ-Kaseingens bei der Ziege	47
3.1.2	Proben für die Untersuchung der genetischen Diversität innerhalb und zwischen den Rassen	47
3.2	Verbrauchsmaterial	54
3.2.1	Chemikalien und Reaktionskits	54
3.2.2	Enzyme	55
3.2.3	Plastikwaren, Filter und Tücher	55
3.3	Geräte	55
3.4	Computerprogramme:	56
3.5	Methoden	57
3.5.1	DNA-Extraktion und Konzentrationsbestimmung	57
3.5.2	Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	57
3.5.3	Primerdesign	59
3.5.4	Auswahl der Primer	59
3.5.5	Überprüfung der PCR-Produkte durch Agarosegelelektrophorese mit Färbung und Photodokumentation	61
3.5.6	PCR-Optimierung und Überprüfung der Primerspezifität	61
3.5.7	Screening und Nachweis von Mutationen	61

3.5.7.1	Durchsuchen der NCBI Datenbanken (URL 11) nach bereits existierenden Sequenzinformationen	61
3.5.7.2	PCR-Single-Strand-Conformation-Polymorphism (PCR-SSCP)	62
3.5.7.3	Herstellung nicht denaturierender Polyacrylamidgele	62
	Silberfärbung	64
3.5.8	DNA-Sequenzanalyse	65
3.5.8.1	Cycle-Sequencing von PCR-Produkten auf dem ABI Prism 377	65
3.5.8.2	DNA-Mengenschätzung anhand eines Agarosegels mit Mengenstandards	66
3.5.8.3	Aufreinigung von PCR-Produkten	66
3.5.8.4	Herstellung des Sequenzanalysegels	68
3.5.9	PCR-Restriktions-Fragment-Längenpolymorphismus (PCR-RFLP)	69
3.5.10	Biometrische Methoden	71
3.5.10.1	Schätzung der genetischen Diversität	71
3.5.10.2	Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWG)	71
3.5.10.3	F-Statistik	71
3.5.10.4	Ewens-Watterson-Homozygotie-Test und Identifizierung von „Ausreißer“-Genorten	71
3.5.10.5	Berechnung phylogenetischer Bäume für die κ -Kaseingenvarianten bei der Hausziege (<i>Capra hircus</i>) und deren verwandten Wildformen (<i>Capra aegagrus/</i> <i>Capra pyrenaica</i>).	72
4	ERGEBNISSE	73
4.1	Polymorphismen im κ-Kasein-Gen (CSN3) Exon 4	73
4.1.1	Darstellung der CSN3 Allele der Ziege	73
4.1.1.1	Frequenzen der CSN3 Allele der Ziege	80
4.1.1.2	Hardy-Weinberg Gleichgewicht	83
4.1.1.3	Genetische Diversität am caprinen CSN3	83
4.1.1.4	Phylogenetische Bäume auf Basis der caprinen CSN3 Sequenzen ermittelt mit einer „Maximum Parsimony Analysis“	87
4.1.2	Untersuchung des CSN3 Exon 4 beim Schaf	89
4.1.2.1	Mutationssuche	89
4.1.2.2	Sequenzanalyse	89
4.1.2.3	Allelfrequenzen	90
4.1.2.4	Hardy-Weinberg Gleichgewicht	91
4.1.2.5	Genetische Diversität am ovinen CSN3	91
4.2	Polymorphismen im Interleukin-2-Gen	93
4.2.1	Allelfrequenzen eines synonymen A/G Basenaustauschs im Exon 1 in den verschiedenen Schafrassen	93
4.2.1.1	Hardy-Weinberg Gleichgewicht	93
4.2.2	Allelfrequenzen eines C/T Austauschs im Intron 3 in den verschiedenen Schafrassen	94
4.2.2.1	Hardy-Weinberg Gleichgewicht	94

4.2.2.2	Genetische Diversität der untersuchten Abschnitte des <i>IL2</i> bei den zur Analyse eingesetzten Schafrassen.....	96
4.2.2.3	Ausreißeranalyse für die untersuchten SNP-Marker	100
4.2.3	Mutationsuche am caprinen IL2 Genort	101
4.2.3.1	Mutationssuche in der 5'UTR-Region des <i>IL2</i> bei verschiedenen Ziegenrassen.....	101
4.2.3.2	Sequenzanalyse von PCR-Produkten, die die Promotorregion, Exon 1, 2, 3 und Intron1 und 2 umfassten.....	102
4.2.3.3	Position der Mutation in der 5'UTR des Interleukin-2-Gens	102
4.2.3.4	Genotypisierung und Allelfrequenzen der Mutation in der 5'UTR bei Ziegenrassen.....	102
4.2.3.5	Allelfrequenzen der Mutation im Intron 2 des Interleukin-2-Gens bei Ziegenrassen.....	104
4.2.3.6	Hardy-Weinberg Gleichgewicht	105
4.2.3.7	Genetische Diversität der untersuchten Abschnitte des <i>IL2</i> bei Ziegen	106
4.2.3.8	Ausreißeranalyse für die caprinen SNP-Marker	108
5	DISKUSSION	109
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	128
7	SUMMARY	132
8	URL-LISTE	135
9	LITERATURVERZEICHNIS	137

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau des Kaseingen-Clusters mit Größenangaben in kb für Wiederkäuer (modifiziert nach RIJNKELS et al., 1997).	32
Abbildung 2: Schematischer Aufbau des <i>CSN3</i> mit Größenangaben der Exons für die kleinen Wiederkäuer in Anzahl der Basenpaare (Quelle modifiziert nach RIJNKELS et al., 1997).	33
Abbildung 3: Verteilung der untersuchten europäischen Ziegenrassen	51
Abbildung 4: Verteilung der untersuchten europäischen Schafrassen	51
Abbildung 5: PCR-SSCP-Gel nach maximaler Auftrennung unter den optimierten Bedingungen (12°C, 275 Volt, 16h) aus Tabelle 22. <i>CSN3</i> *G konnte nur unter zu Hilfenahme der geringgradig schneller migrierenden sekundären Banden (markiert mit Pfeilkopf) von <i>CSN3</i> *D, L, I und K unterschieden werden.	74
Abbildung 6: PCR-SSCP-Gel nach Silberfärbung unter den Elektrophoresebedingungen: 350 Volt für 16 Stunden bei 5° C. Unter diesen Bedingungen etwas geringere Migrationsgeschwindigkeit der ssDNA gegenüber Abb. 5.	74
Abbildung 7: Auftrennung von 459 bp DNA-Fragmenten, bei deren DNA ein oder beide Allele nach PCR-SSCP des 405 bp Fragment als <i>CSN3</i> *D, F, I, K oder L identifiziert wurden, nach PCR-RFLP mit <i>Alw</i> 44I. PCR-Produkt in 13,15 und 16 homozygot für Cytosin, in 14 homozygot für Thymin, in 2, 3, 4, 5, 7-12 heterozygot für Thymin/Cytosin an Position 591. Kein PCR-Produkt in 6 darstellbar.	75
Abbildung 8: Auftrennung der 406bp DNA Fragmente, von denen ein oder beide Allele nach PCR-SSCP als <i>CSN3</i> *D, F, I, K, oder L identifiziert wurden, nach PCR-RFLP mit <i>Bse</i> NI. PCR-Produkte in 4, 7, und 10 homozygot für Guanin, in 3, 5, 8 und 9 heterozygot für Adenin/Guanin an Position 309.	77
Abbildung 9: Identifizierung zweier Bandenmuster (X und Y) im Rahmen der Typisierung des Probenmaterials am caprinen <i>CSN3</i> , die ein unbekanntes Laufverhalten bei der Polyacrylamidgelelektrophorese zeigen. Die zur Identifizierung der unbekanntes Allele herangezogenen Banden sind mit einem Kreis gekennzeichnet und wurden zunächst als X und Y bezeichnet.	78
Abbildung 10: Sequenzierte Standardproben des caprinen <i>CSN3</i> (<i>CSN3</i> *A, B, C, D, E) im PCR-SSCP-Gel nach Laufgeschwindigkeit geordnet (Es fehlen <i>CSN3</i> *G, H, J und B') im Vergleich mit X und Y.	79
Abbildung 11: Sequenzabschnitt aus Exon 4 von <i>CSN3</i> *M mit C/T (Y) Austausch an Position 385 nach Referenzsequenz von COLL (1993).	79

Abbildung 12: Sequenzabschnitt aus Exon 4 von <i>CSN3</i> * <i>M</i> mit A/G (R) Austausch an Position 550 nach Referenzsequenz von COLL (1993).....	79
Abbildung 13: Auftrennung der 406 bp PCR-Fragmente nach PCR-RFLP mit <i>Pst</i> I. MM homozygot für Cytosin (<i>CSN3</i> * <i>M</i>), BB homozygot für Thymin, BM heterozygot für Cytosin/Thymin an Position 550.	80
Abbildung 14: Auf Nukleotidsequenzen der <i>CSN3</i> -Allele basierender „Maximum-Parsimony-Consensus“-Baum, ungewurzelt.....	88
Abbildung 15: Gewurzelter, auf Nukleotidsequenzen der <i>CSN3</i> -Allele basierender „Maximum-Parsimony-Consensus“-Baum, der Aufschluss über Verwandtschaftsverhältnisse und die wahrscheinliche evolutionäre Entwicklung der caprinen <i>CSN3</i> -DNA gibt. Allel B/ <i>C. aegagrus</i> wurde hier als Ausgangssequenz ausgewählt.....	88
Abbildung 16: Ausschnitt des Ergebnisses der PCR-SSCP-Analyse eines 406 bp umfassenden PCR-Fragments aus dem Exon 4 des κ -Kaseingens unter den für die caprinen Allele entwickelten Bedingungen (12°C, 275 Volt, 16 h). In 1-6 befinden sich ovine <i>CSN3</i> Exon 4 Fragmente verschiedener Individuen, während in 8 ein homologes caprines PCR-Fragment als Vergleich aufgetragen wurde.....	89
Abbildung 17: Sequenzabschnitt aus <i>CSN3</i> Exon 4 eines Schafes der britischen Rasse Welsh Mountain Sheep mit einer C/T Transition an Position 237 (markiert durch ein y = C/T) nach Referenzsequenz von COLL (1993).....	90
Abbildung 18: Ergebnis der Auftrennung der Fragmente des ovinen <i>CSN3</i> , die durch PCR-RFLP mit dem Restriktionsenzym <i>Bfu</i> I entstanden sind. Die PCR-Produkte in 1 und 4 sind heterozygot für Cytosin/ Thymin, in 2, 3, 6, 7 homozygot für Thymin und in 5 homozygot für Cytosin an Position 237	91
Abbildung 19: Bandenmuster im PCR-SSCP-Gel nach Silberfärbung zur Identifizierung des A/G SNPs im <i>IL2</i> Exon 1 an Position 318. Die 500 bp PCR-Fragmente in 1, 3, 4, 7, 9 sind homozygot für Guanin, in 2, 5, 6, 10 heterozygot für Adenin/Guanin, in 8 homozygot für Adenin	93
Abbildung 20: Ergebnis der Polyacrylamidgelelektrophorese der 294 bp PCR-Fragmente nach PCR-SSCP mit anschließender Silberfärbung: C/T SNP im Intron 3 des Interleukin-2-Gens beim Schaf.	94
Abbildung 21: Streudiagramm beobachteter F_{ST} -Werte und Heterozygotiewerte der Genorte <i>CSN3</i> und <i>IL2</i> zur Identifizierung so genannter Ausreißer-Loci beim Schaf. Die mit Querstrichen markierten Linien begrenzen das 99 %-Konfidenzintervall simulierter F_{ST} -Werte. Die Genorte sind mit einem Kreuz markiert.	100
Abbildung 22: Ausschnitt der PCR-SSCP-Analyse von 500 bp großen, die Exons 1 und 2 umfassenden PCR-Fragmenten des caprinen <i>IL2</i> von 12 der 50 untersuchten Ziegen.	101

- Abbildung 23: Auftrennung der 500 bp umfassenden PCR-Fragmente aus der 5'UTR des *IL2*-Gens (Tabelle 10), die durch den PCR-RFLP mit Hpy 188 entstanden sind. PCR-Produkte in 2-13 homozygot für Thymin, in 14 heterozygot für Cytosin/Thymin an Position 88. 103
- Abbildung 24: Auftrennung der Fragmente nach PCR-RFLP mit *Bsl I*. PCR-Produkt in 2 und 5-7 homozygot für Guanin, in 3 und 8 homozygot für Thymin, 4 heterozygot für Guanin/Thymin..... 105
- Abbildung 25: Diagramm beobachteter F_{ST} -Werte und Heterozygotiewerte der caprinen Genorte *CSN3* und *IL2* zur Identifizierung so genannter Ausreißern-Loci. Die mit Quadraten bzw. Querstrichen markierten Linien begrenzen das 99 %-Konfidenzintervall simulierter F_{ST} -Werte. Die Genorte sind mit einem Kreuz markiert..... 108

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Berechnung des Risikostatus einer Population (Quelle: FAO 2000).....	11
Tabelle 2: <i>CSN3</i> Allelfrequenzen aus den Veröffentlichungen von YAHYAOUÏ et al. (2001, 2003) und ANGIOLILLO et al. (2002) bei spanischen (SP), italienischen (IT) und französischen (FR) Ziegenrassen. Nicht typisierte Allele sind grau unterlegt, während das Fehlen einer Variante in einer Rasse mit einem – dargestellt wurde.	36
Tabelle 3: Gendatenbankeinträge für Nukleotidsequenzen des caprinen κ -Kaseingens und die Nomenklatur der Allele von 2003 und nach ihrer Änderung (Stand von 2007) PRINZENBERG et al., 2005).....	37
Tabelle 4: Gendatenbankeinträge für Nukleotidsequenzen des ovinen κ -Kaseingens	38
Tabelle 5: Charakterisierte Abschnitte des <i>IL2</i> , die in der Gendatenbank zugänglich sind.	43
Tabelle 6: Sequenzierte Standardproben mit Rassezuordnung und veröffentlichter Referenz.	47
Tabelle 7: Untersuchte Ziegenrassen: Herkunft inklusive Kontinent, Land und Region, eingesetzte Tierzahlen (n) und Abkürzung der Rassebezeichnung (Rassecode).	49
Tabelle 8: Untersuchte Schafressen: Herkunft inklusive Kontinent, Land und Region, eingesetzte Tierzahlen (n) und Abkürzung der Rassebezeichnung (Rassecode)	52
Tabelle 9: Standard-PCR-Bedingungen	59
Tabelle 10: Bezeichnung und Sequenz der zur Amplifizierung des κ -Kasein-Gens bei Schaf und Ziege verwendeten Primer und die Publikationen, denen sie entnommen worden sind.	60
Tabelle 11: Bezeichnung und Sequenz, der zur Amplifizierung der Fragmente des Interleukin-2-Gens beim Schaf und bei der Ziege eingesetzten Primer inklusive der entsprechenden Publikationen.	60
Tabelle 12: PCR-SSCP-Protokoll nach CAROLI et al. (2001) für die Typisierung eines caprinen <i>CSN3</i> Fragments, inklusive Angaben zu den Konzentrationen im Gelmix und Elektrophoresebedingungen.....	63
Tabelle 13: PCR-SSCP-Protokolle zur SNP-Detektion im Bereich der 5'-Region, Exon 1 und 2 einschließlich Intron 1 des Interleukin-2 Gens bei Ziegen.....	64
Tabelle 14: PCR-SSCP-Protokolle zur Typisierung der von LÜHKEN et al. (2000) typisierten SNPs im Exon 1 und im Intron 3. Veränderungen gegenüber dem ursprünglichen Protokoll sind mit * gekennzeichnet.	64

Tabelle 15: Labellung der BigDye Terminatoren und Farbzuoordnung der Daten.	65
Tabelle 16: Zusammenstellung der Primer, die zur Sequenzanalyse des ovinen und caprinen κ -Kaseingens und des Interleukin-2-Gens eingesetzt wurden.	67
Tabelle 17: Zusammensetzung der Sequenzieransatzes.....	67
Tabelle 18: Programmierung des Cyclers (iCycler oder PE) für die Sequenzreaktion.....	67
Tabelle 19: Enzyme zur Typisierung von SNPs in ovinen und caprinen κ -Kaseingenfragmenten.....	69
Tabelle 20: Enzyme zur Typisierung eines SNPs in der caprinen <i>IL2</i> 5'-Region und im Intron 2.....	70
Tabelle 21: Bezeichnungen und Zusammensetzungen, der zu den PCR-RFLP-Analysen eingesetzten Puffern.....	70
Tabelle 22: PCR-SSCP-Protokoll zur Typisierung der <i>CSN3</i> Varianten bei der Ziege, inklusive Angaben zu den Konzentrationen im Gelmix und den Elektrophoresebedingungen.....	73
Tabelle 23: Variable Nukleotidpositionen im Exon 4 des κ -Kaseingens im Vergleich mit der Referenzsequenz mit der Gendatenbankeingangsnummer X60763. Allele, die zu Beginn dieser Arbeit noch nicht charakterisiert waren, sind grau hervorgehoben. Kursiv gedruckte Nukleotidaustausche führen nicht zu einer Änderung der Aminosäuresequenzen.	76
Tabelle 24: Allelfrequenzen der <i>CSN3</i> Varianten bei der Ziege nach Herkunftsland und Rassezugehörigkeit; n entspricht der Anzahl der pro Rasse untersuchten Individuen.	82
Tabelle 25: Anzahl der bei den Ziegenrassen gefundenen Allele (N_{O_A}) des Exon 4 des κ -Kaseingens, F_{IS} -Werte nach Weir & Cockerham, effektive Allelzahl (N_E), allelic richness (AR) und genetische Diversität H_E nach NEI für die einzelnen Rassen im Exon 4 des κ -Kaseingenlocus (<i>CSN3</i>).	85
Tabelle 26: Allelfrequenzen und (W&C) F_{IS} -Werte der Schafrassen für SNP in <i>IL2</i> Exon 1 (Allel A und G), Intron 3 (Allel C und T) und für SNP in <i>CSN3</i> Exon 4 (Allel C und T)	95
Tabelle 27: Durchschnittliche erwartete Heterozygotiewerte (H_E) unter Annahme des HWG zur Beurteilung der Gendiversität nach NEI für die einzelnen Rassen je Genort und über alle drei Genorte.....	98
Tabelle 28: Durchschnittliche beobachtete Heterozygotie und durchschnittliche erwartete Heterozygotie innerhalb der Subpopulationen (H_O und H_E), totale erwartete Heterozygotie (HAT) über alle Populationen für die untersuchten SNPs an drei Genorten.	99

Tabelle 29: F_{ST} -Werte nach WRIGHT an den verschiedenen Genorten über alle Schafrassen und deren Signifikanz je Locus über alle Rassen und über alle Loci.	99
Tabelle 30: Allelfrequenzen, (W&C) F_{IS} -Werte und erwartete Heterozygotiewerte (H_E) unter Annahme des HWG zur Beurteilung der Gendiversität nach NEI des SNP in der 5'UTR des <i>IL2</i> für die einzelnen Ziegenrassen.....	103
Tabelle 31: Allelfrequenzen, (W&C) F_{IS} -Werte und erwartete Heterozygotiewerte (H_E) unter Annahme des HWG zur Beurteilung der Gendiversität nach NEI des SNP im Intron 2 des <i>IL2</i> für die einzelnen Ziegenrassen.	106
Tabelle 32: Durchschnittliche beobachtete und erwartete Heterozygotie (H_O und H_E), totale erwartete Heterozygotie (H_T) und Anteil der Diversität zwischen den Rassen an der gesamten Diversität (G_{ST}) über alle Ziegenrassen für die untersuchten Allele an den drei Genorten <i>CSN3</i> Exon 4 bzw. <i>IL2</i> 5' UTR und Intron 2.	107
Tabelle 33: F_{ST} -Werte nach WRIGHT an den verschiedenen Genorten über alle Ziegenrassen und deren Signifikanz über alle Rassen und über alle Loci.....	108

Verzeichnis der Abkürzungen

A	Adenin
Ala	Alanin
APS	Ammoniumpersulfat
AFLP	amplified fragment length polymorphism
AR	Allelic richness
bp	Basenpaare
BESS	base excision sequence scanning
C	Cytosin
CBD	convention on biological diversity
cDNA/cds	complementary DNA
CMP	Caseinomakropeptid
<i>CSN1S1</i>	α S1-Kasein Genort
<i>CSN1S2</i>	α S2-Kasein Genort
<i>CSN2</i>	β -Kasein Genort
<i>CSN3</i>	κ -Kasein Genort
cSNP	SNP innerhalb einer kodierenden Region
ddUTP	Didesoxyuracil-5'-triphosphat
DGGE	Denaturierungsgradienten-Gelelektrophorese
DNA	desoxyribonuclein acid (Desoxyribonukleinsäure)
<i>DGAT</i>	Acyl-CoenzymA: Diacylglycerol-Acyltransferase Genort
Dn	Nicht-synonyme Basenaustausche
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
Ds	Synonyme Basenaustausche
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMC	enzyme mismatch cleavage
FAO	Food and Agriculture Organisation of the United Nations
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
F _{IS} -Wert (W&C)	Fixierungsindex innerhalb Subpopulation nach Weir & Cockerham (1984)
IEF	Isoelektrische Fokussierung
Ile	Isoleucin

G	Guanin
Ka	Anteil der nicht-synonymen Baseaustausche pro nicht-synonymer Basenposition
kb	Kilobasen
Ks	Anteil der synonymen Baseaustausche pro synonymer Basenposition
Leu	Leucin
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
Met	Methionin
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mtDNA	Mitochondriale DNA
n	Stichprobenumfang
N _E	Effektive Anzahl an Allelen
N _e	Effektive Populationsgröße
NCBI	National Center of Biotechnology Information
ncSNP	SNP innerhalb einer nicht-kodierenden Region
nm	Nanometer
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	Polymerasekettenreaktion
Phe	Phenylalanin
QTL	quantitative trait loci
RAPD	rapid amplified polymorphic DNA
PCR-RFLP	PCR-restriction fragment length polymorphism
PCR-SSCP	PCR-single strand conformation polymorphism
SNP	single nucleotide polymorphism
ssDNA	single strand DNA
T	Thymin
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris/Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TGGE	Temperaturgradienten-Gelelektrophorese

TRIS	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan
U	Unit
V	Volt
μl	Mikroliter

1 Einleitung und Fragestellung

Ziegen und Schafe gehören zu den ersten Nutztierarten, die etwa 8500 vor Christus domestiziert wurden (BÖKÖNYI, 1976; PETERS et al., 2005; PRINGLE, 1998). Sie spielen seither durch ihre vielfältigen Produkte wie Milch, Fleisch und Wolle bzw. Haare, ihre relative Anpruchslosigkeit an ihre Umwelt und ihre Umgänglichkeit eine wichtige Rolle in der Landwirtschaft. Die Anpassung an wechselnde Umweltbedingungen und der züchterische Einfluss des Menschen führten zur Ausbildung zahlreicher unterschiedlicher Rassen innerhalb der beiden Tierarten.

Die Biodiversität innerhalb und zwischen den Rassen ist also zum einen das Ergebnis der jahrtausendelangen Selektion durch die Natur und den Menschen (FAO, 2007), und zum anderen sind in ihr noch Teile der genetischen Variabilität ihrer Vorfahren enthalten (CYMBRON et al., 2005)

In der genetischen Variabilität unserer Nutztierassen liegt wahrscheinlich das Potential für eine zukünftige Anpassungsfähigkeit in einer sich stetig wandelnden Umwelt (BRUFORD, 2004). Das Aussterben von Rassen ist daher eine ernstzunehmende Bedrohung für die tiergenetischen Ressourcen. So werden derzeit 20 % von den global gemeldeten 7616 Nutztierassen als bedroht eingestuft, und in den letzten sechs Jahren ist bereits eine Rasse pro Monat verloren gegangen (FAO, 2007). Die Gründe für das Aussterben von Nutztierpopulationen sind vielfältig. Ein besonders wichtiger Aspekt ist die Konzentration der weltweiten Tierproduktion auf wenige leistungsintensive Spezialrassen und der gleichzeitige Rückgang der kleinbäuerlichen Landwirtschaft in marginalen, ländlichen Gebieten. Denn gerade hier finden sich viele der seltenen, lokal stark adaptierten Ziegen- und Schafrassen, die aufgrund ihrer geringeren Produktivität von den Hochleistungsrassen verdrängt werden.

Die Untersuchung genetischer Diversität mit Hilfe molekulargenetischer Marker leistet einen wichtigen Beitrag zu einem sinnvollen Konservierungsmanagement. Verschiedene Markersysteme z. B. Mikrosatelliten und mtDNA-Marker haben sich hierbei bereits besonders bewährt (BRUFORD, 2004). In letzter Zeit werden aber auch vermehrt Untersuchungen von SNPs an Kandidatengenorten durchgeführt (CAPPUCIO et al., 2006; PARISET et al., 2006). Ein solcher Genort zeichnet sich durch die Bedeutung seines Genproduktes für das Tier oder das vom Tier gewonnene Produkt aus. Im Falle des Genortes *CSN3* handelt es sich um das κ -Kasein, dem eine Schlüsselrolle bei der Koagulation der Milch zukommt. Diese wiederum spielt die entscheidende Rolle bei der Eignung der Milch zur Käseherstellung bzw.

für die Verdaulichkeit der Milch für den Neonaten (LODES et al., 1996; MERCIER et al., 1976).

IL2 kodiert für das Zytokin Interleukin-2, das sowohl im Rahmen der humoralen als auch der zellulären Immunantwort von großer Bedeutung ist. In humanmedizinischen Studien gelang die Charakterisierung von so genannten „high“ und „low producer“ Genotypen mit signifikanten phänotypischen Effekten auf die Immunantwort nach Transplantationen (MORGUN et al., 2003).

Ziel dieser Arbeit ist es, genetische Diversität an den beiden Kandidatengenorten *CSN3* und *IL2* zu ermitteln, die europäischen, asiatischen und afrikanischen Schaf- und Ziegenrassen mit geeigneten Methoden zu analysieren und die Ergebnisse zu interpretieren. Für das bereits als polymorph beschriebene caprine *CSN3* soll ein System zur simultanen Genotypisierung einer großen Anzahl der bereits charakterisierten Allele und zur Detektion bisher nicht beschriebener Varianten entwickelt werden. Das ovine *CSN3* sowie das caprine und ovine *IL2* sollen mit geeigneten Detektionsverfahren auf SNPs untersucht werden.

2 Literaturübersicht

2.1 Landwirtschaftliche Nutzierrassen als genetische Ressourcen

2.1.1 Entstehung der genetischen Diversität bei landwirtschaftlichen Nutztieren

Die genetische Vielfalt der landwirtschaftlichen Nutztiere entsteht dadurch, dass jedes Individuum ca. 30 000 Gene besitzt, von denen wiederum jedes in einer Vielzahl von Allelen vorkommen kann (ADAMS und PARHAM, 2001). Man schätzt, dass 30-50 % der gesamten genetischen Diversität einer Spezies auf die Diversität zwischen den einzelnen Rassen zurückzuführen ist (HAMMOND und LEITCH, 1996; OLDENBROEK, 1999). Die heutige Rassenvielfalt hat ihren Ursprung in den wildlebenden Stammformen der domestizierten Nutztiere (TABERLET et al., 2007). In geografisch getrennten Gebieten entwickelten sich unter verschiedenen Umwelt- und Kulturbedingungen durch genetische Zufallsprozesse, natürliche Auslese und vom Menschen noch wenig gesteuerter Zuchtauswahl verschiedene Landschläge. Vor etwa zweihundert Jahren wurde damit begonnen, in einigen Rassen durch Selektion gezielt Leistungsmerkmale zu verbessern. Wesentliche Faktoren, die zur Variabilität des Genoms beitragen, sind Mutationen, genetische Drift, Migration und Selektion (GRAVERT, 1996). Mutationen treten über das gesamte Genom verteilt auf und stellen die Basis jeder genetischen Variabilität dar. Ihre Auswirkungen entscheiden über den weiteren Verlauf, die Entwicklung und die Etablierung einer Mutation. Die genetische Zufallsdrift führt zu Allelfrequenzänderungen in einer Population, in der auf Grund ihrer Populationsgröße keine Zufallspaarungen stattfinden. Durch Drift kommt es in der Regel zum Verlust von Allelen und damit zu einer Verringerung der genetischen Varianz innerhalb einer Population. Zwischen getrennten Populationen verursacht genetische Drift dagegen eine Diversifizierung in Form von wachsenden Unterschieden in den Allelfrequenzen. Die Migration kann im Rahmen gezielter Kreuzungszucht, der künstlichen Migration, eingesetzt werden und führt zwischen genetisch distanten Nutzierrassen zu einem Zugewinn an Variabilität und zu erhöhten Zuchtfortschritten (PIRCHNER, 1979). Fortgesetzte Isolation und Selektion sind Ursache dafür, dass die Unterschiede in den Allelfrequenzen, also in der relativen Häufigkeit der Allele zwischen den Rassen, aufrechterhalten und erweitert werden. Die natürliche Selektion führt zur Anpassung einer Rasse an ihren Lebensraum; günstige Allele können dadurch in einer Population fixiert vorliegen (GRAVERT, 1996).

Genetische Diversität ist demnach ein Ergebnis der Evolution und daher Konsequenz der Wirkung der angesprochenen Evolutionsfaktoren (KÖHLER et al., 1998).

2.1.2 Bedeutung tiergenetischer Ressourcen (Animal genetic resources / AnGR)

Der Begriff tiergenetische Ressourcen schließt alle Tierarten, Rassen und Stämme (inklusive ihrer wilden Verwandten) ein, die von aktuellem oder zukünftigem ökonomischem, wissenschaftlichem und kulturellem Interesse für den Menschen in Bezug auf Ernährung und landwirtschaftliche Produktion sind (REGE und GIBSON, 2002).

Von den 30 domestizierten Säugetier- und Vogelarten produzieren derzeit 14 Arten 90 % der tierischen Nahrungsmittel (FAO, 2000). Der dritten Ausgabe der World Watch List von 2000 zufolge sind von den registrierten 6300 Haustierrassen 1350 vom Aussterben bedroht oder bereits ausgestorben. In Europa ist beinahe die Hälfte von 2576 verzeichneten Rassen, als vom Aussterben gefährdet einzustufen. Die Prozentzahl der bedrohten Säugetierrassen ist zwischen 1995 und 1999 von 33 auf 49 % angestiegen. Neuere Daten der FAO von 2007 besagen, dass in den letzten sechs Jahren jeden Monat etwa eine landwirtschaftliche Nutztier rasse verloren gegangen ist.

Die Konvention zur biologischen Diversität (Convention on Biological Diversity CBD, URL 1) definiert genetische Ressourcen allgemein als genetisches Material von aktuellem oder potentiell Wert. Die CBD fordert eine „nachhaltige Handhabung der Komponenten der biologischen Diversität“ und erläutert dies als „Verwendung der biologischen Diversität auf eine Art und zu einem Grad, der nicht zu ihrem langzeitigen Rückgang führt, um dadurch ihr Potential gegenwärtigen und zukünftigen Erfordernissen und Bedürfnissen zu begegnen, erhalten zu können“. Bezogen auf die nutztiergenetischen Ressourcen bedeutet diese geforderte nachhaltige Handhabung, die Verpflichtung der Mitgliedsländer der CBD zum Erhalt von einheimischen Rassen mit oftmals niedrigem Leistungsniveau, auch wenn diese unter augenblicklichen marktwirtschaftlichen Bedingungen gegenüber modernen Hochleistungsrassen an Bedeutung verlieren. Ein großer Genpool ist HAMMOND und LEITCH (1996) zufolge unbedingt notwendig für die Möglichkeit der Züchtung von Rassen, die sich an veränderte Umweltbedingungen anpassen oder mit bisher unbekanntem Krankheiten fertig werden können. Damit Nutztierassen potentiell zur Anpassung an die gegenwärtig ungewissen Anforderungen der Zukunft fähig sind, ist genetische Variation in für die Flexibilität, Belastbarkeit und Multifunktionalität relevanten Merkmalen, Voraussetzung. Diese Art von genetischer Diversität könnte in den bedrohten autochthonen Rassen aufgrund ihrer Entwicklungsgeschichte vorhanden und potenziell von Nutzen sein. Für die Autoren ist die Erhaltung der ge-

netischen Diversität bei Nutztieren eine Versicherung gegen Bedrohung der Zukunft wie Hunger, Dürren und Epidemien (HAMMOND und LEITCH, 1996).

Die Gründe für genetische Erosion sind vielfältig und schließen schwer beeinflussbare Faktoren wie Seuchen, Urbanisierung oder die globale Erwärmung ein. Einer der Hauptfaktoren liegt in der Intensivierung der Landwirtschaft und der globalen Vermarktung von Hochleistungsrassen, die wiederum dem starken Bevölkerungswachstum und deren Anforderungen an die Lebensmittelproduktion Rechnung tragen sollen (FAO, 2007; REGE und GIBSON, 2002). Kommerzielle, also auf momentane Maximalleistung ausgerichtete Produktionssysteme führen zu Uniformität und damit eventuell zum Verlust von Diversität (ROOSEN et al., 2004). Die Konzentration auf wenige, spezialisierte, leistungsintensive Rassen, so genannte „high-output breeds“, hat laut der FAO in den letzten 30 Jahren dazu geführt, dass viele der Extensivrassen verdrängt worden sind. Die Vorteile der lokalen Anpassung und die daraus resultierenden niedrigeren Ansprüchen an Umweltbedingungen dieser Rassen („low-input breeds“) wurden und werden vielerorts nicht erkannt oder nicht hoch genug eingeschätzt (BERTAGLIA, 2005). Gleichzeitig kommt es zur Unterschätzung der hohen Ansprüche, die leistungsintensive Rassen an Fütterung und Umwelt stellen, da man sie allein anhand von Leistungsdaten auswählt, die sie unter optimalen Bedingungen erzielt haben. Es muss für die nahe Zukunft davon ausgegangen werden, dass die Produktionsintensität der Landwirtschaft weltweit gesehen auf einem niedrigen bis mittleren Niveau bleiben wird und dass die hohen Anforderungen der hoch spezialisierten Rassen nicht überall zu verwirklichen sein werden (FAO, 1998). Einheimische Rassen, die eine hohe lokale Adaptation aufweisen und dadurch auch unter schwierigeren Produktionsbedingungen leistungsfähig sind, leisten einen wichtigen Beitrag zur Welternährung. Hierin zeigt sich, dass der Wert der AnGR nicht nur in ihrem Potenzial für die Zukunft liegt, sondern bereits einen entscheidenden Stellenwert in der aktuellen Landwirtschaft hat.

2.1.3 Möglichkeiten der Erhaltung von AnGR

Der erste Schritt zur Erhaltung von Rassen ist ihre Identifizierung und Charakterisierung. Um ihre Qualitäten und Eigenschaften einschätzen und ihren momentanen Risikostatus bewerten zu können, müssen statistische Daten der Rassen erhoben werden. Dann können unter Einbeziehung der Tierhalter Maßnahmen eingeleitet und bestenfalls ein gezieltes Zuchtprogramm entwickelt werden (FAO, 1998).

Die Konservierung nutztiergenetischer Ressourcen kann durch In-situ-Erhaltung von Rassen oder durch Maßnahmen der Ex-situ-Erhaltung oder Ex-situ-lebend-Erhaltung erfolgen.

2.1.3.1 In-situ-Erhaltung

Das Hauptkriterium für In-situ-Erhaltung oder „On-farm-Konservierung“ ist der Verbleib der Rasse in ihrem natürlichen Lebensraum und ihrem Produktionssystem (GANDINI und OLDENBROEK, 1999; IBV, 2003). Nachteil dieser Methode sind die hohen Kosten, die z. B. durch die Subventionierung der Tierhalter entstehen. Außerdem müssen die Tierzahlen genügend hoch sein, um eine aus tierzüchterischer Sicht ausreichende effektive Populationsgröße (N_e) zu gewährleisten, was die Kosten zusätzlich hebt (WOLLIAM, 2004). Allerdings kann es nur durch diese Vorgehensweise gelingen, einen relativ großen Genpool zu erhalten, durch züchterische Einflussnahme Inzuchtdepressionen zu vermeiden und eine Weiterentwicklung der Rasse zu ermöglichen. Aus der Kostenproblematik ergibt sich, dass ‚On-farm-Konservierung‘ v. a. dann praktikabel ist, wenn eine Rasse besondere Vorzüge hat, die sie auch gegenüber den modernen Hochleistungsrassen interessant macht. In vielen Gebieten haben Rassen eine große kulturhistorische Bedeutung erfahren. Sie zeugen von der lange Zeit bestehenden symbiotischen Beziehung zwischen Mensch und Nutztier und haben eine starke Zugehörigkeit zu spezifischen Landschaften erlangt (OLDENBROEK, 1999). Oft haben sie sich dabei einen für andere Rassen unwirtlichen Lebensraum erschlossen, wie zum Beispiel die Moorschnucken, die durch die besondere Hornqualität ihrer Klauen in den feuchten Moorlandschaften existieren können (URL 2).

Zusätzliche Chancen für das Überleben einer solchen Rasse entstehen dann, wenn sich Marktnischen für rassetypische Produkte ergeben, die andere Rassen nicht in gleichem Maße erfüllen können. Die Entwicklung von spezifischen Absatzmärkten kann zum Überleben oder sogar zur Selbsterhaltung einer Rasse beitragen (BERTAGLIA, 2005; GANDINI und OLDENBROEK, 1999). Beispielhaft für die Wirkung eines solchen Vermarktungskonzeptes ist die Entwicklung des Rhönschafes in Hessen, Bayern und Thüringen. Mit dem „Rhönschafprojekt“ (1984) des Bundes für Umwelt und Naturschutz (BUND), des BN Bayern und der damit zusammenhängenden Bildung der Rhöner Landspezialitäten GmbH, gelang es, das Rhönschaf als regionalen Werbeträger zu etablieren. Die Schaffung des Bewusstseins für die Qualität regionaler Produkte und die Bedeutung der Schafe zur Landschaftspflege, insbesondere in Biosphärenreservaten wie der Rhön, ermöglichten in diesem Fall die Erhaltung tiergenetischer Ressourcen mit wirtschaftlichen Erfolgen für die Tierhalter und ihre Region (URL 13). Die FAO betont in ihren „Leitlinien“ die Priorität, die der In-situ-Konservierung zukommen soll (FAO, 1998).

2.1.3.2 Ex-situ-lebend-Erhaltung

Eine Ex-situ-lebend-Konservierung kann dann in Frage kommen, wenn eine Rasse nicht ökonomisch zu vermarkten ist, sie aber auf Grund ihres kulturellen, historischen oder ökologischen Werts trotzdem erhalten werden soll. Solche Rassen können in Zoos, auf Schaubauernhöfen oder in Naturparks gehalten werden. Die Kosten sind geringer als bei der In-situ-Konservierung, allerdings ist hierbei mit einer Weiterentwicklung der Rasse nicht zu rechnen, da sie aus ihrer natürlichen Umgebung entfernt wurden und damit der natürliche Selektionsdruck sinkt. Außerdem verkleinert sich auch der traditionelle Selektionsdruck und verhindert so die Erhaltung genetischer Ressourcen, die von Interesse sein könnten (TABERLET et al., 2007). Die effektive Populationsgröße N_e sinkt und bedingt damit, dass die Auswirkungen zufälliger genetischer Drift zu einer Reduktion der genetischen Diversität führen. Inzuchtdepressionen werden dann immer wahrscheinlicher (GANDINI und OLDENBROEK, 1999; GANDINI et al., 2004). Nur mit verstärktem Zuchtmanagement und dem Einsatz künstlicher Befruchtung kann den Autoren zu Folge diesen Prozessen teilweise entgegengesteuert werden. Angewendet wird die Ex-situ-lebend-Konservierung derzeit eher z. B. bei bedrohten Arten und Unterarten. So wurden für Herden der Büffelspezies *Anoa* in verschiedenen deutschen Zoos z. B. in Leipzig Erhaltungszuchtprogramme entwickelt (SEIFERT und NÖTZOLD, 1988). Durch die extreme Bedrohung ihres natürlichen Lebensraumes, des indonesischen Regenwaldes, erscheint die Ex-situ-lebend-Erhaltung hier sinnvoll. Fruchtbarkeitsprobleme in der Gefangenschaft und Inzuchtdepressionen durch anfängliche Verpaarung nahverwandter Individuen werden beschrieben (SCHREIBER et al., 1999). Außerdem wird der wünschenswerte Teraustausch zwischen den einzelnen zoologischen Einrichtungen dadurch erschwert, dass die Tiere aus geographisch nicht klar definierten Gebieten stammen und teilweise erhebliche Unterschiede, beginnend mit der Taxonomie bis hin zu unterschiedlichen Chromosomensätzen, bestehen.

2.1.3.3 Ex-situ-Erhaltung

Bei den meisten Nutztierarten ist eine Kryokonservierung von Sperma, Eizellen und Embryonen möglich. Zusätzlich kann DNA aus somatischen Zellen gelagert werden. Eine derartige Konservierung kann unter derzeitigen technischen Bedingungen nicht den vielschichtigen Wert der tiergenetischen Diversität erhalten, aber die Lebendkonservierung, in erster Linie durch Tiefgefriersperma, unterstützen (HALL und BRADLEY, 1995). Die Autoren weisen außerdem auf die Schwierigkeiten bei transgenen Vorgehensweisen hin und unterstützen die unbedingte Forderung der FAO die Priorität bei Erhaltungsmaßnahmen nicht auf die

Kryokonservierung von DNA-Material zu legen. Sie sind der Meinung, dass die heutigen Bedingungen der Lagerung und Sammlung eventuell nicht den zukünftig erforderlichen Standards entsprechen könnten.

Kryoreserven werden in Deutschland derzeit für alle Rassen mit dem Gefährdungsgrad „Erhaltungspopulation“ und „Beobachtungspopulation“ angelegt (URL 5). Das BMELV gibt in einer Broschüre Auskunft über bereits angelegte Kryoreserven von gefährdeten Nutztierassen in Deutschland (BMELV, 2008). So werden z. B. für die Rinderrasse Murnau-Werdenfelser 7.744 Spermaportionen von 24 Bullen und 27 Embryonen durch die Bayrische Genreserve gelagert (HENSELDER, 2004). Bei den Schaf- und Ziegenrassen sind in erster Linie Spermaportionen am FLI (Friedrich-Löffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Institut für Nutztiergenetik Mariensee) verwahrt (BMELV, 2008).

Um mit Tiefgefriersperma und weiblichen Rückkreuzungstieren 90 % der Gene einer bedrohten Rasse neu zu etablieren, werden etwa vier Generationen benötigt (GANDINI und OLDENBROEK, 1999). Sperma ist somit das genetische Material der Wahl, um synthetische Rassen zu entwickeln, das genetische Management der In-situ- und Ex-situ-lebend-Konservierung zu verbessern und gezielt Introgression von Genen vorzunehmen.

2.1.3.4 Überstaatliche, staatliche und gesellschaftliche Aktivitäten zum Erhalt von Haustierrassen

Eine besondere Stellung unter den Maßnahmen zu Erhaltung von Haustierrassen nimmt das Monitoring ein. Organisationen wie die FAO (Food and Agricultural Organization) und die EAAP (European Association for Animal Production) führen Datenbanken, die nun zu einem gemeinsamen, über Internet zugänglichen „Domestic Animals Diversity Information System (DAD-IS)“ zusammengefügt worden sind. Diese Datenbank ermöglicht es der FAO und der EAAP, Veränderungen von Populationen weltweit bzw. europaweit zu beobachten, um im Bedarfsfall gezielt auf drohende Verluste von AnGR hinweisen und einschreiten zu können. Innerhalb vom DAD-IS werden die Rassen nach ihrem Gefährdungsgrad Risikokategorien zugeordnet.

Die SAVE (Safeguard for Agricultural Varieties in Europe) Foundation ist die europäische Dachorganisation für In-situ-Erhaltung. In Zusammenarbeit mit dem ‚Monitoring Institute for rare breeds and seeds‘ (St.Gallen) wurde z. B. 2001 die Situation aller italienischen Nutztierassen aufgenommen und der Handlungsbedarf zu ihrer Erhaltung abgeschätzt. Das Monitoring ergab unter anderem einen extremen Rückgang bei der Ziegenrasse Girgentana.

Der Bestand hatte sich von 5000 Tieren (1992) auf unter 100 (2001) verkleinert. Unter Einsatz der lokalen Landwirtschaftsbehörde und eines Projektkoordinators soll nun versucht werden, ein den Bestand sicherndes Zuchtprogramm zu entwickeln (URL 3).

Die Entwicklung von Zuchtprogrammen und Zuchtverbänden für autochthone Rassen stellt ein nützliches Instrument zur Sicherung ihres Bestehens dar. Leistungsdaten und Daten über Merkmale wie Langlebigkeit, Fruchtbarkeit und Fütterungsansprüche sind bei vielen Rassen nicht bekannt (FAO, 2007). Vergleiche zwischen angepassten und exotischen Rassen unter den lokalen Bedingungen in marginalen Gebieten können bei der Entscheidung zum Erhalt einer Rasse hilfreich sein. Um solche Untersuchungen durchführen zu können, müssen häufig zunächst Daten für autochthone Rassen eruiert werden. So erfasst z. B. eine mexikanische Studie Leistungsdaten und weitere Informationen für die Rasse Criollo pig, um darauf aufbauend ein Konservierungsprogramm entwickeln zu können (SIERRA VÁSQUEZ et al., 2003).

Innerhalb der EU wird die Erhaltung gefährdeter Rassen durch die Verordnung 2078/92 EWG nachhaltig unterstützt, die im Rahmen der „umweltgerechten und den natürlichen Lebensraum schützenden landwirtschaftlichen Produktionsverfahren“ finanzielle Beihilfen für die Haltung von Tieren vom Aussterben bedrohter Rassen gewährt. Die Gewährung ist in Deutschland an Bedingungen wie beispielsweise an Mitleistungen der Länder geknüpft und auf Schafe, Ziegen, Pferde und Rinder beschränkt.

Nach der Unterzeichnung der CBD durch die Bundesregierung und ihrer Überführung in nationales Recht der Bundesrepublik trat diese im Dezember 1993 in Kraft. Die 170 Vertragsstaaten verpflichteten sich damit, nationale Strategien und Programme zur Erhaltung der AnGR zu entwickeln. Auf Bundesebene übernimmt das Informationszentrum biologische Vielfalt (IbV) der Zentrale für Agrardokumentation und –information (ZADI) Aufgaben der Koordination, der Dokumentation und Information und führt u. a. eine Internetseite mit dem Titel: „Informationssystem genetischen Ressourcen GENRES“ (URL 4). Weiterhin leistet das Institut für Tierzucht der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL) durch den Forschungsschwerpunkt „Tiergenetische Ressourcen“ wissenschaftliche Entscheidungshilfen für das Bundesministerium für Ernährung, Land- und Forstwirtschaft (BMELV). Die deutsche Gesellschaft für Züchtungskunde (DGFZ) beschloss bereits 1989 die Bildung eines Arbeitsausschusses zur Erhaltung bedrohter Tierrassen, der dann Empfehlungen zur Erhaltung genetischer Vielfalt bei Haustierrassen herausgab (DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR ZÜCHTUNGSKUNDE E.V., 1999). Die GEH (Gesellschaft zur Erhaltung seltener Haustier-

rasen) als nichtstaatliche Organisation war Mitglied dieses Arbeitsausschusses und setzt sich weiterhin für die Belange bedrohter Rassen ein. Ziel der GEH-Aktivitäten ist es, für die gefährdeten Rassen eine langfristige Bestandssicherung durch Einbindung in ökonomisch und ökologisch beständige Nutzungskonzepte aufzubauen und auf positive Eigenschaften der jeweiligen Rasse hinzuweisen (IBV, 2003).

2.2 Gefährdete Schaf- und Ziegenrassen

2.2.1 Situation bedrohter Rassen

Schafe und Ziegen gehörten zu den ersten Tierarten, die der Mensch vor ungefähr 10 500 Jahren domestiziert hat (BÖKÖNYI, 1976; PRINGLE, 1998; ZEDER et al., 2005). Ihre physiologische Fähigkeit zur mikrobiellen Fermentation von für den Menschen unverdaulichen Rohfasern, die in Graslandschaften in großen Mengen zur Verfügung standen, konnte der Mensch für seine Ernährung in Form von Fleisch und Milch nutzen. Mittlerweile gilt als gesichert, dass von mehr als einem Domestikationsereignis für beide Spezies ausgegangen werden muss (BRUFORD et al., 2003; FERNANDEZ et al., 2006; LUIKART et al., 2001). Bisher galten der so genannte „Fruchtbare Halbmond“ („Fertile Crescent“) und seine östlichen Randgebiete als das Domestikationszentrum von Ziegen und Schafen (SALAMINI et al., 2002). Gemeint ist damit die Region, die sich vom heutigen Israel, Libanon und Westsyrien bis in den Südosten der Türkei und entlang an Tigris und Euphrat bis in den Irak und den westlichen Iran erstreckt (BRUFORD et al., 2003). Mit der Ausbreitung der Landwirtschaft vom Mittleren Osten über Südosteuropa weiter nach Nordwesteuropa (RYDER, 1983) entstand eine Vielzahl von an ihren Lebensraum adaptierten und vom Menschen züchterisch beeinflussten Rassen (FAO, 2000). Ein weiteres wahrscheinliches Domestikationszentrum der Hausziegen könnte z.B. in Südostasien liegen (LUIKART et al., 2001)

Von den bei der FAO 1999 registrierten 390 Ziegenrassen kommen 210 in Europa vor. Die Risikoklasse ist bei 201 dieser Rassen erfasst worden. Die Berechnung des Risikostatus anhand der Anzahl von Zuchttieren kann der Tabelle 1 entnommen werden.

Der Risikostatus von 11 % dieser Rassen wird von der FAO als kritisch eingestuft. Weitere 27 % der Rassen sind gefährdet. Ein anderes Kriterium der FAO für die Risikoklasse einer Rasse ist, wie hoch der Prozentsatz der Mütter ist, die mit demselben Vater angepaart werden. Beläuft sich der Wert hier über 80 %, ist die Rasse auch dann als gefährdet anzusehen, wenn die Anzahl der Zuchttiere an sich höher ist. Im Jahre 1999 waren bereits 14 dieser 201 Rassen

ausgestorben. Fast die Hälfte (48 %) aller Schafrassen sind in Europa beheimatet, wobei die europäische Schafpopulation nur 18 % der Weltschafpopulation ausmacht. Von den 771 von der FAO erfassten Rassen sind 18 % bereits ausgestorben, weitere 6 % in einem für die Erhaltung der Rasse kritischen und etwa 20 % in einem gefährdeten Zustand. Der Risikostatus ist derzeit bei 15 % der Schafrassen unbekannt.

Tabelle 1: Berechnung des Risikostatus einer Population (Quelle: FAO 2000)

Status	Anzahl der Zuchttiere (anz_m/ anz_w)	Ne
kritisch	- < 100 weibliche oder < 6 männliche Zuchttiere	Ne < 23
	- anz_w + anz_m > 100 und anz_w < 80 % und sinkende Bestandszahlen	
gefährdet	- < 1000 weibliche und < 20 männliche Zuchttiere	Ne < 79
	- anz_w + anz_m < 100 und anz_w > 80 % und steigende Bestandszahlen	
nicht gefährdet	- > 1000 weibliche und > 20 männliche Zuchttiere	Ne > 79

Effektive Populationsgröße Ne:

$$Ne = 4 * anz_m * anz_w / (anz_m + anz_w)$$

anz_m : Anzahl männlicher Zuchttiere

anz_w : Anzahl weiblicher Zuchttiere

Die aktuelle Situation der Schaf- und Ziegenrassen in Deutschland 2008 wird in der sogenannten „roten Liste“ dargestellt (URL 5). Die vier Ziegenrassen und die 21 Schafrassen werden hierbei in vier Gefährdungskategorien eingeteilt. Als nicht gefährdet (NG) gelten Rassen mit einer Ne > 1000. Hierzu zählen momentan die Bunten Deutschen Edelziegen, die Merinolandschafe und die Schwarzköpfigen Fleischschafe. Bei einer Ne >200 und <1000 hat die betreffende Rasse den Status Beobachtungspopulation (BEO), während eine Ne >50 aber <200 als Erhaltungspopulation (ERH) bezeichnet wird. Die Thüringer Waldziegen, die Weißen Deutschen Edelziegen und 12 der 21 Schafrassen haben derzeit den Status BEO. Zu den Erhaltungspopulationen zählen derzeit die Braunen Harzer Ziegen, die Weißen gehörnten Heidschnucken, die Weißen Bergschafe, die Leineschafe, Merinolangwollschafe und die Brillenschafe. Den höchsten Gefährdungsgrad (Phänotypische Erhaltungspopulation PERH) haben zwei der 21 Schafrassen namentlich das Alpine Steinschaf und Krainer Steinschaf. Hier

ist die Ne <50 und damit laut „roter Liste“ die Rasse nach tierzuchtwissenschaftlicher Sicht nur noch rudimentär erhalten. Die Konservierungsmaßnahmen dienen nur noch der Erhaltung des rassetypischen Erscheinungsbildes.

Bei allen Rassen ungeachtet des Risikostatus wird ein Monitoring der Weiterentwicklung durchgeführt. Bei den Populationen mit dem Status BEO und ERH wird außerdem eine Kryoreserve angelegt. Ergänzend werden für die Erhaltungspopulationen speziell auf die genetische Konservierung orientierte Zuchtprogramme entwickelt (URL 5).

2.2.2 Gründe für die Erhaltung von Schaf- und Ziegenrassen

Schafe und Ziegen sind Nutztierarten, die typischerweise in extensiven landwirtschaftlichen Produktionssystemen eine wichtige Rolle spielen. So tragen DOPPELBAUER (2002) zufolge über 90 % der Weltziegenpopulation in den Entwicklungsländern einen wichtigen Anteil an der menschlichen Ernährung. Ihre geringen Ansprüche an Klima, Wasser- und Futterqualität einerseits und ihr breites Angebot an Nutzleistungen für den Menschen andererseits machen sie in bestimmten Gegenden unersetzbar (DOPPELBAUER, 2002). Der mit dem Bevölkerungswachstum einhergehende steigende Nahrungsmittelbedarf erfordert die Entwicklung synthetischer Rassen, die die Vorteile von importierten Leistungsrassen mit den Vorteilen der lokalen Adaptation autochthoner Rassen durch Kreuzungen verbindet (GANDINI und OLDENBROEK, 1999). Die Autoren sind der Meinung, dass dieser Entwicklung eine Identifizierung nützlicher Rassen vorausgehen, und ein gezieltes Zuchtmanagement folgen muss. Andere Autoren sehen jedoch gerade in der Introgression von Genen der Hochleistungsrassen bei lokal sehr gut angepassten traditionellen Rassen eine große Bedrohung der genetischen Ressourcen, die diese Populationen möglicherweise darstellen (TABERLET et al., 2007).

Die extensive Form der Landwirtschaft hat innerhalb Europas vor allem in marginalen ländlichen Gegenden mit oftmals extremen Umweltbedingungen ihre Bedeutung (BERTAGLIA, 2005). Die autochthonen Rassen können sich hier gegenüber modernen Hochleistungsrassen mit hohen Milch- und Fleischleistungen durch ihre evolutionär erworbene Adaptation an ihre Umwelt als vorteilhaft erweisen (TABERLET et al., 2007), da die geringeren Ansprüche an Klima und Umwelt zu einer Verringerung der Produktionsnebenkosten und des Arbeitsaufwands beitragen. Für die höhere Fitness bei Rassen mit niedriger Produktivität gibt es mehrere Erklärungsansätze. Niedrige Heritabilitäten sind dafür verantwortlich, dass eine Selektion auf Fitnessmerkmale bei züchterisch intensiv beeinflussten Rassen bisher wenig effizient war (KRÄUßLICH, 2000). Negative Korrelationen zwischen Leistungsmerkmalen und Fitness-

merkmalen sind bekannt. Sie können in manchen Fällen durch eine Suppression von Quantitative-Trait-Loci-Effekten (QTL-Effekten) erklärt werden. Erst regulatorische Prozesse auf Ebene der DNA ermöglichen diesen Rassen die Anpassung an schwierige Umweltbedingungen, wie zum Beispiel ein restriktives Futterangebot (NOTTER, 1999). Geringere Anfälligkeit gegenüber Krankheiten, wie beispielsweise gegenüber Parasitosen, kann zu besseren Leistungen im Vergleich mit importierten Hochleistungsrassen mit niedriger Fitness führen. So konnte für Rhönschafe gezeigt werden, dass sie weniger anfällig für den Befall mit gastrointestinalen Nematoden, wie *Trichostrongylus subspezies* (*spp.*), *Haemonchus contortus* und *Cooperia spp.* sind als Merinolandschafe (GAULY und ERHARDT, 2001).

Das Ziel der Erhaltung der tiergenetischen Diversität sollte der Zugang zum vollen Anpassungspotential einer Tierart sein (NOTTER, 1999). Dies kann nur durch den Erhalt von an ihren Lebensraum adaptierten Rassen erfolgen (TABERLET et al., 2007).

Ein Beispiel für eine sinnvolle und gut funktionierende Zusammenarbeit zwischen autochthonen Rassen und Leistungsrassen stellen Kreuzungszuchtprogramme für die Schweinerassen Pietrain und Schwäbisch-Hällisches Landschwein dar. Dabei wird u. a. die besondere Fleischqualität bedingt durch den hohen Fettansatz der Landrasse mit der hervorragenden Bemuskelung und daraus resultierenden hohen Ausschachtungsergebnissen der Pietrain kombiniert. Eine Studie (URL 14) konnte für diese Kreuzung durchweg bessere Werte für alle Speckmaße und den Fleischanteil in ökologischen Haltungssystemen im Vergleich mit konventionellen Rassen und Kreuzungen feststellen. Ein ähnlicher Ansatz könnte auch bei Schaf und Ziegenrassen verfolgt werden, um z. B. hohe Fruchtbarkeit und gute Mütterlichkeit der autochthonen Rassen mit überlegenen Mastleistungen bei den spezialisierten Rassen zu verbinden.

Aufgaben der Landschaftspflege spielen in einigen europäischen Ländern, in denen die wirtschaftliche Bedeutung der Landwirtschaft stetig abnimmt, eine zunehmend wichtigere Rolle. Schafe und Ziegen können durch ihren selektiven Fraß und die durch ihr geringes Gewicht bedingte positive Trittwirkung, die Verbuschung von Moor- und Heidelandschaften verhindern und sich somit positiv auf deren vielfältige Flora und Fauna auswirken (DOPPELBAUER, 2002). Meist ist es nur bestimmten Rassen möglich, solche Gebiete zu beweiden, sich dort zu orientieren und ausreichend Nahrung zu finden (URL 6 und 7; TABERLET et al., 2007). Es gibt also sowohl Gründe, die Vielfalt der Schaf- und Ziegenrassen unter aktuellen Gesichtspunkten zu erhalten, als auch wegen ihrer potenziellen zukünftigen Bedeutung. Die Domestikation von Nutztieren und die daraus resultierende Rassenvielfalt

dokumentiert GRAVERTS (1996) Meinung nach nicht zuletzt eine der größten Kulturleistungen des Menschen und sollte wie andere Denkmäler und Kunstwerke um ihrer selbst Willen erhalten werden.

2.2.2.1 Identifikation von funktionellen Genen anhand genetischer Polymorphismen

Das Verständnis der genetischen Basis phänotypischer Diversität innerhalb und zwischen den Tierarten ist eine große Herausforderung der modernen Biologie. Durch die lange Selektionsgeschichte von domestizierten Haustierrassen stellen diese eine einzigartige Quelle zur Erforschung dieser Phänotyp-Genotyp-Beziehungen, der evolutionär bedingten Variation innerhalb der Arten, dar (ANDERSSON, 2001). Merkmale wie Fruchtbarkeit, Verhalten und Fitness werden von einer Vielzahl von Genen beeinflusst, deren Identifizierung dementsprechend schwierig ist. Zusätzlich spielen Umweltfaktoren (Exposition zu Pathogenen) bezüglich dieser polygenen Merkmale eine große Rolle, was sich in den niedrigen Heritabilitäten widerspiegelt. ANDERSSON ist der Meinung, dass der vergleichenden Genetik bei der Identifizierung dieser Gene und Regulationsmechanismen auf Ebene der DNA eine wichtige Rolle zukommt. Die große phänotypische Variation einerseits und die begrenzte neutrale genetische Variation zwischen den Rassen andererseits, machen diese zu idealen Kandidaten für solche Untersuchungen (ANDERSSON, 2001). Rassen verschiedener Selektionsrichtungen, z. B. Fleisch oder Milch, könnten dazu beitragen die Loci aufzudecken, die auf die Selektion reagiert haben und innerhalb der Rassen einer Nutzungsrichtung nur eine geringe Diversität aufweisen. Ein Beispiel für einen solches Gen ist das Acyl-Coenzym A: Diacylglycerol-Acyltransferasegen (*DGATI*), bei dem die Verteilung des Allels *DGAT^K*, welches mit erhöhten Milchfettgehalten assoziiert ist, auffällt. Für die Rassen, die auf Milchfettgehalt selektiert wurden, wie z. B. *Jersey*, wurden hohe Frequenzen für das *DGAT^K* geschätzt. Im Gegensatz dazu stehen die hohen *DGAT^A* Frequenzen bzw. die Fixation dieses Allels bei vielen Fleischrinderrassen (KAUPE et al., 2004).

Bei monogenen Merkmalen fällt die Charakterisierung kausativer Mutationen innerhalb von Nutztierarten leichter. So konnten Gene identifiziert werden, die die Hornlosigkeit und Intersexualität bei der Ziege (PAILHOUX et al., 2001) oder die Ovulationsrate beim Schaf (MULSANT et al., 2000) bestimmen. Viele QTLs, die eine Breite an Phänotypen wie Wachstum, Verhalten und Fruchtbarkeit beeinflussen, konnten in den verschiedenen Nutztierarten bereits kartiert werden und im Idealfall, wie beim Insulin-like-growth-Factor 2 (*IGF2*) des Schweines, zur Identifizierung der verursachenden Mutation führen (JEON et al., 1999;

NEZER et al., 1999; VAN LAERE et al., 2003). Die Mutation wurde als Einzelnukleotidaustausch (SNP) in einem Intron des Gens identifiziert. Durch dieses Ergebnis gelang es auch, die Funktion der Wildtypsequenz als „silencer“ Element näher zu charakterisieren. Die mutierte Sequenz hat eine signifikant geringere „silencer“ Funktion. So zeigte sich, dass der positionelle Kandidatengenansatz in Form von Kopplungsanalyse mit nachfolgender Identifizierung von Kandidatengen ein Schritt auf dem Weg zum Verständnis der genetischen Grundlage phänotypischer Variation sein kann (ANDERSSON und GEORGES, 2004).

2.2.2.2 Lokale Adaptation und genetische Polymorphismen

Um die genetischen Grundlagen der lokalen Adaptation zu untersuchen, eignen sich Rassen, die sich auf Grund ihres extremen Lebensraums im Verlauf ihrer Domestikation auseinander entwickelt haben. Verschiedene Rassen einer Haustierart können phänotypisch genauso unterschiedlich sein wie Tierarten untereinander, jedoch mit dem Vorteil, dass sie sich aus evolutionärer Sicht erst vor kurzer Zeit (~10 000 Jahre) von ihren wilden Vorfahren getrennt haben. Dies erleichtert auch hier die Identifizierung verursachender Mutationen, da die neutrale Divergenz der Sequenzen zwischen Rassen, wie in Kapitel 2.2.2.1 angesprochen, geringfügig gegenüber der hohen neutralen Divergenz ist, die man zwischen den Arten vorfindet (ANDERSSON und GEORGES, 2004). Es gibt verschiedene molekulargenetische Vorgehensweisen auf der Suche nach den genetischen Grundlagen der Adaptation: Ein Weg führt über genomweite SNP-Analysen zur Detektion von QTLs und zur Identifizierung von Kandidatengen. Ein wichtiges Instrument hierfür sind die High Quality Draft (HQD) Genomsequenzen, die z. B. für das Rind zur Verfügung stehen. Der umgekehrte Ansatz beginnt mit der Auswahl von Kandidatengen, bei denen die Funktion ihrer Produkte, z. B. Enzymwirkung im Rahmen des Stoffwechsels oder Botenstoffwirkung zwischen Abwehrzellen, Vermutungen über einen Zusammenhang mit Adaptationsprozessen zulässt. Diese werden dann auf das Auftreten von Mutationen untersucht (SCHLÖTTERER, 2002). Beide Ansätze können zur Identifizierung von adaptiver Variation führen (MORIN et al., 2004). Analysen verschiedener Kandidatengene auf Mutationen in ihren intronischen und extronischen wurden inzwischen auch bei einigen Schaf- und Ziegenrassen durchgeführt (CAPPUCIO et al., 2006; PARISET et al., 2006).

Ein Zweig der Genetik, die „landscape genetics/genomics“, befasst sich im Speziellen mit dem Einfluss des Landschaftsraums auf die Genetik von Populationen. Genetische Diskontinuität in Form von Prozessen und Mustern des Genflusses, der genetischen Drift und der Se-

lektion, sollen mit Hilfe der Erstellung von Selektionsgradienten ermittelt und so in ihrer Funktion im Rahmen lokaler Adaptation erfasst werden (MANEL et al., 2003). Dieser Ansatz kann zum einen das Wissen über ökologische Zusammenhänge verbessern und unterstützt zum anderen die wissenschaftliche Arbeit zur Erhaltung bedrohter Populationen und das Management ihrer genetischen Diversität. Es geht dabei um die Klärung, wie geografische Faktoren und Faktoren der Umwelt sich auf die Struktur der genetischen Variation- sowohl auf Ebene des Individuums als auch auf Ebene der Populationen- auswirken. Notwendige Voraussetzungen für derartige Untersuchungen sind eine große Anzahl an molekularen Markern, ausreichend große Populationen, die entlang eines potenziellen Selektionsgradienten verteilt sind, und die statistische Auswertung erfasster Daten. Erfolgreiches Beispiel einer solchen Analyse ist die Studie von MANEL et al. (2003) über zwei Loci bei Stechmücken der Gattung *Culex pipiens*, für die ein Zusammenhang mit Pestizidresistenz angenommen wurde. Der Selektionsgradient wurde hier durch einen in Südfrankreich liegenden Nord-Süd-Ausschnitt repräsentiert, der mit Organophosphat behandelte und pestizidfreie Gebiete umfasste. Es konnte gezeigt werden, dass mit der Entfernung zum mit Organophosphaten behandelten Gebiet die Resistenz absank, was als Konsequenz lokaler Adaptation interpretiert werden kann. Migration und Selektion wirken hierbei als antagonisierende Kräfte (MANEL et al., 2003).

Auch komplexere Spezies wie z. B. Schafe wurden inzwischen untersucht, mit dem Ziel Loci, auf die natürliche Selektion wirkt, aufzudecken. JOOST et al. (2007) kombinierten hierfür geostatistische Daten mit einem umfassenden molekulargenetischen Datensatz, bestehend aus einer Mikrosatellitenanalyse von 57 Schafrassen Europas und des Nahen Ostens mit 31 Markern. Bei dieser räumlichen Analyse (Spatial analysis method/SAM) wird statistisch getestet, ob Umweltvariable, z. B. Anzahl von Regentagen, Windgeschwindigkeiten oder jährlichen/monatlichen Niederschlagsmengen, mit bestimmten Allelen an Mikrosatellitenloci assoziiert sind. Es gelang die Identifizierung von fünf Allelen an vier Loci, für die höchst signifikante Assoziationen mit mindestens einer Umweltvariablen ermittelt wurden. Ein Allel am Locus *DYMS1* war assoziiert mit der Niederschlagsmenge. Auffälligerweise war für jenen Locus bereits in einer früheren Untersuchung (BUIKAMP et al. 1996) eine Kopplung mit Parasitenresistenz bei Scottish Blackface ermittelt worden. Diese Rasse war auch Bestandteil dieser Studie und lebt in dem Gebiet mit den höchsten Niederschlagsmengen. Um mit SAM Adaptation an bestimmte Umweltbedingungen nachzuweisen, benötigt man also detaillierte

geografische Informationen über die Region aus der die untersuchten Individuen stammen und geeignete, dazugehörige populationsgenetische Daten (JOOST et al., 2007).

2.3 Möglichkeiten der Erfassung und Charakterisierung genetischer Diversität

Es gibt viele Wege, um Diversität innerhalb und zwischen Rassen zu beschreiben und zu messen. Die phänotypische Diversität kann hierbei als exprimierte genetische Diversität unter Einfluss der Umwelt oder als genetische Diversität der kodierenden Regionen des Genoms angesehen werden (OLDENBROEK, 1999). Neben der Charakterisierung von Merkmalen wie Farbe, Größe, Milchleistung oder tägliche Gewichtszunahmen gibt es Möglichkeiten, Variationen direkt auf Ebene der DNA oder ihrer Translationsprodukte, z. B. ihrer Enzyme, zu beschreiben. Einige Untersuchungen (BAUMUNG et al., 2006; DIEZ-TASCON et al., 2000) zielen direkt auf nicht kodierende Bereiche und ermöglichen damit die Messung von neutraler genetischer Diversität. Andere Analysen (DURIEZ et al., 1993; TAJIMA et al., 1999) erfassen Polymorphismen in kodierenden Regionen der DNA, auf die unter Umständen selektiver Druck wirkt (TIENDEREN et al., 2002).

2.3.1 Proteinpolymorphismen (Allozyme)

Die ersten Marker, mit denen man genetische Diversität untersucht hat, waren Proteinvarianten, so genannte Allozyme. Der Begriff Allozym leitet sich aus der Beschreibung „alleles Enzym“ ab, wobei nicht jedes Protein, das in variablen Aminosäuresequenzen auftritt, auch Enzymwirkung hat. So untersuchte z. B. NEELIN bereits 1964 Milchproteine und charakterisierte zwei Varianten des bovinen κ -Kasein (κ -CN) (NEELIN, 1964). Das Prinzip der Allozym polymorphismen beruht auf der gelelektrophoretischen Auftrennung von Proteinen, die sich aufgrund von Aminosäuresubstitutionen in Ladung oder auch Größe unterscheiden. Die Visualisierung der Banden erfolgt durch die Behandlung mit spezifischen Färbelösungen (SCHLÖTTERER, 2004).

Es werden in erster Linie Enzymsysteme, die bereits erwähnten Milchproteine und Blutproteine untersucht. PEPIN und NGYUEN (1994) z. B. untersuchten fünf Ziegenrassen auf Blutproteinpolymorphismen, wobei sich die geringe Anzahl an informativen Marker-Loci, als problematisch erwies, und so den Umfang der Erfassung genetischer Diversität begrenzte. In einer Untersuchung von verschiedenen afrikanischen *Bos taurus* und *Bos indicus* Rassen kombinieren IBEAGHA-AWEMU et al. (2004) Blut- und Milchproteinmarker mit Mikrosatellitenmarker, um Verwandtschaft und Introgression zwischen den Populationen zu ermitteln.

Die Diversität an den Proteinloci war zwischen beiden Subspezies gleich, während an den Mikrosatellitenloci die *Bos indicus* Rassen variabler waren. Die unterschiedlichen Ergebnisse im Vergleich der beiden Markersysteme können zum einen in der niedrigeren Variabilität der Proteinmarker begründet sein oder zum anderen auf Selektionsdruck an den Proteingenorten hinweisen.

2.3.2 Mitochondriale DNA

Die mitochondriale DNA (mtDNA) ist bei den meisten Säugern ein kleines Plasmid mit ungefähr 16 000 bp, das nur in den Mitochondrien vorkommt, keiner Rekombination unterliegt und ausschließlich von mütterlicher Seite vererbt wird (BRUFORD et al., 2003). Das heißt, dass sich alle neu akkumulierte genetische Variation fast ausschließlich aus einzelnen Punktmutationen ergibt. Die Besonderheit der mtDNA liegt in ihrer sich schnell entwickelnden, hohen Sequenzvariabilität gegenüber nukleärer DNA. Im Gegensatz zur diploiden, nukleären DNA ist mtDNA haploid. Daraus ergibt sich der Vorteil, dass alle typisierten mtDNA-Marker eines Individuums gekoppelt sind und einen Haplotypen darstellen. In einer Studie über die Diversität der mtDNA Kontrollregion konnten bei 406 untersuchten Hausziegen 331 Haplotypen festgestellt werden, die wiederum drei maternalen Linien oder Haplotypgruppen zugeordnet werden konnten (LUIKART et al., 2001). Obwohl man aufgrund der hohen Variabilität genetische Diversität mit mtDNA-Markern beschreiben kann, ist ihr Nutzen dann begrenzt, wenn man gesamtgenomische Diversität charakterisieren will. Grund dafür ist die spezifische, evolutionäre Dynamik der mtDNA und ihr einzellokustypisches Verhalten. Außerdem kann durch die rein maternale Vererbung der von männlicher Seite beeinflusste Anteil des Genflusses nicht detektiert werden, obwohl dieser sehr groß ist (BRUFORD et al., 2003). Ein ausdrucksstarkes Beispiel dafür ist die komplette Abwesenheit von *Bos indicus*-spezifischer mtDNA in afrikanischen *Bos-taurus*-Rindern, trotz der hohen Introgressionsraten von Zeburindern bei den taurinen Rassen dieses Kontinents (MACHUGH et al., 1997).

2.3.3 Random amplified polymorphic DNA (RAPD)

Diese Methode basiert auf der PCR-Amplifizierung von genomischer DNA mit unspezifischen (degenerierten) kurzen Primern (MAZURIER et al., 1992). Die Unterschiede in den Sequenzen werden über elektrophoretische Auftrennung der entstandenen Fragmente detektiert, ohne dass Informationen zu den Sequenzen notwendig sind. Sie eignen sich sehr gut, um genetische Diversität vor allem in Genomen von bisher noch wenig charakterisierten Tierarten zu beschreiben (HADRYIS et al., 1992; OH, 1999). So untersuchten OH et al. (1999) eine

koreanische Schweinerasse unter Einsatz dieser Methode. Allerdings handelt es sich um dominante Marker, mit denen keine Information über die Heterozygotie ermittelt werden kann. Die dargestellte Diversität kann sowohl in kodierenden als auch in nicht kodierenden Bereichen liegen, selektive Einflüsse können nicht ausgeschlossen werden.

2.3.4 Amplified fragment length polymorphism (AFLP)

Die AFLP-Analyse ist, ebenso wie die RAPD-Untersuchung, eine so genannte Multilocus-Marker-Methode, die von VOS et al. (1995) entwickelt wurde. Mit dieser Methode können Punktmutationen, Insertionen, Deletionen und Rekombinationen detektiert werden. Bei der AFLP-Analyse werden genomische Fragmente nach selektiver PCR nachgewiesen. Im Wesentlichen laufen hierzu drei Schritte ab:

- 1) Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen und Anlagerung (Ligation) kurzer Oligonukleotide, so genannter Adapter, an die entstandenen Fragmente
- 2) Amplifikation der Restriktionsfragmente mittels zu den Adaptern komplementärer Primer
- 3) Elektrophoretische Analyse der Fragmente

Auch diese Methode ist zur Abschätzung genetischer Diversität nutzbar, wie dies z. B. bei iberischen Schweinerassen und italienischen Ziegenrassen praktiziert wurde (AJMONE-MARSAN et al., 2001; OVILO et al., 2000). Ein Nachteil dieser Methode, wie auch der RAPDs, wird in der zum Teil niedrigen Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und den sich daraus ergebenden Konsequenzen für den Vergleich der Ergebnisse aus verschiedenen Studien gesehen (SCHLÖTTERER, 2004). Die Methode wird häufig zur Charakterisierung genetischer Diversität bei Pflanzen angewendet (KÖHLER et al., 1998).

2.3.5 Mikrosatelliten

Mikrosatelliten sind Wiederholungen von kurzen Nukleotidmotiven von einem bis sechs Basenpaaren (repeats) (TAUTZ und SCHLÖTTERER, 1994). Sie setzen sich aus 10 bis 30 Repeats zusammen und sind über das gesamte Genom verteilt. Häufig vorkommende Repeats sind z. B. CT oder CAG. Durch die unterschiedliche Anzahl an Wiederholungen ergeben sich die Längenpolymorphismen der Mikrosatellitenallele. Die enorme Variabilität an den Mikrosatellitenloci und ihre ausgeglichene Verteilung im Genom machen sie zu geeigneten Markern zur Messung genetischer Diversität. Durchschnittlich finden sich 10 Allele und etwa 70 % Heterozygotie pro Locus (BRUFORD, 2004; BRUFORD und WAYNE, 1993). Die Marker sind in der Regel neutral. Es gibt allerdings auch Kopplungseffekte mit Merkmalen

(GROSZ und MACNEIL, 2001) oder Einflüsse auf die Transkription von Genen, in deren Promotorbereich ein Mikrosatellit lokalisiert ist (HAMADA et al., 1984).

Eine Mikrosatellitenanalyse ermöglicht es, genetische Diversität innerhalb und zwischen Populationen zu quantifizieren und relativ kurz zurückliegende Ereignisse genetischer Drift zu detektieren (DIEZ-TASCON et al., 2000). Die FAO hat inzwischen eine Zusammenstellung von geeigneten Markern vorgenommen, um eine Verknüpfung verschiedener Projekte, die sich mit den gleichen Tierarten befassen, zu ermöglichen (BAUMUNG et al., 2006).

Probleme bei der Mikrosatellitenanalyse zur Charakterisierung genetischer Diversität ergeben sich aus dem Auftreten von Nullallelen, variablen Mutationsmustern und der Notwendigkeit der Standardisierung, um eine Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Studien zu ermöglichen (BEAUMONT und BRUFORD, 1999; BRUMFIELD et al., 2003; MORIN et al., 2004).

2.3.6 Single Nucleotide Polymorphism (SNP)

Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) stellen den am weitesten verbreiteten Typ an Sequenzvariation im Genom dar (BRUMFIELD et al., 2003; SYVANEN, 2001). Trotz der im Vergleich zu Mikrosatelliten geringeren Variabilität des einzelnen SNP-Markers, liegen laut BRUMFIELD etwa 90 % der genetischen Variation im humanen Genom als SNPs vor. Ein SNP stellt eine Punktmutation dar, die aus Transition oder Transversion einer Base hervorgeht (BRUMFIELD et al., 2003). Transitionen finden zwischen den Purinbasen Adenin und Guanin oder den Pyrimidinbasen Cytosin und Thymin statt, während Transversionen entsprechend zwischen je einer Purin- und einer Pyrimidinbase erfolgen. Transitions substitutionen treten häufiger auf als Transversionen, wobei CpG Dinukleotide die höchsten Mutationsraten zeigen (ein Viertel bis ein Drittel aller spontanen Nukleotidaustausche finden an CpG Dinukleotiden statt). DUNCAN & MILLER (2001) zeigten, dass dies in den meisten Fällen durch eine hydrolytische 5'-Methylcytosin Deaminierung verursacht wird. Das entstehende Thymin wird als normaler Baustein der DNA nicht von den DNA-Glykosylasen des Reparatursystems erkannt und bei der nächsten Replikation wird die Mutation fixiert, indem an Stelle des GC Basenpaares ein AT-Paar erscheint (KNIPPERS, 2001). Als Folge dessen hat sich im Laufe der Evolution im Vertebratengenom die Häufigkeit der Dinukleotidfolge CpG auf etwa ein Fünftel des Wertes verringert, der den statistischen Erwartungen entsprechen würde. Im humanen Genom kommen durchschnittlich auf 1000 bp ein SNP. Die Verteilung der SNPs auf den Chromosomen ist jedoch unregelmäßig und so weisen einige Regionen eine signifikant höhere oder niedrigere Diversität auf als ein durchschnittlicher Abschnitt (BRUMFIELD

et al., 2003). Innerhalb einer Population sind die meisten Nukleotidpositionen invariant (SYVANEN, 2001), innerhalb von Exons unterscheidet man zwischen synonymen und nicht synonymen Substitutionen.

Die meisten SNPs liegen allerdings in nichtkodierenden Bereichen, bleiben entsprechend unübersetzt und haben oftmals keinen direkten Einfluss auf den Phänotyp (ncSNP). Allerdings können Einzelnukleotidaustausche, die im 5' Nicht-Kodierungsbereich (5'UTR), dem 3' Nicht-Kodierungsbereich (3'UTR) und in Introns von Genen liegen, deren Transkription sowohl quantitativ als auch qualitativ durchaus beeinflussen. Dies konnte in verschiedenen Untersuchungen bereits gezeigt werden, z. B. der Polymorphismus im Intron 3 des *IGF-2* beim Schwein (VAN LAERE et al., 2003). „Enhancer“ oder „Silencer“ Elemente werden hier durch SNPs modifiziert wie bereits in Kapitel 2.2.2.1 erläutert, ebenso können Transkriptionsfaktorbindungsstellen so verändert werden, dass die Faktoren nicht mehr binden. Daraus ergibt sich, dass sowohl ein intragener cSNP als auch ncSNP ein Merkmal direkt beeinflussen kann, und dieses Gen dann wiederum als Kandidatengen für ein bestimmtes Merkmal betrachtet werden kann (NEZER et al., 1999; WINTER et al., 2002). SNPs mit direkten Auswirkungen auf den Phänotyp wurden in einigen besonders für die Tierzucht relevanten Genen gefunden. So gelang deren Charakterisierung z. B. im Wachstumsrezeptorgen bei Zwerghühnern (DURIEZ et al., 1993; HUANG, 1993) und dem Myostatingen beim Rind (*GDF-8*) (GROBET et al., 1998; KAMBADUR et al., 1997). Durch die Mutation im letztgenannten Gen entstehen sogenannte Doppellender.

Der Selektionsdruck auf kodierende Regionen oder Regionen mit expressions-regulatorischer Funktion ist den vorhergegangenen Ausführungen zu Folge entsprechend höher, was sich in der Regel in einer niedrigeren Variabilität der Nukleotidsequenzen widerspiegelt. Für das humane Genom geben NICKERSON et al. (1998) die Diversität der Nukleotidsequenzen innerhalb kodierender Exons um ein vierfaches niedriger an als in intronischen Abschnitten. Ein Vergleich von SNP-Frequenzen hat ergeben, dass etwa alle 200-500 bp ein ncSNP auftritt und alle 500-1000 bp ein cSNP (BRUMFIELD et al., 2003).

Demnach sind die meisten SNP-Marker in nicht kodierenden Regionen lokalisiert und haben nur in manchen Fällen direkte Auswirkungen auf den Phänotyp. Diese SNPs können entweder als Marker in populationsgenetischen Analysen oder Evolutionsstudien eingesetzt werden, oder als Marker - so genannte „putative tags“ (vermutliche Anhängsel)- für funktionelle Variation an einer nahe gelegenen Position in den Kandidatengen oder der Region mitwirken (TIENDEREN et al., 2002).

Ein SNP-Marker ist in der Regel biallelisch und sollte kostengünstig durch so genannte ‚high-throughput‘ Methoden genotypisierbar sein (SCHLÖTTERER, 2004). Um genetische Diversität innerhalb und zwischen Rassen mit Hilfe von SNP-Markern charakterisieren zu können, müssen möglichst viele SNP-Marker, etwa die vierfache Menge, die für eine Mikro-satellitenanalyse benötigt werden, genotypisiert werden.

Es besteht außerdem die Möglichkeit, eine Kombination an SNP-Markern innerhalb eines Gens als Allele oder Kombinationen dieser Allele innerhalb gekoppelter Gene als Haplotypen zu betrachten und Variabilität zu beschreiben (CAROLI et al., 2006)

Anders als bei der AFLP- der RAPD-Analyse sind für die Untersuchung von SNPs Sequenzinformationen für das Primerdesign und das Ablesen des Leserahmens unabdingbar. Konservierte Sequenzabschnitte von orthologen Genen sind Voraussetzung für deren Amplifizierung bei so genannten „non-model“ Spezies (Spezies, die nicht Gegenstand von groß angelegten Genomprojekten sind). Diese „CATS loci“ (Comparative anchor tagged sites loci) werden durch Alignments homologer Genabschnitte verschiedener Spezies ermittelt (MORIN et al., 2004). Gensequenzinformationen von Rindern eignen sich aufgrund der engen evolutionären Verwandtschaft (Zeitpunkt der Divergenz: ungefähr vor 20 Millionen Jahren) sehr gut für das Primerdesign beim kleinen Wiederkäuer (ANDERSSON und GEORGES, 2004). Für die kleinen Wiederkäuer Ziege und Schaf sind derzeit (Stand 2008) noch keine SNPs in der NCBI dbSNP Datenbank abrufbar. Allerdings gibt es inzwischen zwei sehr umfassende Untersuchungen, die die Charakterisierung von 27 SNPs bei der Ziege und 37 SNPs beim Schaf zum Inhalt haben (CAPPUCIO et al., 2006; PARISET et al., 2006).

2.3.6.1 Molekularbiologische Verfahren zur Detektion und zur Genotypisierung von SNPs in Kandidatengen

Die Strategien zur Detektion von Punktmutationen beinhalten zumeist eine PCR-Amplifizierung der Regionen, die von Interesse sind, eine schnelle Screening-Analyse, die das Vorliegen von Mutationen aufzeigt, und die anschließende Sequenzanalyse, der beim Mutationsscreening positiven Proben. Zur Anwendung als Screening-Analyse-Methoden und zur anschließenden Genotypisierung in größerem Umfang kommen derzeit hauptsächlich solche, die auf den Technologien des Mikrochips basieren. Bei diesen steht die Hybridisierung von komplementären DNA-Strängen im Zentrum. Fluoreszenzmarkierte Fragmente der zu analysierenden DNA (oder RNA) werden mit Oligonukleotiden hybridisiert, die wiederum auf einem Glas-Chip fixiert sind. Die so genannten „Variation Detections Arrays“ (VDA) nutzen

dies, um große DNA-Abschnitte auf unbekannte Polymorphismen zu screenen, indem sie die zu untersuchende DNA-Probe zunächst einer PCR-Amplifikation unterziehen, bei der fluoreszenzmarkierte Nukleotide eingebaut werden, und anschließend die Hybridisierung an den fixierten Oligonukleotiden durchführen. Gemessen wird die unterschiedliche Stärke des Hybridisierungsprozesses, die von der Anzahl der Fehlpaarungen abhängt und entsprechend bei perfekter Komplementarität am stärksten ausfällt. Die Auswertung erfolgt über ein hochauflösendes Fluoreszenzscanning, das mit der entsprechenden Computersoftware analysiert wird. Die Genauigkeit der VDA ist vergleichbar mit der von Sequenzierungen mittels der Dye-Terminator-Technik in groß angelegten Screeninguntersuchungen (WANG et al., 1998). Der besondere Vorteil dieser Technologie liegt in ihrem Potential zur schnellen Analyse von großen Mengen an DNA-Sequenzen (SYVANEN, 2001).

Zur Genotypisierung kommt beispielsweise die allelspezifische Oligonukleotide (ASO) Hybridisierung zum Einsatz. Bei dieser Methode werden für ein Allel spezifische Oligonukleotide mit beiden allelen Varianten hybridisiert. Nur die Hybride, die keine Fehlpaarungen enthalten, bleiben stabil. Die Analyse erfolgt z. B. über ‚Solid-Phase Mikroarrays‘ und Fluoreszenzdetektion. Diese Methode hat bei hohem Probendurchsatz den Nachteil, dass die Reaktionsbedingungen für einzelne SNPs empirisch ermittelt werden müssen und so die Multiplex-Anwendung erschwert wird (SYVANEN, 2001).

Auch die Primerextensionsanalysen basieren auf Mikrochiptechnologien und werden zur Genotypisierung eingesetzt. Man unterscheidet z.B.:

(1) Allel-Spezifische-Primer-Extension (ASPE)

Es werden Vorwärts-Primer eingesetzt, deren 3'-Enden komplementär zu dem jeweiligen am SNP beteiligten Nukleotid sind, und ein gemeinsamer Rückwärtsprimer. Nur DNA-Stränge, die an dieser Nukleotidposition komplementär zum allelspezifischen Vorwärtsprimer sind, werden verlängert und amplifiziert. Im Anschluss erfolgt der Nachweis der selektiven Amplifikation der SNP-Allele, entweder mittels in den Assay eingebrachter, mit doppelsträngiger DNA interkalierenden Fluoreszenzpuffers oder durch die Verwendung von fluoreszenzmarkierten, allelspezifischen Vorwärtsprimern. Eine anschließende Größenauftrennung verbessert die zielspezifische Detektion und schließt falsch positive Ergebnisse durch Primerdimere aus. Diese Auftrennung erfolgt im Kapillarsequencer oder mit einer Mikroplattenarray-Diagonal-Elektrophorese. Die Grenzen dieser Methode für den Einsatz bei hohem Probendurchsatz zeigen sich darin, dass die Reaktionsbedingungen und das Primerdesign für jeden SNP empirisch

optimiert werden müssen. Daher sind kombinierbare Reaktionsbedingungen Voraussetzung für Multiplexanwendungen (MORIN et al., 2004; SYVANEN, 2001).

(2) Single Base Extension (SBE)/ Minisequenzierung

Beim „DNA-polymerase-assisted genotyping“, wie die SBE auch genannt wird, werden die allelen Varianten um das jeweilige, für den Austausch spezifische, fluoreszenzmarkierte Nucleotid am 3'-Ende des Primers durch die DNA-Polymerase verlängert. Die Detektion des Genotyps erfolgt über eine Fluoreszenzanalyse oder über Mikroarrays. Die Reaktion ist sehr robust, so dass die meisten SNP unter ähnlichen Bedingungen analysiert werden können, was die Durchführung von Multiplexreaktionen erleichtert. Dies ist für den Einsatz bei hohem Probendurchsatz besonders vorteilhaft (LINDROOS et al., 2001).

Ältere Methoden zur Mutationsdetektion basieren zum einen auf Konformationsänderungen z.B. PCR-SSCP (BEIER, 1993; ORITA, 1989a), DGGE (GULDBERG und GUTTLER, 1993), TTGE (SCHLÖTTERER, 2004) und Heteroduplexanalyse (WHITE et al., 1992) oder zum anderen auf Enzymwirkung z.B. BESS (YAHYAOUI et al., 2001) und EMC (YOUIL et al., 1995). Beim PCR-SSCP wird beispielsweise eine sequenzabhängige Änderung der Laufeigenschaften von Einzelsträngen eines PCR-Fragments in Polyacrylamidgelen unter definierten Versuchsbedingungen detektiert (ORITA, 1989b). Dazu werden die zu untersuchenden PCR-Fragmente einer Hitzedenaturierung mit anschließender sofortiger Kühlung unterzogen. Die Einzelstränge nehmen dabei komplexe, kaum vorhersagbare Konformationen ein, die sowohl sequenzabhängig sind, als auch von anderen Faktoren, wie z. B. der Temperatur beeinflusst werden (ORITA, 1989b). Mutationen in der Basensequenz, z. B. SNPs, können die räumliche Struktur der Einzelstränge so verändern, dass sie ihr eigentliches Laufverhalten in Polyacrylamidgelen verändern.

Der Goldstandard zur Verifizierung einer Mutation ist die Direktsequenzierung. Sie ist die exakteste Methode, um einen Polymorphismus zu charakterisieren, da sie zum einen die Identifizierung der betroffenen Basen erlaubt, und zum anderen die genaue Position bestimmt (SCHLÖTTERER 2004). Die Kettenabbruchmethode nach SANGER (1977) kann Polymorphismen jeglicher Art unter der Voraussetzung detektieren, dass Startsequenzen bekannt sind und die Mehrheit der zur Analyse eingesetzten DNA diese Mutationen enthält. Die Sensitivität der Methode sinkt, wenn Polymorphismen nur in einer begrenzten Anzahl an DNA-Proben z. B. innerhalb gepoolter Proben oder auch bei der Untersuchung von DNA aus soliden Tu-

moren vorhanden sind. Die Sequenzanalyse ist kostenintensiv und technisch anspruchsvoll (SCHLÖTTERER 2004).

2.3.7 Biometrische Methoden zur Beschreibung und Schätzung der genetischen Diversität

Die genetische Vielfalt innerhalb von Rassen kann durch Schätzung der Allel- oder Genotypfrequenzen beschrieben werden. Eine daraus abgeleitete einfache Kennzahl für die genetische Variation in einer Rasse ist die Heterozygotie an einem Locus bzw. die durchschnittliche Heterozygotie an verschiedenen Loci, die Gendiversität. NEI unterscheidet hierbei die gesamte genetische Diversität einer Population H_T , nämlich die erwartete Heterozygotie unter Annahme des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts (HWG), und die beobachtete Heterozygotie, die vom HWG abweichen kann (NEI, 1973). Die gesamte genetische Diversität (H_T) unterteilt er wiederum in einen Anteil an Diversität, der zwischen den Rassen zu finden ist, die D_{ST} , und einen Anteil der innerhalb der Rassen liegt, die H_S . Daraus ergibt sich folgender Zusammenhang:

$$H_T = D_{ST} + H_S$$

Weiterhin leitet NEI aus den drei Diversitätsindizes die Formel für einen genetischen Differenzierungskoeffizienten G_{ST} ab, mit dem ein Maß für den Anteil der charakterisierten genetischen Diversität zwischen den Rassen gewonnen wird (NEI, 1977):

$$G_{ST} = D_{ST} / H_T$$

Bei multiallelen Markern kann zusätzlich die absolute und die effektive Allelzahl (N_A und N_E) bestimmt und als Maß für die genetische Diversität einer Rasse an einem Locus verwendet werden.

Bei der Betrachtung von vielen unterschiedlichen Rassen bieten sich die verschiedenen Inzucht- und Verwandtschaftskoeffizienten der F-Statistik nach WRIGHT an (WRIGHT, 1951). Interessant ist hier in erster Linie der Fixationsindex F_{ST} . F_{ST} ermittelt die Reduktion der Heterozygotie innerhalb der einzelnen Population im Bezug auf die betrachtete Gesamtpopulation. Für biallele Marker z. B. SNPs entspricht WRIGHTs F_{ST} NEIs G_{ST} , im Falle multialleler Marker entspricht jedoch G_{ST} dem gewichteten Mittel von F_{ST} über alle Allele.

Ziel der F-Statistik ist es, das gesamte ermittelte Heterozygotiedefizit in eine interpopuläre und eine intrapopuläre Komponente zu unterteilen. Der Fixationsindex F_{ST} gibt den Verlust an Heterozygoten einer Subpopulation gegenüber der Gesamtpopulation an, während der F_{IT} -Wert Individuen mit der Gesamtpopulation in Beziehung setzt. Der F_{IS} -Wert hingegen ver-

gleich die Reduktion der Heterozygotierate der Individuen und ihrer zugehörigen Subpopulation und dient als Maß für das Heterozygotiedefizit innerhalb einer Population (HARTL und CLARKE, 1989). Er stellt somit eine Art Inzuchtskoeffizient dar. F_{IS} und F_{IT} sind Messwerte für die Abweichung vom HWG innerhalb der Subpopulationen bzw. der Gesamtpopulation. Die Fixationsindizes beruhen auf folgender Beziehung nach Nei (NEI, 1977), wobei H_S die mittlere erwartete Heterozygotierate der Subpopulationen über die untersuchten Loci darstellt, H_O die mittlere beobachtete Heterozygotierate über die untersuchten Loci und H_T der Mittelwert der erwarteten Heterozygotieraten in der Gesamtpopulation:

$$F_{IS} = H_S - H_O / H_S$$

$$F_{IT} = H_T - H_O / H_T$$

$$F_{ST} = H_T - H_S / H_T$$

F_{ST} variiert theoretisch zwischen 0 und 1. F_{IT} und F_{IS} können positive Werte annehmen und damit auf ein Heterozygotendefizit im Bezug auf das HWG hinweisen oder mit negativen Werten einen Überschuss an Heterozygoten anzeigen (HEDRICK, 1999).

WEIR und COCKERHAM führen WRIGHTs F-Statistik weiter, indem sie in ihren Annahmen zusätzlich ungleiche Stichprobengrößen und eine ungleiche Anzahl an gesammelten Populationen berücksichtigen (WEIR und COCKERHAM, 1984). Ihre Methode ist heute eine der am häufigsten angewendete Form der Schätzung der F-Statistik (WEIR, 1990).

Zur Identifizierung von unter Selektion stehenden Genorten nutzt man deren im Vergleich mit neutralen Genorten abweichendes Muster der Variation, ihr „Ausreißer-Verhalten“. Ein solches abweichendes Verhalten kann sich z. B. in einem außergewöhnlich hohen oder niedrigen F_{ST} -Wert zwischen den Populationen oder einem Überschuss bzw. einem Defizit an Allelen mit niedriger Frequenz innerhalb einer Population widerspiegeln. Mit der Erkennung von so genannten „Ausreißer-Loci“, d.h. von Loci, die sich evolutionär anomal entwickeln, können dann Hinweise auf adaptive oder künstliche Selektion gewonnen werden (LUIKART et al., 2003). Für die Detektion solcher Loci ist die Ermittlung ungewöhnlich niedriger oder hoher genetischer Differenzierung entscheidend (BEAUMONT und NICHOLS, 1996b). Sie kann aber auch durch einen Vergleich von erwarteter und beobachteter Homozygotie in den einzelnen Rassen mit Hilfe des Ewens-Watterson Test auf Neutralität erfolgen (EWENS, 1972; WATTERSON, 1978).

Beim von BEAUMONT & NICHOLS (1996) entwickelten theoretischen Ansatz wird eine computersimulierte F_{ST} -Nullverteilung unter Annahme verschiedener Mutationsmodelle gene-

riert. Anschließend werden dann die beobachteten F_{ST} -Werte (W&C) gegen die beobachteten Heterozygotien aufgetragen und mit der simulierten Verteilung verglichen. Für nach oben aus der Verteilung abweichende Genorte wird adaptive Selektion angenommen.

2.4 Genetische Diversität beim kleinen Wiederkäuer in Europa, Asien und Afrika

2.4.1 Charakterisierung genetischer Diversität beim kleinen Wiederkäuer in Europa

Die genetische Variabilität von Schaf- und Ziegenrassen wurde zunächst anhand von Blutproteinpolymorphismen untersucht. PEPIN und NGYUEN (1994) untersuchten fünf Ziegenrassen unterschiedlicher geografischer Herkunft, wobei sich die Proteinloci als wenig polymorph erwiesen. Entsprechend war auch die Variabilität zwischen den Rassen niedriger als es die Autoren erwartet hatten. RODERO et al. (1997) untersuchten andalusische Schaf- und Ziegenrassen ebenfalls auf Proteinpolymorphismen und erfassten zusätzlich phänotypische Merkmale, wie die Ohrengröße und die Fellfarbe, um Zusammenhänge zwischen gezielter Selektion bestimmter Phänotypen mit Proteinpolymorphismen aufzuklären.

Bei AFLP-Analysen von sieben bzw. fünf italienischen Ziegenrassen durch AJMONE-MARSAN et al. (2001) und CREPALDI et al. (2001) wurde gezeigt, dass die große Variabilität, die mit den AFLP-Markern dargestellt werden konnte, zu 89 % respektive 91 % innerhalb der Rassen zu finden ist und nur 11 % bzw. 9 % der Variabilität zwischen den Rassen liegt. Eine Analyse mit 31 Mikrosatellitenmarkern bei acht Schafrassen der Schweiz ergab hohe durchschnittliche Heterozygotiewerte (0,60 bis 0,71) innerhalb der Rassen bei einer geringen Variabilität zwischen den Populationen, ausgedrückt in einem G_{ST} -Wert von 0,17 (STAHLBERGER-SAITBEKOVA et al., 2001). Zwischen acht Schweizer, einer karibischen Ziegenrasse und Bezoarziegen wurden durchschnittliche Heterozygotiegrade (H_E) von 0,17 bis 0,57 und ein G_{ST} über alle Loci von 0,17 festgestellt (SAITBEKOVA et al., 1999). Die auf mtDNA Basis gewonnenen Daten von LUIKART et al. (2001b) ergaben einen Anteil von 11 % für die Variabilität zwischen den Rassen. Die gesamte Diversität der mtDNA innerhalb und zwischen den Rassen war sehr groß und ergab drei divergente Hauptlinien A, B und C, die wiederum 316, acht und sieben mtDNA-Typen umfassten.

ARRANZ et al. (1998) untersuchten spanische Schafrassen an 19 Mikrosatellitenloci und fanden die größte genetische Variation gemessen an der durchschnittlichen Anzahl der Allele

pro Locus in Merinoschafen und die geringste in Awassischafen. Eine weitere Mikrosatelliten-Analyse von seltenen und modernen Schafrassen im Vereinigten Königreich wurde durchgeführt, um eventuelle Zusammenhänge zwischen Populationsgröße und genetischer Diversität aufdecken zu können. Es wurde keine konstante Korrelation zwischen der genetischen Diversität innerhalb einer Rasse und ihrer Populationsgröße gefunden. Abermals wurden hohe Inzuchtkoeffizienten für die einzelnen Rassen beschrieben (BRUFORD, 2004).

PETER et al. (2007) untersuchten die genetische Diversität bei 57 Schafrassen mit 31 Mikrosatellitenmarkern. Es wurden hohe durchschnittliche H_E -Werte über alle Genorte von 0,63 bis 0,77 gefunden. H_O -Werte lagen zwischen 0,58 und 0,75. Desweiteren wurden konstant positive F_{IS} -Werte aller Rassen über alle Loci ermittelt. Die Autoren interpretierten dies als ein Anzeichen für Inzucht und/oder Wahlundeffekte in den Populationen. Die genetische Differenzierung war mit 5,7 % mäßig. Im Rahmen einer Studie von PARISET et al. (2006) wurden 37 SNP-Marker in 30 Individuen von acht dieser 57 Rassen charakterisiert. 32 der SNP-Marker wiesen Frequenzen von über 5 % für das seltenere Allel auf und sind damit geeignet für den Einsatz in populationsgenetischen Studien. Die ermittelten F_{ST} -Werte waren sehr variabel, wobei Werte $> 0,2000$ (bei vier SNP-Markern) rassespezifische Selektion vermuten lassen. Der durchschnittliche F_{ST} -Wert über alle Loci betrug 0,1177. Unter Ausschluss der Marker *MCIR_1* und *MCIR_2* mit den höchsten F_{ST} -Werten von je 0,8200, die dadurch zustande kommen, dass diese SNPs im *MCR1*-Fellfarbengen bei einer Rasse mit sehr hohen Frequenzen (89 %) des seltenen Allels gefunden wurden, während einige Rassen fixiert auf das häufigere Allel sind, beträgt der durchschnittliche Wert nur 0,0777. Es wurden sehr unterschiedliche durchschnittliche erwartete Heterozygotien von 0,0239 bis 0,5000 und beobachtete Heterozygotien von 0,02420 bis 0,4829 für die Genorte gefunden (PARISET et al., 2006).

Einen anderen Ansatz zur Charakterisierung von genetischer Diversität auf Ebene der DNA verfolgte ORDAS (2001). Er untersuchte die spanischen Schafrassen Churra und Manchega auf ihre genetischen Varianten an den vier Kaseingenorten. Um Diversität zwischen ihnen abschätzen zu können, bestimmte er die Verteilung der Kaseingenotypen zwischen den Rassen. Die Genotypen der vier Kaseingene *CSN1S1*, *CSN1S2*, *CSN2* und *CSN3* wurden zur Bildung von Haplotypen herangezogen. Ein hoher Grad an Diversität zwischen den beiden Rassen ergab sich durch die Verteilung einzigartiger Laktotypen, die bei jeweils nur einer der Rassen auftraten. Die Diversität war innerhalb der untersuchten Rasse Manchega größer als bei der Rasse Churra.

MARLETTA et al. (2004) untersuchten die zwei gefährdeten sizilianischen Ziegenrassen Argentata dell' Etna und Girgentana auf Polymorphismen am *CSNIS2*-Genort. Mit dem Ziel, bessere Kenntnisse über die genetische Einzigartigkeit dieser Rassen zu erlangen, wurden Allelfrequenzen für die Allele *CSNIS2**A, B, C/E, und D geschätzt und ein bisher nicht beschriebenes Null-Allel *CSNIS2**O charakterisiert. Eine niedrige genetische Variabilität in Bezug auf die Anzahl identifizierter Allele (3 von 5) wurde für die Rasse Girgentana im Vergleich mit der Rasse Argentata festgestellt.

2.4.2 Charakterisierung genetischer Diversität beim kleinen Wiederkäuer in Asien

YANG et al. (1999) untersuchten fünf einheimische chinesische Ziegenrassen an sechs Mikrosatellitenloci, mit dem Ziel, objektive Kriterien für die Erhaltung seltener Rassen zu entwickeln. Während drei der Rassen eine gemeinsame Gruppe bildeten, ergaben sich für zwei der Rassen im Neighbour-Joining-Dendrogramm eigene Äste, was für deren genetische Einzigartigkeit spricht.

BARKER et al. (2001) analysierten bei elf autochthonen Ziegenrassen aus Südostasien 25 Mikrosatellitenloci und 59 Proteinloci, von denen 16 polymorph waren. Innerhalb der untersuchten Rassen konnten nur geringgradige Unterschiede zwischen den zwei eingesetzten Markersystemen bei der Schätzung von F_{ST} -Werten oder den Exakttests für Populationsdifferenzierung gefunden werden. Der durchschnittliche Inzuchtkoeffizient (F_{IS}) lag bei 0,26 für die Protein- bzw. 0,23 für die Mikrosatellitenloci. Diese durchschnittlichen F_{IS} -Werte sind auch für seltene Rassen außergewöhnlich hoch. Die Autoren sehen in der unkontrollierten Fortpflanzung bei niedrigen Tierzahlen pro Herde die Hauptursache für die hochgradige Inzucht in den lokalen Rassen Asiens. Die Auslöschung, welcher Rasse zum größten Diversitätsverlust führen würde, wurde anhand des „Weitzman diversity trees“ prognostiziert. Eine weitere Studie stellte bei 13 pakistanischen Ziegenrassen eine extrem hohe mtDNA Diversität fest. Bei 44 untersuchten Tieren konnten 159 Mutationen festgestellt werden, die zu 38 verschiedenen Haplotypen führten (SULTANA et al., 2003). Die hohe Variabilität der mtDNA bei asiatischen Rassen konnten auch schon LUIKART et al. (2001) in ihren Untersuchungen feststellen.

2.4.3 Charakterisierung genetischer Diversität beim kleinen Wiederkäuer in Afrika

Es fand eine Reihe von Analysen über die Diversität der Blutproteine und Blutgruppen bei afrikanischen Schafrassen statt. Hierbei waren vor allem die Schafrassen von Interesse, die eine Toleranz gegen die Schlafkrankheit oder andere spezifische Merkmale aufweisen, die

ihnen ihre spezielle Umweltadaptation ermöglichen. CLARKE et al. (1989) untersuchten die afrikanische Fettschwanzschafraße Naquama mit dem Ziel, genetische Diversität abzuschätzen. Die gefundene Variabilität innerhalb der Rasse war sehr niedrig. Ein ähnliches Ergebnis erbrachten auch spätere Untersuchungen, die die Diversität an den Proteinloci kenianischer Rassen im Vergleich mit einer Referenzpopulation von Merinoschafen betrachteten (MWACHARO et al., 2002). Hier war die Variabilität innerhalb und zwischen den Rassen niedrig. Die Analyse der Proteinpolymorphismen zeigte, dass bestimmte Varianten in einigen Rassen fixiert waren, wie dies schon MISSHOU et al. (1999) z. B. für das Hämoglobin B-Allel in den trypanotoleranten Schafrassen von Westafrika beschrieben hatten. Der Grad der mit Hilfe der Proteinpolymorphismen dargestellten genetischen Diversität war sowohl innerhalb als auch zwischen den Rassen niedrig. Die Rassen, bei denen dennoch eine höhere Variabilität festgestellt wurde, sind nach Interpretation der Autoren durch den nomadischen Lebensstil ihrer Züchter geprägt, der zu einem vermehrten Austausch genetischen Materials führt (MWACHARO et al., 2002). Nach STORFER (1996) gibt es keine direkten Beweise, dass die gesamtgenomische Diversität mit der Diversität, die an multiplen Allozymloci abgeschätzt wurde, verbunden ist. Populationen mit niedriger Diversität an Allozymloci können große Variationen auf Ebene der DNA-Marker zeigen.

TADLAOUI OUAFI et al. (2002) untersuchten die zwei wichtigsten marokkanischen Ziegenrassen Draa und Noire-Rahalli an fünf Mikrosatellitenloci und am hoch polymorphen α S1-Kaseingenort (*CSN1S1*) und stellten Vergleiche mit den französischen Rassen (Poitevine, Alpen-, Pyrenäen- und Saanenziegen) an. Die höchsten Diversitätswerte, gemessen an der durchschnittlichen Anzahl der Allele pro Genort, wurden bei den marokkanischen Rassen und bei den am nächsten verwandten französischen Pyrenäenziegen festgestellt.

Eine Analyse der mtDNA von zwölf afrikanischen Schafrassen aus sieben Ländern im Vergleich mit europäischen, neuseeländischen und Haplotypen des Nahen und Mittleren Ostens ergab, dass alle afrikanischen Sequenzen neue Haplotypen darstellen (KIERSTEIN et al., 2002).

2.5 Kaseingene beim Wiederkäuer

2.5.1 Aufbau des Kaseingenclusters

Vier eng gekoppelte Gene kodieren für das α S1-, α S2-, β - und das κ -Kasein und bilden so ein etwa 250 kb umfassendes Cluster (Abbildung 1). Die Struktur und Organisation dieses Clusters wurde bereits für Mensch, Maus und Rind beschrieben; beim Rind konnte der Kaseinort auf dem Chromosom 6 lokalisiert werden. Bedingt durch die enge Kopplung werden die Kaseingene als Genkomplex oder Haplotyp von der Elterngeneration auf die Nachkommen vererbt. (RIJNKELS et al., 1997; THREADGILL und WOMACK, 1990). Der Genort *CSN1S2* wurde 1993 bei Rind, Schaf und Ziege durch Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) auf dem homologen Chromosom 4 kartiert (HAYES et al., 1993), wobei diese Diskrepanz wohl durch eine Umbenennung des früheren Chromosom 6 entstand. Eine aktuelle Genkarte der Ziege führt als Sitz der Kaseingenorte *CSN3*, *CSN1S1* und *CSN1S2* die Position 6q32 auf (URL 8, Acc. No. CH000677, CH000342, CH000604) (SCHIBLER et al., 1998). Beim Schaf gelang die Kartierung eines bereits beim Rind festgestellten Mikrosatelliten (*CSN3*), der sich im Intron 3 des κ -Kaseingens befindet, auf Chromosom 6 (MADDOX et al., 2001). Als Lokalisation für *CSN1S1* beim Schaf wird ebenfalls die Position 6q32 angegeben (SCHIBLER et al., 1998). Die genomische Organisation des Kaseingenortes ist zwischen den Säugetierarten konserviert, wenn es auch Unterschiede in den Distanzen, die die einzelnen Kaseingene voneinander trennen, gibt und die Transkriptionsrichtung der einzelnen Gene verschieden sein kann.

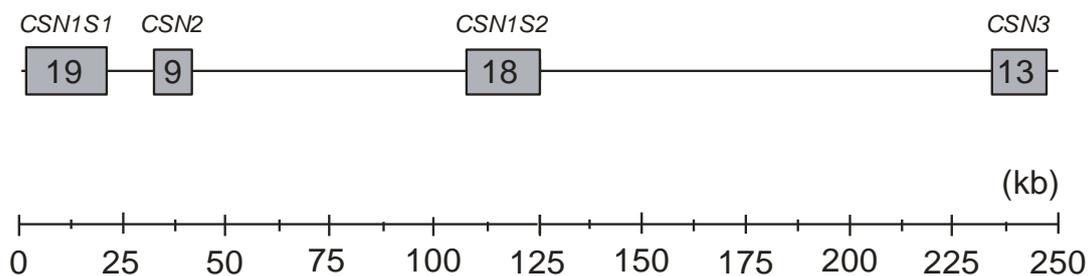


Abbildung 1: Schematischer Aufbau des Kaseingen-Clusters mit Größenangaben in kb für Wiederkäuer (modifiziert nach RIJNKELS et al., 1997).

2.5.2 Das κ -Kaseingen (*CSN3*) beim kleinen Wiederkäuer

2.5.2.1 Struktur und Aufbau

Das κ -Kaseingen der kleinen Wiederkäuer setzt sich, wie in Abbildung 2 dargestellt, aus fünf Exons und vier Introns zusammen. Der Leserahmen entspricht den Exons, d.h. keines der kodierenden Triplets ist von den Exon-Intron-Grenzen unterbrochen, was sich als charakteristisch für die Kaseingene gezeigt hat und bei verschiedenen Spezies beschrieben wurde (RIJNKELS, 2002). Die kodierende Region für das reife Protein liegt im Exon 3 (9 Aminosäuren) und mit dem Hauptanteil im Exon 4 (162 Aminosäuren). Das Exon 2 kodiert für das Signalpeptid und Exon 1 und 5 enthalten die 5' UTR bzw. 3' UTR.

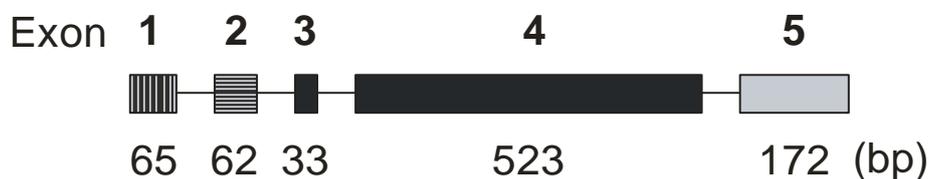


Abbildung 2: Schematischer Aufbau des *CSN3* mit Größenangaben der Exons für die kleinen Wiederkäuer in Anzahl der Basenpaare (Quelle modifiziert nach RIJNKELS *et al.*, 1997).

2.5.3 Vorkommen von genetischen Varianten beim kleinen Wiederkäuer

2.5.3.1 Die *CSN3* Varianten bei der Ziege

Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass neben *CSN1S1*, *CSN1S2* und *CSN2* auch *CSN3* bei der Ziege eine hohe genetische Variabilität aufweist, nachdem man lange Zeit angenommen hatte, dass dieser Genort bei Schaf und Ziege, im Gegensatz zum bovinen *CSN3*, wenig bis gar nicht polymorph sei (CHESSA *et al.*, 2003; JANN *et al.*, 2004). Obwohl MERCIER *et al.* (1976) bereits zwei Varianten des κ -Kaseins auf Proteinebene beschrieben haben und die Nukleotidsequenz des κ -Kasein-Gens 1993 veröffentlicht wurde (COLL *et al.*, 1993), folgte die Charakterisierung von genetischen Varianten auf Ebene der DNA erst 2001 durch verschiedene Arbeitsgruppen. Anhand von PCR-RFLP (YAHYAOUUI *et al.*, 2001) bzw. PCR-SSCP-Analysen (CAROLI *et al.*, 2001) konnten die vier Allele, die nach der heute gültigen Nomenklatur (Stand 2007) als *CSN3*A*, *B*, *C'* und *D* bezeichnet werden, differenziert werden. Die zugehörigen Gendatenbankeinträge und alle folgenden können der Tabelle 3 entnommen werden. CAROLI *et al.* (2001) zeigten in dieser Untersuchung die genetischen Polymorphismen, die den von DI LUCCIA *et al.* (1990) mit Hilfe isoelektrischer Fokussierung dargestellten κ -Kaseinvarianten A^{IEF} und B^{IEF} zugrunde liegen, auf und fanden niedrige

bis mittlere Allelfrequenzen (1 % (Thüringer Waldziege) bis 37 % (Orobica)) für die allele Variante B^(IEF) in italienischen und deutschen Ziegenrassen.

Das seltene *CSN3**C' wurde bisher in erster Linie in französischen Saanenziegen mit Allelfrequenzen von 11 % bei 33 untersuchten Tieren gefunden, während in anderen Rassen Allelfrequenzen für *CSN3**C' um die 1 % geschätzt wurden (YAHYAOUÏ et al., 2003).

Acht weitere Allele wurden seitdem in verschiedenen europäischen Ziegenrassen beschrieben (ANGIOLILLO et al., 2002; JANN et al., 2004; YAHYAOUÏ et al., 2003). Durch die Charakterisierung dieser beachtlichen Anzahl an Allelen, die zeitgleich in verschiedenen europäischen Instituten gelang, entstand Diskussionsbedarf bezüglich einer eindeutigen, sinnvoll überarbeiteten Nomenklatur (CHESSA et al., 2003; PRINZENBERG et al., 2005). Ergebnis dieser Überlegungen war, zum einen mit der Benennung der Häufigkeit des Auftretens der Varianten gerecht zu werden, zum anderen möglichst chronologisch ihrer Charakterisierung zu folgen. Weiterhin einigte man sich, den Proteinvarianten Buchstaben des Alphabetes zuzuordnen, während zusätzliche stille Mutationen durch Anfügen eines Apostrophs ausgedrückt werden sollten.

Es erfolgte daraufhin die Umbenennung der Variante *CSN3**B mit der Zugangsnummer AY027868 in *CSN3**D und analog ihrer synonymen Varianten *CSN3**D'/D'' aus JANN et al. 2004 in *CSN3**B'/B''. Die Zugangsnummer AY166708 *CSN3**F wurde in *CSN3**L umbenannt, da *CSN3**F schon durch die Variante mit der Zugangsnummer AY090466 in Nutzung ist, die YAHYAOUÏ et al. sowohl bei *Capra pyrenaica* als auch bei spanischen *Capra hircus* Rassen nachweisen konnte (2003). In dieser Arbeit wird die aktuell geltende Nomenklatur angewendet, auch wenn diese in der zitierten Literatur entsprechend noch nicht existiert hat. Das Ergebnis der geänderten Nomenklatur kann der Tabelle 3 entnommen werden.

Die von JANN et al. (2004) beschriebenen Allele *CSN3**B'', I, J und K konnten bei der Rasse Bunte Deutsche Edelziege durch Sequenzanalyse festgestellt werden. *CSN3**B' wurde von derselben Arbeitsgruppe bei einer afrikanischen Ziege der Rasse Red Sokoto sequenziert, während *CSN3**L in zwei türkischen Ziegen der Rasse Angora/Yerköy charakterisiert werden konnte. Das Allel *CSN3**E wurde von ANGIOLILLO et al. (2002) charakterisiert und tritt exklusiv bei Ziegen der Rasse Montefalcone auf.

YAHYAOUÏ et al. (2003) charakterisierten die Varianten *CSN3**G und F in den italienischen Rassen Teramana, Girgentana und Sarda. Die höchsten Allelfrequenzen für *CSN3**F fand er bei den Wildziegen *Capra pyrenaica* mit 98 %.

Allelfrequenzen für *CSN3** Allele aus den angesprochenen Publikationen können der Tabelle 2 entnommen werden.

Tabelle 2: *CSN3* Allelfrequenzen aus den Veröffentlichungen von YAHYAOUÏ et al. (2001, 2003) und ANGIOLILLO et al. (2002) bei spanischen (SP), italienischen (IT) und französischen (FR) Ziegenrassen. Nicht typisierte Allele sind grau unterlegt, während das Fehlen einer Variante in einer Rasse mit einem – dargestellt wurde.

Hausziegenrassen	n	A +B	C [^]	D	E	F	G	
Malaguena SP	17	1	-					
Payoya SP	11	1	-					
Canaria SP	48	0,99	0,01					
Murciano-Granadia SP	38	0,99	0,01					
Saanen FR	33	0,89	0,11					
(YAHYAOUÏ et al. 2001)								
Hausziegenrassen	n	A	B	C [^]	D	E	F	G
Montefalcone IT	62					0,16		
Teramana IT	31					-		
Garganica IT	28					-		
Girgentana IT	27					-		
Sarda IT	25					-		
Cilenta nera IT	28					-		
Alpine FR	11					-		
Saanen FR	12					-		
Canaria SP	23					-		
Murciano-Granadia SP	25					-		
(ANGIOLILLO et al. 2002)								
Hausziegenrassen	n	A	B	C [^]	D	E	F	G
Murciano-Granadia SP	30	0,37	0,63	-	-	-	-	-
Malaguena SP	11	0,45	0,55	-	-	-	-	-
Canaria SP	30	0,58	0,42	-	-	-	-	-
Teramana IT	28	-	0,70	0,02	0,10	-	0,14	0,04
Montefalcone IT	17	-	0,59	-	-	0,41	-	-
Girgentana IT	19	0,34	0,45	-	0,05	-	0,05	0,11
Sarda IT	19	0,31	0,61	-	-	-	0,08	-
Alpine FR	28	0,34	0,66	-	-	-	-	-
Saanen FR	28	0,39	0,48	0,13	-	-	-	-
<i>Capra pyrenaica</i>	23	-	0,02	-	-	-	0,98	-
(YAHYAOUÏ et al. 2003)								

Über die Berechnung des Isoelektrischen Punktes aller charakterisierter DNA-Varianten das *CSN3* gelang PRINZENBERG et al. die Zuordnung der Allele zu den von DI LUCCA et al. dargestellten κ -Kaseinvarianten A^(IEF) und B^(IEF) (2005 bzw. 1990). So können der Proteinvariante B^(IEF) nicht wie bisher angenommen nur *CSN3*D*, sondern zusätzlich auch *CSN3*E* und *K* zugrunde liegen. Alle anderen genetischen Varianten führen zu A^(IEF).

Zu Beginn dieser Studie in 2002 waren 13 polymorphe Positionen im caprinen κ -Kaseinigen beschrieben, die die Identifikation von 14 genetischen Varianten und 11 korrespondierenden Protein-Varianten ermöglichen. Die dazugehörigen Gendatenbankzugangsnummern können der Tabelle 3 entnommen werden.

Tabelle 3: Gendatenbankeinträge für Nukleotidsequenzen des caprinen κ -Kaseingens und die Nomenklatur der Allele von 2003 und nach ihrer Änderung (Stand von 2007) PRINZENBERG et al., 2005).

Zugangsnummer	Datum	Sequenz/ Länge	Veröffentlichung	<i>CSN3</i> 2003	<i>CSN3</i> 2007
X 60763	17/02/94	cDNA 826bp	COLL et al. 1993	A	A
AF434987	27/12/01	Genom. DNA 477 bp	FELLIGNI et al. 2002	A	A
AY027868	22/02/01	Genom. DNA 498 bp	CAROLI et al. 2001	B	D
AY090465	18/03/02	Genom. DNA 494 bp	YAHYAOUUI et al. 2001	D	D
AY1667	01/10/03	Genom. DNA 486 bp	JANN et al. 2003	D'	B'
AY1667	01/10/03	Genom. DNA 486 bp	JANN et al. 2003	D''	B''
AF485341	20/02/02	Genom. DNA 494 bp	YAHYAOUUI et al. 2001	C	C'
AF434988	16/10/01	Genom. DNA 477 bp	FELLIGNI et al. 2002	B	D
AF485340	20/02/02	Genom. DNA 494 bp	YAHYAOUUI et al. 2001	B	B
AF486523	22/02/02	Genom. DNA 494 bp	ANGIOLILLO et al. 2002	E	E
AY090467	18/03/02	Genom. DNA 494 bp	YAHYAOUUI et al. 2003	G	G
AY090466	14/08/03	Genom. DNA 494 bp	YAHYAOUUI et al. 2003	F	F
AF521022	01/10/03	Genom. DNA 510 bp	JANN et al. 2003	H	H
AY166710	01/10/03	Genom. DNA 486 bp	JANN et al. 2003	I	I
AY166711	01/10/03	Genom. DNA 486 bp	JANN et al. 2003	J	J
AY166709	01/10/03	Genom. DNA 486 bp	JANN et al. 2003	K	K
AY166708	01/10/03	Genom. DNA 486 bp	JANN et al. 2003	F	L

2.5.3.2 Das κ -Kasein-Gen (*CSN3*) beim Schaf

Im Gegensatz zur Ziege und auch zum Rind haben die Untersuchungen beim Schaf ein monomorphes Erscheinungsbild des *CSN3* ergeben (MOIOLI et al., 1998). Die Gendatenbankeinträge für *CSN3* beim Schaf befinden sich in Tabelle 4.

Während auf Proteinebene keine Variationen gefunden wurden (MOIOLI et al., 1998), konnte durch eine RFLP-Analyse mit den Endonukleasen *Pvu* I, *Hind* 3, *Pst* I und anschließendem Southern-Blot mit bovinen bzw. ovinen κ -Kasein cDNA-Proben heterozygot auftretende Restriktionsstellen gezeigt werden, die auf das Auftreten verschiedener κ -Kasein Allele hinweisen, allerdings nicht näher charakterisiert wurden (GREGORIO et al., 1991; LEVEZIEL et al., 1991).

Tabelle 4: Gendatenbankeinträge für Nukleotidsequenzen des ovinen κ -Kaseingens

Zugangsnummer	Datum	Sequenz/ Länge	Veröffentlichung/Genbankeintrag
X51822	12/09/93	cDNA linear 854bp	Furet et al. 1990
AF165792	29/08/01	Genom. DNA 497bp	Matthee et al. 2001
L31372	28/03/94	cDNA linear 1234 bp	Spira et al. 1994
U84256	13/02/97	c DNA linear 300 bp	Woolard et al. 1997

2.5.3.3 Struktur und Funktion des Genproduktes

Das κ -Kasein (κ -CN) von Ziege und Schaf umfasst 171 Aminosäuren. Die Aminosäuresequenzen der beiden Spezies unterscheiden sich an 8 Positionen, wobei beide über ein zusätzliches Dipeptid im CMP verfügen, das bei anderen Spezies nicht beschrieben ist (MERCIER et al., 1976).

Das κ -CN ermöglicht die Formation und Stabilisierung der Milchmizelle und bestimmt dadurch ihre Größe und Funktion. Während man von den Kalzium-sensitiven Kaseinen annimmt, dass sie sich v. a. im Inneren der Mizellen befinden, ist das κ -CN in erster Linie an der Oberfläche lokalisiert. Sein N-terminales Ende ist in Interaktionen mit den anderen Kaseinen involviert und das C-terminale Ende stellt aufgrund seiner negativen Ladung die Hauptkomponente der äußeren Schicht der Mizelle dar (GUTIÉRREZ-ADÁN et al., 1996).

Von den anderen Kaseinen unterscheidet sich das κ -CN weiterhin durch seine Löslichkeit selbst über eine breite Spanne verschiedener Kalziumkonzentrationen hinweg und durch seine hydrophile, teilweise glykosylierte C-terminale Region (YAHYAOUI et al., 2003). Die Phosphorylierung der Aminosäuren Serin und Threonin findet posttranskriptional im Golgiapparat statt und betrifft v. a. die C-terminale Region des κ -CN. Dabei handelt es sich eher um einzel-

ne phosphorylierte Positionen als um Cluster, wie sie bei anderen Kaseinen vorliegen. Die Phosphorylierung kann durch eine vorhergehende Glykosylierung an den beschriebenen Positionen oder in deren Nähe verhindert werden. Daraus ergibt sich, dass das κ -CN Kalzium nicht im selben Maße bindet wie die anderen Kaseine und dass seine Löslichkeit dementsprechend durch dieses Ion nicht maßgeblich beeinflusst wird (SWAISGOOD, 1992).

Die Spaltung der labilen Peptidbindung zwischen den Aminosäuren 105 und 106 (Phe¹⁰⁵-Met¹⁰⁶) des κ -CN-Proteins durch Chymosin oder Rennin leitet den Koagulationsvorgang ein. Die Primärstruktur dieses Abschnittes ist zwischen den verschiedenen Säugetierspezies konserviert, wobei man die CMPs der Spezies auf Basis ihrer Hydrophobizität, des Kohlehydratgehalts, der Aminosäuresequenz und der Position der Spaltung in zwei Gruppen einteilen kann (MERCIER et al., 1976). Bei Rind, Schaf, Ziege, Okapi, Giraffe, Wasserbüffel u. a. ist die labile Peptidbindung durch die bereits erwähnte Phe-Met Bindung charakterisiert, während in der Gruppe, die Mensch, Kamel, Schwein, Maus und Ratte umfasst, Phe-Leu oder Phe-Ile Bindungen zu finden sind. Nach der proteolytischen Spaltung entstehen ein lösliches, hydrophiles Glykopeptid, das Kaseinomakropeptid (CMP 106-169), und ein unlösliches Peptid, das Para- κ -Kasein (Para- κ -CN) (MERCIER et al., 1973). Während man nur wenig über die Bedeutung des Para- κ -CN weiß, ist das CMP für die Koagulation der Milch verantwortlich. Der Koagulationsprozess der Milch ist eine wichtige Voraussetzung für die Verdaulichkeit der Milch für den Neonaten, weil durch die Koagulation die Magenpassage verlängert und eine bessere Aufnahme der Nährstoffe ermöglicht wird (MERCIER et al., 1976). Außerdem wird eine Verhinderung von Hypersensitivitätsreaktionen des Säuglings gegen aufgenommene Proteine und eine Inhibierung gastrischer Pathogene, wie z. B. *Helicobacter pylori*, durch das CMP postuliert (WARD et al., 1997).

In einer Studie von MALKOSKI et al. (2001) konnte eine wachstumshemmende Aktivität des bovinen CMP gegen weitere pathogene Keime demonstriert werden. Das durch die proteolytische Spaltung im Rahmen der Verdauung des κ -CN in Kuhmilch entstandene CMP konnte als bioaktives Peptid identifiziert werden. Die Wirkungsweise solcher bioaktiven Peptide ist sehr vielseitig und umfasst antithrombotische, antihypertensive, immunstimulierende und opioidale Aktivitäten (MALKOSKI et al., 2001).

Der Ausfällungsprozess der Milch ist außerdem bei der Käseherstellung von zentraler Bedeutung. Unterschiede in der Aminosäuresequenz des κ -CN können die Geschwindigkeit der Ausfällung und die Festigkeit des Käsebruchs beeinflussen (LODES et al., 1996).

Während es bei der Ziege für die verschiedenen Varianten der kalziumsensitiven Kasein detaillierte Informationen über Assoziationen mit Proteingehalt und Milchmenge gibt, sind derartige Zusammenhänge mit κ -Kasein-Varianten noch wenig untersucht. Besonders am Genort *CSN1S1* konnten bei der Ziege und beim Schaf Allele charakterisiert werden, die sich für die Milch- und Käseproduktion als günstiger bzw. ungünstiger erwiesen haben (GROSCLAUDE und MARTIN, 1997; MARTIN, 1993; MARTIN et al., 2002; MOIOLI et al., 1998; PIRISI et al., 1999). Es wurden an den verschiedenen caprinen Kaseingenorten (*CSN1S1*, *CSN1S2* und *CSN2*) Null-Allele beschrieben, deren Auftreten mit einer verringerten oder fehlenden Expression der jeweiligen Proteinvarianten assoziiert ist. Beim Schaf wurden Zusammenhänge zwischen der so genannten ‚Welshvariante‘ am *CSN1S1* und niedrigen Proteingehalten gefunden (PIRISI et al., 1999).

Beim Rind wurden bereits eine Vielzahl von Assoziationsstudien, die Zusammenhänge zwischen κ -Kaseingenotyp und verschiedenen Leistungs- und Milchqualitätsmerkmalen untersuchten, durchgeführt (ALEANDRI et al., 1990; FREYER et al., 1999; NG-KWAI-HANG et al., 1986). Trotz verschiedener Widersprüche in der Literatur über die Auswirkung der κ -Kaseinvarianten auf die Zusammensetzung von Kuhmilch, hat sich konstant gezeigt, dass die bovine Variante B mit signifikant höherer Proteinmenge und einem höheren Kasein/Molkeprotein Verhältnis assoziiert ist. Dies hat wiederum grundlegende Auswirkungen auf die technologischen Eigenschaften der Milch (NG-KWAI-HANG, 1997). So konnte mit Hilfe von Assoziationsstudien gezeigt werden, dass Milch des Genotyps BB einen höheren Käseertrag erbringt als AA oder AB Milch (ERHARDT et al., 1996; PAGNACCO und CAROLI, 1987). Die besseren Verarbeitungseigenschaften resultieren aus der größeren Hitzestabilität, der Ausfällungszeit und der Festigkeit des Käsebruchs, die wiederum mit der Mizellengröße in Zusammenhang gebracht werden konnten. DEBELJAK et al. (2000) untersuchten die Expression der κ -Kasein mRNA und fanden die entsprechenden Unterschiede zwischen den Genotypen.

Erste Assoziationsstudien zwischen verschiedenen κ -Kaseingenotypen, dem Proteingehalt und der Käsereitauglichkeit von Ziegenmilch, die funktionelle oder qualitative Auswirkungen identifizieren, haben gezeigt, dass auch hier hoch signifikante Effekte existieren. So konnten CHIATTI et al. (2007) zeigen, dass das Vorliegen der Proteinvariante B und damit das bei der italienischen Rasse Orobica zugrunde liegende Allel *CNS3*D* zu hoch signifikanten Effekten auf den Protein- und den Kaseingehalt führt (CHIATTI et al., 2007)

2.5.4 Untersuchungen von κ -Kaseingenvarianten im Rahmen von Evolutionsstudien beim Wiederkäuer

Eine vergleichende Analyse von Nukleotidsequenzen am *CSN3* ergab Hinweise auf starke positive Selektionseinflüsse innerhalb der Familie *Bovidae* (WARD et al., 1997a). Aufgrund der wichtigen Rolle des κ -Kaseins bei physiologischen Prozessen (s. Kapitel 2.5.3.3) hielten die Autoren die zuvor von GATESY et al. (1996) aufgestellte Theorie eines streng neutralen Evolutionsmodells für diesen Genort für unwahrscheinlich. Eine getrennte Betrachtung des CMP und des Para- κ -CN erfolgte, da ein unterschiedlicher Selektionsdruck auf die im Darm in zwei unabhängige Peptide gespaltenen Proteine zu erwarten war. Mit Hilfe des Vergleichs der Anzahl von Nukleotidaustauschen im Intron 4 mit der im Exon 4 gefundenen, konnte eine 34 Kodon umfassende Region im CMP identifiziert werden, deren Sequenz sich anomal entwickelt hat. Ein signifikant höherer Anteil an Divergenz zwischen den Nukleotidsequenzen wurde von WARD et al. (1997) ermittelt, während im Para- κ -Kasein eine dem Intron 4 entsprechende Divergenz dargestellt werden konnte. Die Autoren postulieren einen beschleunigenden Einfluss positiver Selektion auf die Divergenz der kodierenden Sequenz zwischen entfernt verwandten boviden Taxa. Sie stellten außerdem einen gesteigerten Anteil an nicht synonymen Basenaustauschen (Dn) in einer spezifischen Region des CMPs fest. Bei nah verwandten Taxa war die Anzahl der Nukleotidaustausche zu gering, um statistisch signifikante Unterschiede zwischen dem Anteil an synonymen Austauschen (Ds) und den nicht synonymen Austauschen (Dn) feststellen zu können. Selektive „Sweeps“ können den Autoren zu Folge den Level an neutraler Variation in der Nähe eines unter dem Einfluss positiver Selektion stehenden Genortes erniedrigen. Für engverwandte Taxa wird angenommen, dass „reinigende“ Selektion zur Konservierung der gleichen optimalen Allele führt. Es wurde ein niedriger Level an Polymorphismen im CMP innerhalb einer Spezies festgestellt.

Die hohe Variabilität im Exon 4 des *CSN3* von einigen Wiederkäuern, z.B Rind und Ziege, kann für die Rekonstruktion phylogenetischer Bäume genutzt werden (CHIKUNI et al., 1995; CRONIN et al., 1996). In den Studien konnte u. a. gezeigt werden, dass innerhalb der Familie der *Bovidae* die Subfamilie *Bovinae* und *Caprinae* und innerhalb dieser Subfamilie *Capra hircus* und *Ovis aries* monophyletischen Ursprungs sind. CRONIN et al. postulieren zum einen, dass Sequenzanalysen des κ -Kaseins zur Einschätzung phylogenetischer Zusammenhänge in erster Linie auf und über dem Familien- und Subfamilienlevel aufgrund der etwas langsameren Evolutionsrate im Vergleich mit mtDNA geeignet sind. Zum anderen betrachten sie Allelfrequenzverteilungen des κ -Kaseingens auch als Hilfsmittel, um populationsgenetische

und züchterische Strukturen aufdecken zu können. Phylogenetische Bäume, die allein auf mtDNA Basis beruhen, können nur die Verwandtschaft der maternalen Linien widerspiegeln. Potentielle männliche Introgression bleibt somit unentdeckt. Daher ist die zusätzliche Betrachtung autosomaler Gene, die eine relativ hohe Evolutionsrate aufweisen, zur Rekonstruktion phylogenetischer Zusammenhänge sinnvoll (CHIKUNI et al., 1995).

Weitere Studien nutzten die hohe Variabilität des caprinen *CSN3* zur Analyse phylogenetischer Zusammenhänge zwischen verschiedenen Wildziegenarten und der Hausziege (*Capra hircus*) und innerhalb von *Capra hircus*. So untersuchten JANN et al. (2003) *Capra aegagrus*, *Capra ibex ibex*, *Capra ibex sibirica* und verschiedene *Capra hircus* Populationen am *CSN3*, um nähere Informationen zum Domestikationsprozess zu erlangen. Das Allel, das innerhalb der Studie bei domestizierten Ziegen am häufigsten auftrat (*CSN3*B*), kam ebenfalls bei der Wildziege *Capra aegagrus* (Bezoarziege) vor. Dies wurde als Hinweis darauf gewertet, dass ein genetischer Austausch stattgefunden hat oder dass gemeinsame Vorfahren existieren. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass eine Gruppe von *CSN3* Varianten von *Capra hircus* phylogenetisch älter sein müsse als andere, da sie eine größere Übereinstimmung mit der Sequenz von *Ovis aries* aufwies. Andere Autoren fanden zusätzlich übereinstimmende *CSN3* Allele (*CSN3*F*) zwischen *Capra hircus* und spanischen Wildziegen *Capra pyrenaica* (YAHYAOUÏ et al., 2003).

Neuere Untersuchungen widmen sich verstärkt der Untersuchung von Haplotypen des Kaseingenenkomplexes um die evolutionäre Entwicklung der gesamten Region zu erfassen (CAROLI et al., 2006; CAROLI et al., 2007). Die Autoren beschreiben die Phylogenie des *CSN3* als komplex und vermuten als Ursache hierfür intragene Rekombinationen ähnlich wie bei *CSN1S1* (CAROLI et al., 2006). Es wird ein Evolutionsmodell vorgeschlagen, dass vom Haplotyp *CSN1S1*B-CSN2*A-CSN1S2*A-CSN3*B* als Startpunkt ausgeht. Hohe Frequenzen in einigen der bisher untersuchten Rassen Afrikas und Europas sprechen für die These.

2.6 Interleukin-2-Gen beim kleinen Wiederkäuer

2.6.1 Lokalisation und Struktur bei Schaf und Ziege

Das Interleukin-2-Gen (*IL2*) des Schafes konnte durch eine FISH-Analyse auf dem Chromosom 17 lokalisiert werden (LÜHKEN et al., 2002). Die Genkarte der Ziege (URL 8) gibt für den Genort *IL2* die Position 17q22 auf dem caprinen Genom an und referiert eine homologe Position beim Schaf (SCHIBLER et al., 1998).

IL2 setzt sich bei den kleinen Wiederkäuern aus vier Exons und drei Introns zusammen und umfasst insgesamt 4815 bp (LÜHKEN et al., 2000).

2.6.2 Mutationen in translatierten Genabschnitten

Im Exon 1 des Interleukin-2-Gens ist eine Transition (A/G) an Position 318 (Genbank Zugangsnummer AF287479) beschrieben. Dieser Austausch führt nicht zu einer Änderung der Aminosäuresequenz des Zytokins. Die bei LÜHKEN et al. (2000) geschätzten Allelfrequenzen für das A-Allel (Guanin an Position 318) lagen für Merinolandschafe bei 0,60 und bei Rhönschafen bei 0,38.

2.6.3 Mutationen in nicht translatierten Genabschnitten

Beim Schaf wurde im Intron 3 ein C/T Austausch an Position 3404 des Interleukingens (Zugangsnummer AF287479) charakterisiert (LÜHKEN et al., 2002). Hierbei wurde für das C-Allel (Cytosin an Position 3404) bei Merinolandschafen Allelfrequenzen von 0,60 geschätzt. Von der gleichen Arbeitsgruppe wurde ein weiterer SNP im Intron 2 charakterisiert. Es handelt sich ebenfalls um einen C/T Austausch an Position 446 von *IL2*. Die charakterisierten Abschnitte des *IL2* können der Tabelle 5 entnommen werden.

Tabelle 5: Charakterisierte Abschnitte des *IL2*, die in der Gendatenbank zugänglich sind.

Zugangsnummer	Datum	Länge/ Sequenz	Autor/Veröffentlichung
X55641	Mai 1992	468bp/ cDNA	SEOW et al. 1990
X53934	März 1995	576bp/ cDNA	GOODALLI et al. 1990
X60148	Februar 1996	408bp/ cDNA	BUDJOSO et al.1995
AF213883	August 2001	500bp/ part. Cds	LÜHKEN et al. 2000
AF215687	August 2001	500bp/ part. Cds	LÜHKEN et al. 2000
AF287479	Oktober 2002	4815bp/ compl. Cds	LÜHKEN et al. 2000

2.6.4 Bedeutung genetischer Varianten in immunmodulatorisch wirksamen Zytokinen des spezifischen Abwehrsystems

2.6.4.1 Aufgaben und Funktion des Interleukin-2

Interleukin-2 ist ein funktionelles, in erster Linie immunregulatorisches Zytokin, dessen biologische Effekte über spezifische Rezeptoren an die Zielzelle vermittelt werden. Hierfür spielt die tertiäre Struktur des Moleküls die entscheidende Rolle (ZELUS et al., 2000). Innerhalb der Zytokine gehört Interleukin-2 zu der Untergruppe der Lymphokine. Das

proinflammatorisch wirksame Interleukin-2 wird von TH-1-Lymphozyten nach Aktivierung durch Antigene, andere Zytokine und verschiedene unspezifische Mitogene, wie z. B. Phytohemagglutinine oder Neuraminidasen, sezerniert (ZELUS et al., 2000).

Im Besonderen wird die Proliferation der verschiedenen Untergruppen der T-Lymphozyten angeregt, die Sekretion von anderen Lymphokinen stimuliert und die Zytotoxizität der natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen) und der Makrophagen verstärkt. Die B-Lymphozyten werden aktiviert und so die Immunglobulinsynthese forciert (LAGOO et al., 1990). Hierin zeigt sich, dass die Interleukin-2-Produktion sowohl für die humorale als auch für die zellvermittelte Immunität von entscheidender Bedeutung ist. KNEITZ et al. (1995) zeigten, dass bei einem Mangel bzw. in Abwesenheit von Interleukin-2 bei reifen T-Lymphozyten die Apoptose eingeleitet, und so die Homöostase des Immunsystems gewährleistet wird. Bei ‚IL2-Knock-out‘-Mäusen wirkt sich der Wegfall dieses bisher als hauptsächlich proliferationsstimulierenden beschriebenen Zytokins widersprüchlich aus (SADLACK et al., 1994). Während die Entwicklung der Mäuse und ihres Immunsystems zunächst unerwartet normal verläuft, sterben etwa 50 % noch vor Erreichen der 6. Lebenswoche an einer autoimmunen hämolytischen Anämie (THEZE et al., 1996). Die Überlebenden erkranken an einer fatalen autoimmunen Dickdarmerkrankung, die vergleichbar mit der ulzerativen Colitis beim Menschen ist. Statt der erwarteten grundlegenden Immundefizienz bei ‚IL2-Knock-out‘-Probanden, entwickeln sich also bekannte pathologische Erscheinungen, die auf einer unkontrollierten T-Zell-Aktivierung und autoimmunen Reaktionen basieren. KNEITZ et al. (1995) fanden Hinweise darauf, dass die T-Zellen der IL2-defizienten Mäuse negative Signale, die zu einer Beendigung der Immunreaktion führen würden, nicht vermittelt bekamen. Nachdem sie die T-Zellen mit einem Superantigen behandelt hatten, konnten diese nicht in einen anergischen Zustand zurückkehren, da der Wiederabbau bestimmter Rezeptoren an der Zelloberfläche fehlschlug bzw. nicht stattfand.

2.6.4.2 Einfluss von genetischen Varianten im Interleukin-2-Gen beim Menschen

Es wird angenommen, dass Polymorphismen in Zytokingenen die immunologische Reaktivität modulieren, indem sie z. B. die Proteinproduktion (HOFFMANN et al., 2001) oder die Rezeptorbindungsaffinität beeinflussen (CHANG et al., 1995). Es wurden verschiedene Punktmutationen im humanen Interleukin-2-Gen gefunden. Zwei dieser Mutationen führen zu einem Threonin-Prolin-Aminosäureaustausch an zwei Positionen im Protein. Diese Veränderung führt zu einer um das zehnfache niedrigeren Rezeptorbindungsaffinität bei

geringgradig erniedrigter Bioaktivität (CHANG et al., 1996). Ein Polymorphismus in der Promotorregion des Interleukin-2-Gens zeigte in Assoziationsstudien signifikante Zusammenhänge zwischen den Genotypen mit erhöhter Interleukin-2 Expression in den Lymphozyten des peripheren Bluts und der Wahrscheinlichkeit an Multipler Sklerose zu erkranken (MATESANZ et al., 2004). Ähnliche Zusammenhänge konnten auch für die Entwicklung periodontaler Erkrankungen bei den verschiedenen Genotypen gezeigt werden (SCAREL-CAMINAGA et al., 2002). Es handelt sich hierbei um transkriptionale Effekte des Polymorphismus, die sich in einer veränderten Expression des Interleukin-2 widerspiegeln. Davon abgeleitet wurden die verschiedenen Genotypen als Interleukin-2 „high producer“ und „low producer“ bezeichnet.

In der Transplantationsmedizin wurden Zusammenhänge der Interleukin-2 ‚high and low producer‘ Genotypen mit der Häufigkeit der Ausbildung einer akuten Graft-Versus-Host-Erkrankung (AGVHD) gefunden (MORGUN et al., 2003). MORGUN et al. zeigten, dass beim „high producer“ Genotyp GG ein größeres Risiko an einer AGVHD zu erkranken besteht als bei dem „low producer“ Genotyp TT. Allerdings konnten sie diesen Nachweis nur für Patienten nach einer Nierentransplantation aufzeigen, während dies bei den untersuchten Probanden nach einer Herztransplantation nicht gelang.

Kombinationen mit Polymorphismen anderer Interleukine in einer klinischen Studie zeigten signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen und ihrer phänotypischen Fitness (HOFFMANN et al., 2001).

2.6.4.3 Einfluss genetischer Varianten des *IL2* auf die Fitness bei Tieren

Bei Hühnern wurde ein Polymorphismus in der Promotorregion des *IL2* gefunden und auf Zusammenhänge mit der Antikörperproduktion untersucht. Während für den *IL2*-Polymorphismus alleine keine signifikanten Effekte auf die Antikörperbildung gezeigt werden konnten, gelang dies für die Interaktion eines Interferon- γ -Promotor-Polymorphismus mit dem *IL2*-Polymorphismus (ZHOU und LAMONT, 2003).

Bei einer weiteren Kandidatengenstudie zur genetischen Krankheitsresistenz beim Geflügel konnten unter anderem signifikante Effekte von *IL2*-Polymorphismen auf die Erregerbürde in Leber und Blinddarm nach einer künstlichen *Salmonella enteritidis* Infektion nachgewiesen werden (KRAMER et al., 2003). Die Studie zeigte gleichzeitig deutlich die polygene Natur einer Krankheitsresistenz gegen Salmonelleninfektionen, indem auch Assoziationen zu anderen Genen mit immunologischer Wirkung gefunden wurden.

2.6.4.4 Evolution des *IL2* beim Wiederkäuer

Eine Studie, die sich mit der Evolution des *IL2* beim Säugetier befasst hat, beschreibt eine positive Selektion auf diesen Genort innerhalb der Wiederkäuer (ZELUS et al., 2000). Es konnte eine sehr hohe Substitutionsrate des *IL2* im Vergleich zu Genen ohne Immunfunktion innerhalb der Klasse *Mammalia* dargestellt werden, wobei die Rate der nicht synonymen Substitutionen bei der Unterordnung Wiederkäuer (*Ruminantia*) besonders hoch war. Dies könnte den Autoren zu Folge ein Hinweis auf schnelle adaptive Selektion über eine kurze, evolutionäre Periode durch einen wichtigen Zusammenhang von Struktur und Funktion des Genprodukts sein. Sie vermuten weiterhin, dass die Immunantwort von Säugetieren trotz globaler Ähnlichkeit hauptsächlich auf Ebene der zytokinvermittelten Regulation nicht identisch ist. Mit Hilfe des Verhältnisses von nicht synonymen Austauschen zu nicht synonymen Austauschpositionen (K_a) mit synonymen Austauschen zu möglichen synonymen Austauschpositionen (K_s) ($K_a:K_s$ Verhältnis) wurde der Einfluss adaptiver Selektion auf diesen Genort bei Wiederkäuern detektiert. Adaptive Selektion wird dann angenommen, wenn K_a den Wert von K_s übersteigt, während im Gegensatz dazu, sobald die Aminosäuresequenz für die biologische Funktion benötigt wird, K_s größer ist als K_a (GRAUR und LI, 2000). Aus ihren Ergebnissen schließen die Autoren, dass wahrscheinlich während einer transienten Periode positive Selektion vor der Trennung der verschiedenen Arten der *Ruminantia* wirkte und dass diese selektiven Kräfte dann verloren gingen oder schwächer wurden (ADAMS und PARHAM, 2001).

3 Material und Methoden

3.1 Probenmaterial

3.1.1 Proben zur Entwicklung eines PCR-SSCP-Protokolls zur Analyse des κ -Kaseingens bei der Ziege

Zur Etablierung des PCR-SSCP-Protokolls standen die in Tabelle 6 aufgeführten sequenzierten Standardproben zur Verfügung:

Tabelle 6: Sequenzierte Standardproben mit Rassezuordnung und veröffentlichter Referenz.

CSN3* Allele	Rasse	Veröffentlichte Referenz
A	BDE (Bunte Deutsche Edelziege)	(JANN et al., 2004)
B	BDE	(JANN et al., 2004)
B'	African Dwarf Goat	(JANN et al., 2004)
B''	BDE	(JANN et al., 2004)
D	BDE	(JANN et al., 2004)
I	BDE	(JANN et al., 2004)
J	BDE	(JANN et al., 2004)
K	BDE	(JANN et al., 2004)
L	Yerköy	(JANN et al., 2004)
H	Malaysian goat	(JANN et al., 2004)
C	Saannenziege	(YAHYAOUÏ et al., 2001)
E	Montefalcone	(ANGIOLILLO et al., 2002)
F	Teramana	(YAHYAOUÏ et al., 2003)
G	Italienische Rasse	-

3.1.2 Proben für die Untersuchung der genetischen Diversität innerhalb und zwischen den Rassen

Es wurden Blutproben von 39 Ziegen der Rasse Weiße Deutsche Edelziegen gesammelt. Die Tiere waren nicht miteinander verwandt und stammten aus sechs verschiedenen Betrieben. Die DNA Proben der Angoraziegen aus den Gebieten Lalahan Tiftik und Yerköy und der Haarziegen Kil Keçi/ Anatolien Native stammen aus der Türkei und gehören zum DNA-Bestand der AG Erhardt. Die Proben der afrikanischen Rassen Borno Goat, Westafrican Dwarf Goat und Red Sokoto wurden von Dr. Eveline Ibeagha-Awemu in Nigeria und Kame-

run entnommen und der Professur für Tierzucht und Haustiergenetik der Justus-Liebig-Universität in Gießen zur Verfügung gestellt.

Weiterhin stand DNA von 45 Ziegen- und 55 Schafrassen aus 16 Ländern zur Verfügung. Die Blutproben zur DNA-Extraktion dieser 100 Rassen wurden im Rahmen des EU-Projektes ECONOGENE (QLRT-CT-2000-02461) gesammelt und diese dann zwischen den Projektpartnern ausgetauscht. Es wurde auf die Auswahl möglichst unverwandter Tiere Wert gelegt, indem maximal drei Proben aus demselben Betrieb entnommen wurden. Auch ein Teraustausch unter den Betrieben wurde abgefragt und mit berücksichtigt. Ein Drittel der Tiere, von denen Proben entnommen wurden, waren männlichen Geschlechts. Die untersuchten Rassen und ihre Herkunftsländer sind in Tabelle 7 und 8 aufgeführt. Die geographische Verteilung der Rassen über Europa ist in den Abbildungen 3 und 4 dargestellt.

Die Probenanzahl pro Rasse lag zwischen 18 und 73 Tieren. Nähere Informationen zu Populationsgrößen, Konservierungsprogrammen, Nutzungsarten und andere besondere Eigenschaften der Rassen finden sich soweit bekannt bei DAD-IS und DAGRIS (URL 9 und 10).

Tabelle 7: Untersuchte Ziegenrassen: Herkunft inklusive Kontinent, Land und Region, eingesetzte Tierzahlen (n) und Abkürzung der Rassebezeichnung (Rassecode).

Europa	n	Rassen/ (Rassecode)	Region
Albanien	31	Liqenasi (CHALLIQ)	Gjinaj, Tobel, Vlahen
	31	Hasi (CHALHAS)	Gjinaj, Tobel, Vlahen
	30	Mati (CHALMAT)	Pogradec
	31	Capore (CHALCAP)	Gjirokastra, Saranda
	31	Muzhake (CHALMUZ)	Gjirokastra, Saranda
	31	Dukati (CHALDUK)	Gjirokastra, Saranda
Deutschland	62	Bunte Deutsche Edelziege (CHDEBDE)	Kassel, Gießen, Vogelsberg
	73	Thüringer Waldziege (CHDETWZ)	Halle
	31	Weißer Deutsche Edelziegen (CHDEWDE)	Gießen, Marburg-Biedenkopf, Vogelsberg, Kleve
Frankreich	31	Corse (CHFRCOR)	Haute-Corse
	31	French Alpine (CHFRALP)	Rhône Alpes
	31	Pyrenean (CHFRPYR)	Pyrénées Atlantique
	31	Rove (CHFRROV)	Provence
Griechenland	31	Greek goat (CHGRGRG)	Epirus, Ioannina
	31	Skopelos (CHGRSKO)	Thessaly, Skopelos
Italien	31	Argentata dell'Etna (CHITARG)	Sizilien, Messina, Enna
	31	Bionda dell'Adamello (CHITBIO)	Lombardien, Brescia
	31	Camosciata (CHITCAM)	Lombardien, Brescia
	31	Girgentana (CHITGIR)	Sizilien, Agrigento
	31	Grigia molisana (CHITGMO)	Molise, Campobasso
	31	Orobica (CHITORO)	Lombardien, Lecco
	31	Sarda (CHITSAR)	Sardinien
	31	Valdostana (CHITVAL)	Val d'Aosta
Österreich	40	Pinzgauer (CHAUIZ)	Salzburger Land
	39	Tauernschecken (CHAUTAS)	Salzburger Land, Steiermark

Fortsetzung Tabelle 7:

Europa	n	Rassen/ (Rassecode)	Region
Polen	31	Polish fawn coloured goat (CHPLBUK)	Warminsko-Mazurskie Malopolski
Portugal	30	Bravia (CHPOBRA)	Braga, Vila Real
Rumänien	32	Karpathenziege (CHROCAR)	Transilvanien, Cluj
Schweiz	31	Bündner Strahlenziege (CHCHGRS)	Graubünden
	31	Gemsfarbige Gebirgsziege (CHCHALP)	Vals, Disentis, Siat Emmental, Haslital(BE)
	31	Pfauenziege (CHCHPCG)	Entlebuch (LU)
	31	Stiefelgeiß (CHCHSGB)	Sankt Gallen
	31	Wallisische Schwarzhalsziege (CHCHVBN)	Wallis Sankt Nikolaus, Naters, Mund
Spanien	31	Florida (CHSPFLR)	Andalusien, Cordoba
	31	Guadarrama (CHSPGDR)	Andalusien, Colemenar
	31	Malaguena (CHSPMAL)	Andalusien, Malaga
	31	Payoya (CHSPPPYY)	Andalusien, Zagara del Sierra
	31	Verata (CHSPVRT)	Andalusien, Losar del Vera
Türkei	30	Abaza (CHTKABA)	unbekannt
	31	Angora (CHTKANG)	unbekannt
	31	Gurcu (CHTKGUR)	unbekannt
	31	Hair (CHTKHAI)	unbekannt
	22	Angora/Lalahan Tiftik (CHTKLTK)	Zentralanatolien
	23	Angora/Yerköy (CHTKYER)	Zentralanatolien
	50	Hair/Kil Keçi (Anatolien Black) (CHTKKIL)	Südwest-Anatolien
Afrika			
Nigeria,	30	Borno goat (CHNKBOG)	Maiduguri
Kamerun	30	Red Sokoto (CHNKRSO)	Norden von Nigeria und Kamerun
	30	Westafrican Dwarf Goat (CHNKWAD)	Süden von Nigeria und Kamerun
Asien			
Jordanien	22	Baladie (CHEGBAL)	unbekannt
Saudi-Arabien	31	Beeshi (CHSABES)	unbekannt
	31	Najrani (CHSANAJ)	unbekannt

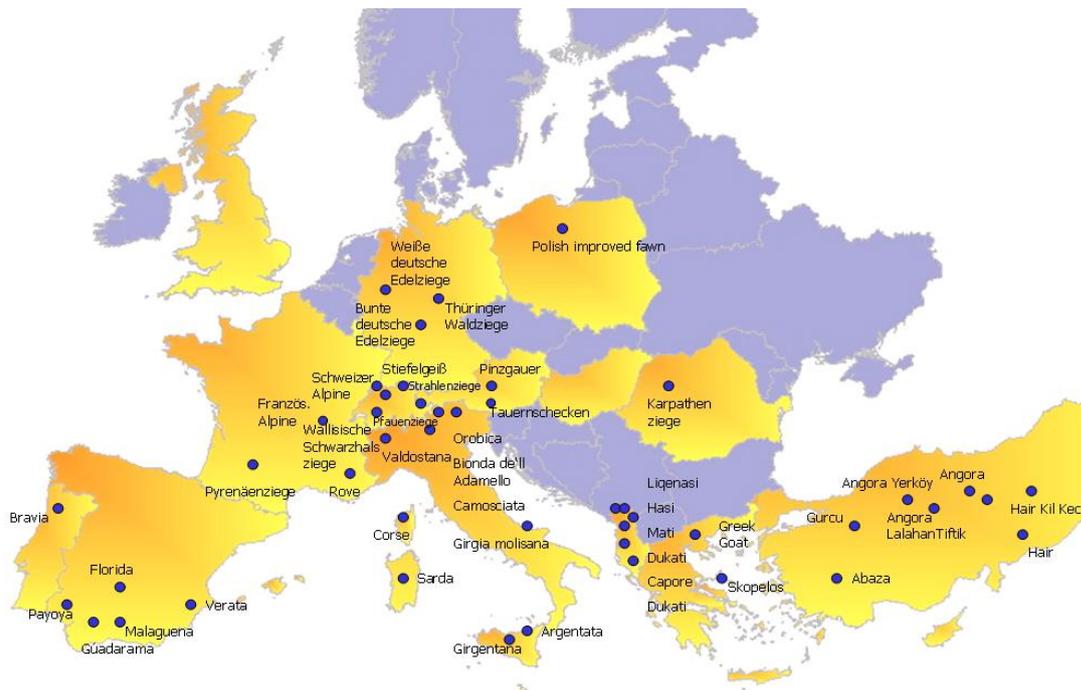


Abbildung 3: Verteilung der untersuchten europäischen Ziegenrassen

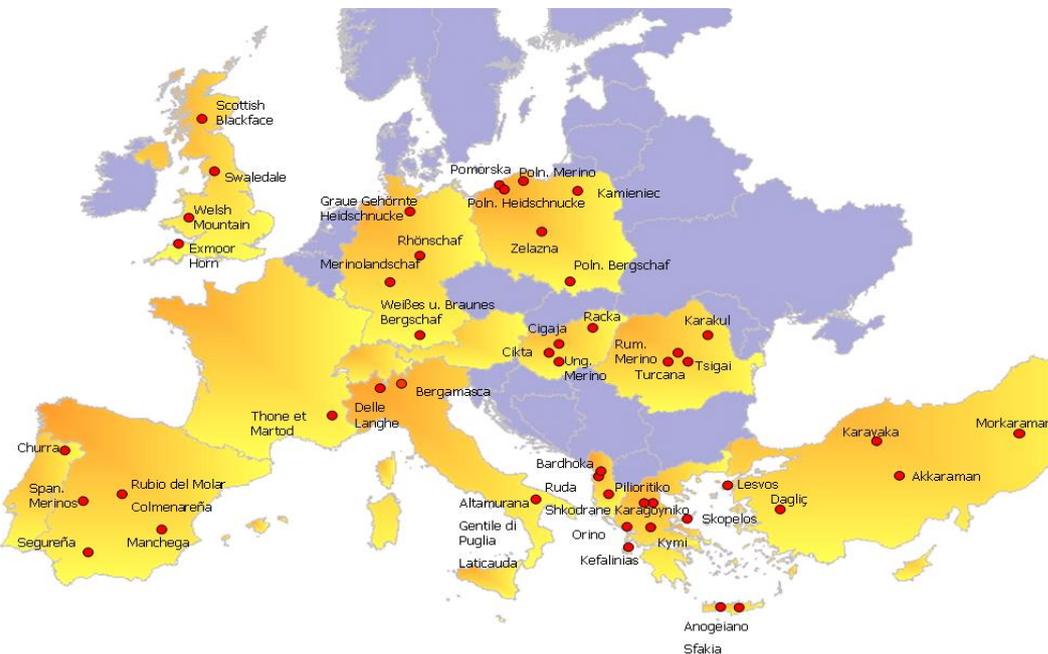


Abbildung 4: Verteilung der untersuchten europäischen Schafassen

Tabelle 8: Untersuchte Schafrassen: Herkunft inklusive Kontinent, Land und Region, eingesetzte Tierzahlen (n) und Abkürzung der Rassebezeichnung (Rassecode)

Europa	n	Rassen/ (Rassecode)	Region
Albanien	31	Bardhoka (OAALBAR)	Tirana, Tropoja, Lehze, Shkodra
	31	Ruda (OAALRUD)	Kavaje, Diber, Librazhd, Kukes,
	31	Shkodrane (OAALSHK)	Malsia Madhe
Deutschland	31	Graue gehörnte Heidschnucke (OADEGGH)	Lüneburger Heide
	31	Weißes/Braunes Bergschaf (OADEBBS)	Mittelfranken, Schwaben, Oberbayern,
	31	Merinolandschaf (OADEMÉR)	Schwaben, Mittelfranken, Gießen,
	31	Rhönschaf (OADERHO)	Darmstadt, Stuttgart, Oberbayern, Thüringen, Unterfranken, Kassel, Gießen
Frankreich	31	Thone et Martod (OAFRTHM)	Rhone Alpes
Griechenland	31	Anogeiano (OAGRANO)	Kreta
	31	Kalarritko (OAGRKAL)	Thessalien
	31	Karagouniko (OAGRKAR)	Thessalien
	31	Kefalleneas (OAGRKEF)	Ionische Inseln
	31	Kymi (OAGRKIM)	Zentral-Griechenland
	31	Lesvos(OAGRLES)	North Ägäis
	31	Orino (OAGRORI)	Epirus
	31	Pilioritiko (OAGRPIL)	Thessalien
	31	Sfakia (OAGRSFA)	Kreta
	31	Skopelos (OAGRSKO)	Thessalien
Großbritannien	31	Exmoor Horn (OAUKEHX)	Somerset, Devon
	31	Scottish blackface (OAUKSBF)	Scotland, North East
	31	Swaledale (OAUKSDL)	North-West, Yorkshire and the Humber, North East, Tees Valley and Durham, East Midlands
	31	Welsh mountain (OAUKWMT)	Wales
Italien	31	Altamura (OAITALT)	Molise, Puglia
	31	Bergamasca (OAITBER)	Lombardei
	31	Delle Langhe (OAITLAN)	Piemonte
	31	Gentile de Puglia (OAITGDP)	Molise, Puglia
	31	Laticauda (OAITLAT)	Campania

Fortsetzung Tabelle 8:

Europa	n	Rassen/ (Rassecode)	Region
Polen	31	Kamieniec (OAPLKAM)	Warminsko-Mazurskie,
	31	Merinolandschaf (OAPLMER)	Mazowieckie,
	31	Polnisches Bergschaf (OAPLGOR)	Kujawsko-Pomorskie
	31	Pommersches Landschaf (OAPLPOM)	Malopolskie Pomorskie, Zachodnio-Pomorskie
	31	Polnische Heidschnucke(OAPLWRZ)	Lodzkie, Podlaskie, Wielkopolskie, Zachodnioe
	31	Zelazna (OAPLZEL)	Lodzkie, Podlaskie
Portugal	30	Churra Bragancana (OAPOCHU)	Viana do Castelo, Braga
Rumänien	31	Schwarzes Karakulschaf (OAROKAR)	Moldawien
	31	Merinolandschaf (OAROMER)	Transsilvanien
	31	Tsigaie (OAROTSI)	Transsilvanien
	31	Turcana (OAROTUR)	Transsilvanien
Spanien	31	Colmenarena (OASPCOL)	Madrid
	31	Manchega (OASPMCG)	Castilla-La Mancha
	31	Merinolandschaf (OASPMER)	Extrema dura
	30	Rubia del Molar (OASPRBM)	Madrid
	31	Segurena (OASPSGR)	Murcia, Andalusien
	31	Merinolandschaf (OASPREF)	Extrema dura
Türkei	18	Akkaraman (OATKAKK)	Zentralanatolien, Ostanatolien
	31	Dagliç (OATKDAG)	Westanatolien, Süd-West-Zentralanatolien
	31	Karayaka (OATKKRY)	Zentral-Nordanatolien,
	31	Morkaraman (OATKMOR)	Ostanatolien
Ungarn	31	Cigaja (OAHUTSI)	Tiszentul, Kunsag, Donautal
	31	Cikta (OAHUCIK)	Donautal
	31	Merinolandschaf (OAHUMER)	Kunsag, Donautal
	31	Schwarze und weiße Racka (OAHURAC)	Tiszentul
Afrika			
Ägypten	30	Ossimi (OAEGOSS)	unbekannt
Asien			
Saudi-Arabien	31	Heri (OASAHER)	unbekannt
	31	Naemi (OASANAE)	
	31	Najdi (OASANAJ)	

3.2 Verbrauchsmaterial

3.2.1 Chemikalien und Reaktionskits

Acrylamid:Bisacrylamid 29:1, 19:1, 37:1: *Fischer Biotech, Reiskirchen*

ABI PRISM® Big Dye® Terminator v.1.1 Cycle Sequencing Kit: *Applichem GmbH, Darmstadt*

Acrylamid:Bisacrylamid 29:1 (30 % v/w): *Bio-Rad, München*

Agarose low EEO: *Applichem GmbH, Darmstadt*

Ammoniumacetat: *Merck AG, Darmstadt*

Ammoniumpersulfat (APS 10 %): *Merck AG, Darmstadt*

Blue Dextran 2000: *Amersham Bioscience Europe GmbH, Freiburg*

Bromphenolblau: *Merck AG, Darmstadt*

Dimethylsulfoxid (DMSO): *Fluka, Buchs, Sankt Gallen, Schweiz*

Ethylendiamintetraacetat (EDTA): *Amersham Bioscience Europe GmbH, Freiburg*

Essigsäure: *Applichem GmbH, Darmstadt*

Ethanol: *Applichem GmbH, Darmstadt*

Ethidiumbromid: *Serva Feinbiochemica GmbH & Co, Heidelberg*

Formamid für die Molekularbiologie, deionisiert: *Applichem GmbH, Darmstadt*

Formaldehyd: *Roth GmbH & Co., Karlsruhe*

Glycerol: *Roth GmbH & Co., Karlsruhe*

Harnstoff: *Bio-Rad, München*

Isopropanol: *Roth GmbH & Co., Karlsruhe*

Kaliumchlorid: *Merck AG, Darmstadt*

Kalziumcarbonat: *Fischer Chemical AG, Zürich, Schweiz*

Magnesiumchlorid: *Serva Feinbiochemica GmbH & Co, Heidelberg*

Magnesiumacetat 25mM: *Eppendorf AG, Hamburg*

Natriumbikarbonat: *Fischer Chemical AG, Zürich, Schweiz*

Natriumchlorid: *Merck AG, Darmstadt*

Natriumthiosulfat: *Fischer Chemical AG, Zürich, Schweiz*

N, N, N', N'-Tetramethyldiamin (TEMED): *Amresco, Ohio, USA*

PCR-Puffer 1,5mM Magnesium: *Eppendorf AG, Hamburg*

pUC8-DNA-Marker: *New England Biolabs Ltd., Beverley, USA*

Silbernitrat: *Applichem GmbH, Darmstadt*

TBE 10x (0,89 mM Tris, 0,02 mM EDTA- $\text{Na}_2\text{H}_2\text{O}$, 0,89 mM Borsäure, H_2O für die Molekularbiologie) *Applichem GmbH, Darmstadt*

Trishydroxymethylaminomethan (Tris): *Merck AG, Darmstadt*

Wizard® SV Gel and PCR clean up system: *Promega GmbH, Mannheim*

Xylencyanol: *Merck AG, Darmstadt*

3.2.2 Enzyme

Alw 44: Fermentas (MBI), St.Leon-Rot

Bfu I: Fermentas (MBI), St.Leon-Rot

Bse NI: Fermentas (MBI), St.Leon-Rot

Bsl I: New England Biolabs Ltd., Beverley, USA

Bsu RI: Fermentas (MBI), St.Leon-Rot

Hpy 188I: New England Biolabs Ltd., Beverley, USA

Mun I: Fermentas (MBI), St.Leon-Rot

Proteinase K (10mg/ml Stocklösung): *Biometra, biomedizinische Analytik, Göttingen:*

Pst I: Fermentas (MBI): St.Leon-Rot

Taq-(Thermus aquaticus)-DNA-Polymerase (5U/ μl): Eppendorf AG, Hamburg

3.2.3 Plastikwaren, Filter und Tücher

Kimwipes® Papiertücher, fusselfrei: *Kimberley Clark, Roswell, USA*

Membranfilter 0,2 μm : *Sarstedt AG & Co., Nümbrecht*

PCR-Cups Soft Tubes® mit Deckel Soft Strip®: *Biozym, Hess. Oldendorf*

Pipettenspitzen, gestopft: *Molecular BioProducts, Inc., San Diego, Kalifornien, USA*

Thermowellplatten, 96-well: *Corning Inc., New York, USA*

3.3 Geräte

ABI Prism 377 DNA Sequencer: *Applied Biosystems, Darmstadt*

Analysenwaage: *Satorius AG, Göttingen*

Biofuge 13/ 13 R: *Heräus Instruments GmbH, Hanau*

Borosilikat-Glasplatten (36 cm Länge): *Applied Biosystems, Darmstadt*

Centrifuge 5810R: *Eppendorf AG, Hamburg*

Distri-man: *Gilson S.A.S. Villers le belle, Frankreich*

Haifischzahnkamm 36-well (mylar 0,2 mm stark): *Applied Biosystems, Darmstadt*

Heizplatte mit Magnetrührer MR2002: *Heidolph, Kelheim*

Horizontale Elektrophoresekammern IBI Modell HRH: *International Biotechnologies, Inc.; New Haven Connecticut, USA*

Inkubator: *MAGV GmbH, Rabenau*

Kühlung RTE 111: *Neslab Inc. Newington, NH, USA*

Microcomputer Electrophoresis Power-Supply: *Consort*

Mikrowelle: *Ciatronic*

Multikanal-Pipetten Research Pro 0,5-10 µl: *Eppendorf AG, Hamburg*

Multipipette Pipetman 8 x 200: *Gilson S.A.S. Villers le belle, Frankreich*

Netzgerät für Elektrophoreseeinheit Power Pac 3000: *Bio-Rad, München*

Penguin P9DS, Vertikale Elektrophoresekammern: *Peqlab GmbH, Erlangen*

Photodokumentation BioDocAnalyze; Thermal Print Sony UP-D895: *Biometra, Göttingen*

Pipette Pipetman P10, P20, P200, P1000: *Gilson S.A.S. Villers le belle, Frankreich*

Spacer (mylar 0,2 mm stark): *Applied Biosystems, Darmstadt*

Spektralphotometer Gene Quant 2: *Amersham Bioscience Europe GmbH, Freiburg*

Thermalpapier high glossy für Thermalprinter: *Biometra, Göttingen*

Thermocycler iCycler 96 Well: *Bio-Rad, München*

Thermocycler PE 9600: *Applied Biosystems, Darmstadt*

Transferpette: *Brand GmbH & Co., Wertheim*

Waage PE 628: *Bosch, Jungingen*

Wasserbad Julabo 22A: *Julabo Labortechnik, Seelbach*

Vortex Reax 2000: *Heidolph, Kelheim*

Zentrifuge Beckmann J2-21M Rotor: *Beckmann Instruments, München*

3.4 Computerprogramme:

GENEDOC 2.6

www.pscu.edu/biomed/genedoc

DNAsis[®] for Windows[®]

Hitachi Software Engineering Co. Ltd., San Bruno,
USA

POPGENE V1.31

www.ualberta.ca/~fyeh/

fstat

www.unil.ch/izea/software/fstat.html

NEB-Cutter V.2.0

www.tools.neb.com/NEBcutter2/index.php

Chromas V1.45

www.technelysium.co.au

DAMBE V.4.0.36

www.web.hku.hk/~xxia/software/software.htm

GENEPOP v 3.4

www.wbiomed.curtin.edu.au/genepop/

DnaSP v 4.0.5

www.ub.es/dnasp/

Fdist v2

www.rubic.rdg.ac.uk/~mab/software.html

3.5 Methoden

3.5.1 DNA-Extraktion und Konzentrationsbestimmung

Für die DNA-Extraktion stand die Leukozytenfraktion (Buffy Coat) der EDTA-Blutproben zur Verfügung. Die Extraktion erfolgte durch Lyse der Leukozyten, Proteinase K Verdau und anschließendem Aussalzen der Proteinfraction mit NaCl, entsprechend der Hochsalzmethode von Montgomery & Sise (MONTGOMERY und SISE, 1990).

Nach der Extraktion wurde die hochkonzentrierte, in 1x TE gelöste DNA über Nacht bei 4° C aufbewahrt, um einen vollständigen Lösungsvorgang zu gewährleisten. Anschließend wurde die Konzentration und die Qualität der DNA-Stammlösungen per Spektralphotometrie (SAMBROOK et al., 1989) mit dem Gerät Gene Quant 2 bestimmt und Gebrauchsverdünungen mit einer Konzentration von 10 oder 20 ng/µl für die molekularbiologischen Analysen hergestellt.

Lösungen für die Extraktion:

Lysispuffer:

1M NH₄Cl, 1M KCl, 0,5M EDTA (pH 8,0)

Waschlösung:

140mM NaCl, 0,5 mM KCl, 0,25 mM Tris-HCl (pH 7,4)

3.5.2 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zu Beginn des ersten Amplifikationszyklus wurde die zu untersuchende Template-DNA, bei 95°C aufgetrennt (Denaturierung). Die Anlagerung der jeweiligen Primer erfolgte bei anschließender Abkühlung auf die Annealingtemperatur. Diese lag abhängig davon welche Primer eingesetzt wurden, zwischen 54-62°C. Die Elongation erfolgte bei 72°C. Der Amplifikationszyklus wurde mit demselben Reaktionsgemisch 30-35-mal wiederholt (Tabelle 9).

Eine Standard-PCR-Reaktion mit 20 µl Ansatzvolumen enthielt 1 -1,5 Units *Taq*-Polymerase der Firma Eppendorf, 1x Puffer mit unterschiedlichem Magnesiumionengehalt (1.5- 3,0 mM), 200 µM jedes Nukleotids (Peqlab) und 0,5 µM des Vorwärts- und des Rückwärtsprimers und etwa 40 ng DNA-Matrize. Die Amplifizierung wurde entweder in einem DNA-Thermocycler

PE 9600 von Applied Biosystems oder in einem iCycler der Firma Biorad unter den in Tabelle 9 aufgeführten Standardbedingungen durchgeführt.

Tabelle 9: Standard-PCR-Bedingungen

Initiale Denaturierung		95°C	5 Minuten
30-35 Zyklen	Denaturierung	93°C	40 Sekunden
	Annealing	54-62°C	40 Sekunden
	Elongation	72°C	40 Sekunden
Finale Elongation		72°C	3-10 Minuten
Kühlung		4°C	

3.5.3 Primerdesign

Zur Amplifizierung des Exons 3 des ovinen und caprinen Interleukin-2-Gens wurden anhand der Sequenz des ovinen Interleukingens ([AF287479](#)) Primer in den flankierenden Introns 2 und 3 ausgewählt. Dabei wurde auf Einhaltung folgender Regeln des Primerdesigns geachtet (INNIS & GELFAND 1990):

- Vermeidung von Komplementarität am 3'-Ende der Primerpaare
- Vermeidung von mehr als 3 G oder C repeats am 3'Primerende
- Länge zwischen 18 und 28 Nukleotiden
- GC- Gehalt um 50 %
- Vermeidung von Palindromen innerhalb der Primersequenzen
- Möglichst ausgeglichene Tm-Werte des Primerpaars.

Als Richtwert für die Annealingtemperaturen der Primer ist der Tm-Wert maßgebend, der nach der vereinfachten Formel von THEIN und WALLACE (1986) berechnet wurde:

$$T_m = 2 \times (A + T) + 4 \times (C + G)$$

3.5.4 Auswahl der Primer

Die verwendeten Primersequenzen zur Amplifikation von PCR-Fragmenten des κ -Kasein-Gens bei Schafen und Ziegen wurden aus verschiedenen Veröffentlichungen entnommen, die in Tabelle 10 aufgeführt sind. Für die Amplifizierung der Fragmente des Interleukin-2-Gens wurden die in Tabelle 11 angegebenen Primer eingesetzt.

Tabelle 10: Bezeichnung und Sequenz der zur Amplifizierung des κ -Kasein-Gens bei Schaf und Ziege verwendeten Primer und die Publikationen, denen sie entnommen worden sind.

Bezeichnung	Sequenz 5' - 3'	Annealing- temperatur	Länge PCR-Produkt	Referenz
chCSN3 For	GGT ATC CTA GTT ATG GAC TCA AT	54°C	406 bp	CHESSA et al., 2003
chCSN3 Rev	GTT GAA GTA ACT TGG GCT GTG T			
Ex 4 For	AGA AAT AAT ACC ATT CTG CAT	56°C	558 bp	JANN et al., 2004
551/2 Rev	GTT GTC TTC TTT GAT GTC TCC TTA GAG			
CSN3/1 For	CCA ACA TAT AAA CCC AGG AAT CC	58°C	1100bp	Bisher nicht veröffentlichte eigene Primer
551/2 Rev	GTT GTC TTC TTT GAT GTC TCC TTA GAG			
YahCSN3Ex 4 for	TGT GCT GAG TAG GTA TCC TAG TTA TGG	62°C	459bp	YAHYAOUI et al., 2001
YahCSN3Ex 4 rev	GCG TTG TCC TCT TTG ATG TCT CCT TAG			
Yah2CSN3SeqF	TCC CAA TGT TGT ACT TTC TTA ACA TC	63°C	645bp	YAHYAOUI et al., 2001
Yah2CSN3SeqR	GCG TTG TCC TCT TTG ATG TCT CCT TAG			

Tabelle 11: Bezeichnung und Sequenz, der zur Amplifizierung der Fragmente des Interleukin-2-Gens beim Schaf und bei der Ziege eingesetzten Primer inklusive der entsprechenden Publikationen.

Bezeichnung	Sequenz 5' - 3'	Annealing- temperatur	Länge PCR- Produkt	Referenz
IL2 Ex 1 For	AAG AGT CAT CAG AAG AGG AAA	56°C	500 bp	LÜHKEN et al., 2000
IL2 Ex 1 Rev	AAC CTT GGG CAT GTA GAA GT			
IL2 In 2 For		56 °C	550 bp	Bisher nicht veröffentlichte eigene Primer
	CAC CTC ATC TGA GGA GAA GAA			
IL2 In 2 Rev	CCA GCC ACT ATC TGA GTA CTT			
IL2 In 3 For	GGT GAC AAA TTG TGG ATG TGG	58°C	294 bp	LÜHKEN et al., 2002
IL2 In 3 Rev	GAG GAT GCA GGC AAA TGA CA			
IL2 Ex3 CH F1	AGA CTG TGA GCC TAT ACT TCC	58° C	536bp	Bisher nicht veröffentlichte eigene Primer
IL2 Ex3 CH R1	GCA TGA GTA CTT CAC AAA TAC			

3.5.5 Überprüfung der PCR-Produkte durch Agarosegelelektrophorese mit Färbung und Photodokumentation

Zum Nachweis der Amplifizierung und der Fragmentlänge eines 300-700 bp umfassenden PCR-Produkts wurde ein 1,5 % Agarosegel mit 0,5 x TBE Puffer angesetzt und gegossen. Durch Anlegen einer konstanten Spannung von 5-10 Volt/cm Elektrodenabstand erfolgte die größenabhängige Auftrennung innerhalb von 1-2 h. Bei hohen Spannungen musste das System wegen der Wärmebildung durch das elektrische Feld mit Hilfe eines Wasserbades gekühlt werden. Zur Abschätzung der Laufstrecke wurde die Position der Pufferfarbstoffe Bromphenolblau und Xylencyanol herangezogen. Es wird dabei von einer Comigration der Farbstoffe in einem 1,5 % Gel mit einem etwa 200 bp (Bromphenolblau) bzw. 1000 bp (Xylencyanol) umfassenden Fragment ausgegangen.

Die Färbung der DNA-Abschnitte erfolgte in einem Ethidiumbromidbad (1 mg/l Ethidiumbromid in 1 x TBE) für etwa 15 Minuten (BERTRAM & GASSEN 1991). Die Analyse und Photodokumentation erfolgte über den UV-Licht Bildschirm Biodoc Ti5 im Biodoc-Analyzer-System von Biometra.

3.5.6 PCR-Optimierung und Überprüfung der Primerspezifität

Die Optimierung der PCR-Reaktion und die Überprüfung der Primerspezifität erfolgten mit Hilfe eines Temperatur-Gradienten im iCycler der Firma Biorad. Es wurden Annealingtemperaturen zwischen 48°C und 70°C getestet. Zusätzlich wurden die Ansätze mit variierenden Magnesiumionengehalten (1,5 bis 3,0 mM) und DMSO-Konzentrationen (0 und 5 %) auf einem Agarosegel miteinander verglichen. Das Fragment aus der Reaktion mit der deutlichsten Amplifikation, ohne zusätzliche Amplifikationen von unspezifischen Nebenprodukten, wurde für die Folgeuntersuchungen eingesetzt.

3.5.7 Screening und Nachweis von Mutationen

3.5.7.1 Durchsuchen der NCBI Datenbanken (URL 11) nach bereits existierenden Sequenzinformationen

Mit dem Programm GENEDOC wurde ein Sequenzvergleich zwischen bereits in der Datenbank vorhandenen cDNA- und genomischen DNA-Nukleotidsequenzen durchgeführt und eventuell polymorphe Positionen identifiziert. Mit Hilfe von Rindersequenzen des jeweiligen homologen Gens konnten konservierte Regionen festgestellt werden, die sich als Primerbindungsstellen besonders eignen.

3.5.7.2 PCR-Single-Strand-Conformation-Polymorphism (PCR-SSCP)

Um innerhalb eines amplifizierten Genabschnittes Mutationen aufspüren zu können, wurden PCR-SSCPs durchgeführt (ORITA, 1989a; ORITA, 1989b). Dafür wurden die PCR-Produkte einer Hitzedenaturierung bei 93°C für 4 Minuten unterzogen. Nach der Denaturierung erfolgte die sofortige Kühlung auf Eis und das Auftragen der Proben auf ein Polyacrylamidgel mit anschließender Gelelektrophorese (PAGE). Um Unterschiede im Laufverhalten festzustellen und/oder ihre Darstellung zu optimieren, wurden verschiedene Protokolle für die SNP-Analyse der PCR-Fragmente getestet. Desweiteren wurden unterschiedliche lange PCR-Fragmente zur Untersuchung eingesetzt. Die Primer und die Längenangaben zu den getesteten PCR-Produkten sind der Tabelle 10 zu entnehmen

3.5.7.3 Herstellung nicht denaturierender Polyacrylamidgele

Zur Herstellung des nicht denaturierenden Polyacrylamidgels (PA-Gel) wurden verschiedene Acrylamid:Bisacrylamid Verhältnisse (1:19, 1:25, 1:33, 1:37, 1:49) eingesetzt. Ebenso wurden unterschiedliche Konzentrationen an Acrylamid:Bisacrylamid-Lösungen (8,5, 9,25, 10 %) und Glycerol (0,5 %, 1 %, 1,5 %) in verschiedenen Gelen getestet, um so eine Modifizierung der Ergebnisse zu erreichen.

Der Gelmix für ein 10 % PA-Gel bestand z. B. aus 4 ml einer 40 %-igen Acrylamid:Bisacrylamid-Stammlösung der verschiedenen Zusammensetzungen, 0,8 ml 10 x TBE-Puffer, unterschiedlichen Glycerolzugaben von 0 % bis 1,5 % und Aqua bidest ad 15 ml. Der Ansatz wurde mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe in einem Kolben entgast und im darauf folgenden Schritt mit je 15 µl APS (25 %ig) und TEMED versetzt. Anschließend wurde die Gelösung mit einer 5000-Pipette (ABIMED) zwischen die mit seitlichen Platzhaltern versehenen Glasplatten gegeben. Ein Kamm mit 24 Zähnen diente als Platzhalter für die Probestaschen. Nach einer 2-stündigen Polymerisationzeit bei Raumtemperatur wurde mit dem Auftragen der Proben begonnen.

Zu je 6 µl PCR-Produkt wurden 8 µl Formamid-Puffer zugegeben und eine Denaturierung bei 93°C Grad für 4 Minuten durchgeführt. Nach sofortiger Kühlung auf Eiswasser wurden 8 µl des PCR-Mix auf das Gel aufgetragen. Als Laufpuffer wurde 0,5 x TBE-Lösung verwendet.

Formamid-Puffer: 95 % Formamid (v/v), 0,025 % (w/v) Bromphenolblau, 0,025 % (w/v) Xylencyanol FF, EDTA 0,025 % (w/v)

TBE-Puffer 10-fache (Stammlösung): 890 mM Tris, 890 mM Borsäure, 20 mM EDTA

Die Erweiterung und Optimierung der PCR-SSCP-Methode zur Analyse des Exons 4 (Tabelle 12) des caprinen κ -Kaseingens von CAROLI et al. (2001) wurde mit sequenzierten Standardproben vorgenommen. Um mehr als zwei Varianten in einem PCR-SSCP-Gel darstellen zu können, wurde das in dieser Methode verwendete 558 bp umfassende PCR-Produkt durch das bei CHESSA et al. (2003) verwendete 406 bp lange PCR-Produkt aus Tabelle 10 ersetzt, welches alle Positionen charakterisierter Mutationen enthält, ersetzt. Damit wurde der Empfehlung von BEIER (1993) Rechnung getragen, der eine größenabhängige Verbesserung der Detektion von Mutationen beschreibt. Die optimale Detektion erfolgt nach seinen Untersuchungen bei PCR-Fragmenten zwischen 100 und 300 bp. Außerdem wurden 645 bp lange PCR-Fragmente (Tabelle 10) aus YAHYAOUÏ et al. (2001) bei der PCR-SSCP-Analyse eingesetzt, um Zusammenhänge zwischen Fragmentgröße und Mutationsdetektionsvermögen der Methode zu überprüfen. Es wurden weiterhin unterschiedliche Temperaturen (5°C, 10°C, 12°C) und Acrylamid:Bisacrylamid-Verhältnisse (1:19, 1:25, 1:33, 1:37, 1:49) innerhalb der PCR-SSCP-Untersuchungen getestet und verglichen, sowie Abhängigkeiten des Laufverhaltens von Spannungsveränderungen (280-400 V) und Glycerolkonzentrationen (0-1,5%) überprüft.

Tabelle 12: PCR-SSCP-Protokoll nach CAROLI et al. (2001) für die Typisierung eines caprinen *CSN3* Fragments, inklusive Angaben zu den Konzentrationen im Gelmix und Elektrophoresebedingungen.

<i>CSN3</i>	Gelmixzusammensetzung			Elektrophoresebedingungen		
	Acrylamid:Bisacrylamid Verhältnis/ Konzentration Acrylamidmix	Glycerol	Puffer	Spannung	Dauer	Temperatur
558 bp	33:1/ 8,5 %	0,5 %	0,5 x TBE	340 Volt	16 h	5°C

Für das Screening auf Mutationen im Bereich der 5'-Region, Exon 1 und 2 einschließlich Intron 1 des Interleukin-2 Gens bei Ziegen wurden die in Tabelle 13 aufgeführten Protokolle für die PCR-SSCP-Analyse getestet.

Tabelle 13: PCR-SSCP-Protokolle zur SNP-Detektion im Bereich der 5'-Region, Exon 1 und 2 einschließlich Intron I des Interleukin-2 Gens bei Ziegen.

<i>IL2</i>	Gelmixzusammensetzung			Elektrophoresebedingungen		
	Acrylamid:Bisacrylamid Verhältnis/ Konzentration Acrylamidmix	Glycerol	Puffer	Spannung	Dauer	Temperatur
500 bp	25:1 / 8,5 %	-	0,5 x TBE	260 Volt	16 h	5°C
	29:1 / 9,25 %	1 %	0,5 x TBE	260 Volt	16 h	5°C
	37:1 / 8,5 %	0,5 %	0,5 x TBE	275 Volt	16, h	12°C
	37:1 / 10 %	-	0,5 x TBE	370 Volt	16 h	5°C

Für die Typisierung der SNPs im Exon 1 und Intron 3 des Interleukin-2 Gen bei Schafen wurden die in Tabelle 14 aufgeführten PCR-SSCP-Protokolle nach LÜHKEN et al. (LÜHKEN et al., 2000; LÜHKEN et al., 2002) in leicht modifizierter Form angewendet.

Tabelle 14: PCR-SSCP-Protokolle zur Typisierung der von LÜHKEN et al. (2000) typisierten SNPs im Exon 1 und im Intron 3. Veränderungen gegenüber dem ursprünglichen Protokoll sind mit * gekennzeichnet.

<i>IL2</i>	Gelmixzusammensetzung			Elektrophoresebedingungen		
	Acrylamid:Bisacrylamid Verhältnis/ Konzentration Acrylamidmix	Glycerol	Puffer	Spannung	Dauer	Temperatur
Exon 1	25:1*/ 8,5 %	-*	0,5x TBE	260 Volt	16 h	5°C
Intron 3	29:1/ 8,5 %	1 %	0,5x TBE	340 Volt	5 h	5°C

Silberfärbung

Die Darstellung der Bandenmuster nach PCR-SSCP-Analyse erfolgte durch die Silberfärbung in Anlehnung an das Protokoll von BASSAM et al. (1991) modifiziert durch PRINZENBERG (1998).

Es wurden folgende Lösungen eingesetzt:

Fixierlösung: 10 % (v/v) Essigsäure $C_2H_4O_2$, 15 % (v/v) Ethanol C_2H_6O , Fixierdauer: 30-60 Minuten

Silberlösung: 1 g/l $AgNO_3$, 0,0555 % (v/v) Formaldehyd CH_2O in A. demin., Inkubation lichtgeschützt 30-45 Minuten.

Entwickler: 45 g/l Natriumcarbonat Na_2CO_3 , 0,0555 % (v/v) Formaldehyd CH_2O , 0,04 g/l Natriumthiosulfat $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ in A. demin., Temperatur 10°C; Entwicklungsdauer: visuell zu bestimmen, dannach Verbringen in Stopplösung.

Stopplösung: 0,04 M Na-EDTA, Temperatur 10°C, Verweildauer 10 Minuten.

Konservierungslösung: 5 % Glycerol $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$, 30 % Ethanol $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ in A. demin.

3.5.8 DNA-Sequenzanalyse

3.5.8.1 Cycle-Sequencing von PCR-Produkten auf dem ABI Prism 377

Die Sequenzierung der Fragmente des Interleukin-2-Gens und des κ -Kaseingens erfolgte mit Dye-Terminator-Cycle-Sequencing-Technik am ABI Prism 377. Hierbei wurde das BigDye-Terminator-Cycle-Sequencing-Ready-Reaction-Kit von Applied Biosystems eingesetzt. Dieses Kit enthält einen Premix, der vier verschiedenfarbig fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide (Tabelle 15) mit einer AmpliTaq[®]DNA Polymerase, FS kombiniert. Weiterhin sind Desoxynukleotide, Pyrophosphatase und Magnesiumchlorid beigelegt. Dies ermöglicht die Durchführung der Sequenzierreaktion in einem Cup und die Detektion auf einer Spur des Sequenziergels.

Außerdem ist im Kit ein fünffachkonzentrierter Sequenzierpuffer (400 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl, pH 9.0) enthalten. Die BigDye Terminatoren sind mit den in Tabelle 15 aufgeführten dRhodamine Acceptor Puffern gelabelt.

Die Elektrophorese erfolgte in einem 0,2 mm dünnem 4,5 %-igen (v/v) Polyacrylamidgel. Die CCD-Kamera („charge coupled device“) detektiert die unterschiedlichen Lichtintensitäten und übermittelt diese in Form von digitalen Signalen an den Macintosh Rechner.

Die Auswertung der Ergebnisse in der vorliegenden Untersuchung erfolgte über eine DNA Analysis Software von Applied Biosystems. Die hierbei gewonnenen Daten wurden mit den Programmen Chromas, GENEDOC und DNASIS[®] ausgewertet.

Tabelle 15: Labellung der BigDye Terminatoren und Farbzuoordnung der Daten.

Terminator	Dye Label	Farbe der Rohdaten auf dem Gelbild	Farbe der analysierten Daten
A	Dichloro (R6G)	Grün	grün
C	Dichloro (R0X)	Rot	blau
G	Dichloro (R110)	Blau	schwarz
T	Dichloro (TAMRA)	Gelb	rot

3.5.8.2 DNA-Mengenschätzung anhand eines Agarosegels mit Mengenstandards

Ein Aliquot des aufgereinigten PCR-Produkts (5 µl) wurde zur Mengenbestimmung auf einem 1,5 % Agarosegel aufgetragen. Als Mengenstandards wurden 50 und 100 ng λ-DNA/Hind3 eingesetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 5 Volt/cm in 0,5 x TBE-Puffer. Nach der anschließenden Färbung mit Ethidiumbromid wurden anhand der Fluoreszenzintensitäten der Mengenstandards die DNA-Konzentrationen der eingesetzten PCR-Produkte visuell abgeschätzt.

3.5.8.3 Aufreinigung von PCR-Produkten

PCR-Fragmente, bei deren Amplifikation keine im Agarosegel nachweisbaren Nebenprodukte entstanden waren, wurden direkt mit dem Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean up System (Promega) aufgereinigt. Es wurde eine dem Volumen der Reaktion entsprechende Menge an DNA-bindender Lösung zugesetzt und die Gesamtlösung auf das Filtersystem des Kits aufgetragen. Die anschließende Zentrifugation und die Waschschritte erfolgten nach dem Herstellerprotokoll. Die Lösung der DNA-Fragmente erfolgte in 25 µl, im Kit enthaltenem, nukleasefreien Wasser. Beim Vorliegen unspezifischer zusätzlicher Amplifikationsprodukte wurde das gesamte PCR-Produkt auf einem Agarosegel aufgetrennt, das Produkt für die Sequenzanalyse per Längenstandard identifiziert und mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die anschließende Elution des PCR-Produkts erfolgte wiederum mit dem Promega-Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean up System. Hierbei wurden pro 10 mg Agarosegel 10 µl DNA-bindende Lösung eingesetzt und eine Inkubation von einer Minute bei Raumtemperatur eingehalten. Das weitere Vorgehen erfolgte nach demselben Protokoll wie bei der direkten Aufreinigung des PCR-Fragmentes.

Die Konzentration der zur Sequenzierreaktion eingesetzten DNA wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Anzahl der Basenpaare des PCR-Produkts}}{20} = \text{Konzentration der DNA in ng}$$

20

Für die Sequenzanalyse der PCR-Produkte, die mit den in Tabelle 16 aufgeführten Primern erstellt wurden, wurde jeweils ein 20 µl Ansatz vorbereitet (Tabelle 17). Die Sequenzreaktion wurde mit dem aus Tabelle 18 ersichtlichen Cyclerprogramm durchgeführt.

Tabelle 16: Zusammenstellung der Primer, die zur Sequenzanalyse des ovinen und caprinen κ -Kaseingens und des Interleukin-2-Gens eingesetzt wurden.

κ -Kasein-Gen Exon 4 558bp		5'-3'
Ex IV For	GGT ATC CTA GTT ATG GAC TCA AT	
551/2 Rev	GTT GTC TTC TTT GAT GTC TCC TTA GAG	
κ -Kasein-Gen Exon 4 645bp		
Yah2CSN3Seqfor	TCC CAA TGT TGT ACT TTC TTA ACA TC	
Yah2CSN3Seqrev	GCG TTG TCC TCT TTG ATG TCT CCT TAG	
Interleukin-2 Gen Exon 1 und 2, 5'UTR-Region 500bp		
IL2 Ex I For	AAG AGT CAT CAG AAG AGG AAA	
IL2 Ex I Rev	AAC CTT GGG CAT GTA GAA GT	
Interleukin-2 Gen Exon 3 536bp		
IL2 Ex3 CH F1	AGA CTG TGA GCC TAT ACT TCC	
IL2 Ex3 CH R1	GCA TGA GTA CTT CAC AAA TAC	

Tabelle 17: Zusammensetzung der Sequenzieransatzes.

	Konzentration	Volumen
Premix		4 μ l
Sequenzierpuffer	0,5	2 μ l
Primer	5 pmol/ μ l	1 μ l
PCR-Produkt	30-100 ng/ μ l	1-4 μ l
H ₂ O		ad 20 μ l

Tabelle 18: Programmierung des Cyclers (iCycler oder PE) für die Sequenzreaktion.

Denaturierung	96°C	60 Sekunden	
Denaturierung	96°C	10 Sekunden	
Annealing	45-60°C	05 Sekunden	25 Zyklen
Elongation	60°C	240 Sekunden	
Kühlung	4°C		

Das Produkt aus der Sequenzierreaktion wurde nach Beendigung des Cycle-Sequencing mit 2 µl 3 molarer Natriumacetatlösung (pH 4.6-5.2) und 50 µl Ethanol (absolut, unvergällt) gefällt.

Nach der Fällung wurde der Ansatz für 15 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert (Biofuge 13) und der Überstand quantitativ mit einer Wasserstrahlpumpe unter Schonung des DNA-Pellets abgezogen. Anschließend erfolgte ein zweimaliges Waschen des Pellets mit 150 µl Ethanol (70 %), wobei ebenfalls wieder ein quantitatives Abziehen des Überstandes durchgeführt wurde. Als Zwischenschritt wurde bei 13000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Nach dem letzten Waschen wurde das Pellet für 20 Minuten bei 50°C getrocknet und anschließend in 4 µl Ladepuffer (25 mM EDTA, 50 mg Blue Dextran 2000) gelöst. Von der Lösung wurden dann 1,5 µl auf das Sequenzanalysegele aufgetragen.

3.5.8.4 Herstellung des Sequenzanalysegeles

Um Fluoreszenzen zu vermeiden, wurden die Gelplatten beidseitig mit Alconox[®] gereinigt. Es wurden ausschließlich KimWipe[®] Reinigungstücher verwendet. Die dem Gel zugewandten Plattenseiten wurden zusätzlich einer Behandlung mit 6 N NaOH-Lösung unterzogen. Daraufhin folgte ein ausgiebiges Abspülen der Platten mit Aqua bidest. mit anschließendem Trocknen. Die angefeuchteten Spacer wurden zwischen die Platten eingefügt und in den Gelplattenrahmen des ABI Prism 377 eingebaut. Es wurde das 36 cm Plattenformat verwendet.

Anschließend wurde der Gelmix vorbereitet:

Gelmix

8,4 ml Acrylamid:Bisacrylamid BIORAD 30 % (29:1), 21 g Harnstoff BIORAD, 6 ml 10 x TBE, 20 ml H₂O Qualitätsstufe HPLC

Alle Reagenzien wurden in einem Becherglas langsam gerührt. Nach dem Filtern durch ein Filterblatt mit Porengröße 0,2 µm wurde der Gelmix entgast. Es erfolgte die Zugabe von 20 µl TEMED und 300 µl APS (10 % (w/v)). Sofort im Anschluss wurde der Gelmix zügig zwischen die Platten gegossen. Der Vorkamm wurde mit der glatten Seite zum Gel hin eingesetzt und mit Buchbinderklammern über den Glasplatten am Gelanfang fixiert. Nach vollständiger Polymerisation nach 30-60 Minuten konnte der Haifischkamm eingefügt und das Gel in den ABI Prism 377 eingesetzt werden.

Nach Abschluss der Plattenkontrolle durch den Laser, konnte der Vorlauf, über den die für die Elektrophorese optimale Temperatur von 50°C erreicht wird, gestartet werden.

Nach Zugabe von 4 µl Ladepuffer (25 mM EDTA, 50 mg Blue Dextran 2000) zum Produkt der Sequenzierreaktion und anschließender Denaturierung bei 93°C für 2 Minuten erfolgte das Auftragen von 1,5 µl Probenvolumen direkt in die durch den Haifischkamm gebildeten Taschen. Die Elektrophorese wurde mit 1 x TBE-Puffer bei einer Temperatur von 51°C und einer Spannung von 2,5 KV gefahren.

Für die Sequenzierung verwendete Lösungen und Stoffe:

Acrylamid/Bisacrylamid BIORAD 29:1, Urea BIORAD, TEMED, Ammoniumpersulfat APS 10 % (w/v), 5 x Sequenzierpuffer (400 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl, pH 9.0), 10 x TBE-Puffer (108.0 g Tris, 55.0 g Borsäure, 7.4 g Na₂EDTA, ad 1 Liter H₂O (pur analysis) pH 8,2 Lagerung bei RT), NaOH-Lösung 6 N (24 g NaOH ad 100 ml Aqua bidest),

3.5.9 PCR-Restriktions-Fragment-Längenpolymorphismus (PCR-RFLP)

Um bei der Sequenzierung oder der NCBI Recherche (URL 11) ermittelte Nukleotidaustausche darstellen zu können, wurden mit Hilfe des Computerprogramms NEB-Cutter V.2.0 (URL 12) Restriktionendonukleasen ausgewählt, deren Erkennungssequenzen durch die Mutation betroffen sind.

Die Mutation konnte dabei entweder zur Entstehung einer Erkennungssequenz führen oder eine bestehende so verändern, dass das gewählte Enzym im Falle des Basenaustausches nicht mehr schneiden konnte. Die entstandenen, unterschiedlichen Fragmentlängen wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt und ausgewertet. Vor der Reaktion wurde die Zielsequenz auf weitere, enzyspezifische Schnittstellen untersucht, um Fehltypisierungen auszuschließen.

Für die PCR-RFLP-Analyse des *CSN3* Exon 4 bei Schaf und Ziege wurden die in Tabelle 19 aufgeführten Enzyme ausgewählt.

Tabelle 19: Enzyme zur Typisierung von SNPs in ovinen und caprinen κ-Kaseingenfragmenten.

Endonuklease	Puffer	Temperaturoptimum	Hersteller
<i>Bfu</i> I	1 x BfuI-Puffer	37°C	Fermentas MBI
<i>Pst</i> I	Puffer Orange ⁺	37°C	Fermentas MBI
<i>Alw</i> 44I	Puffer Y ⁺ /TANGO	37°C	Fermentas MBI
<i>Bse</i> NI/ <i>Bsr</i> I	Puffer blau/ NEB3	65°C	Fermentas MBI
<i>Bsu</i> RI/ <i>Hae</i> 3	Puffer Rot ⁺	37°C	Fermentas MBI
<i>Mun</i> I	Puffer Grün ⁺	37°C	Fermentas MBI

Für die PCR-RFLP-Analysen der *IL2* 5'-Region bzw. im Intron 2 bei der Ziege wurden die Enzyme aus Tabelle 20 ausgewählt.

Tabelle 20: Enzyme zur Typisierung eines SNPs in der caprinen *IL2* 5'-Region und im Intron 2.

Endonuklease	Puffer	Temperaturoptimum	Hersteller
<i>Hpy</i> 188I	NEB 4	37°C	New England Biolabs
<i>Bsl</i> I	NEB 3	55°C	New England Biolabs

Das Volumen des Reaktionsansatzes betrug 20 µl. Es wurden zwischen 3-10 µl des PCR-Produktes, 2 µl des jeweiligen 10-fachen Puffers, 3-5 U Enzym und Wasser für die Molekularbiologie ad 20 µl eingesetzt. Puffer (Tabelle 21), Wasser und Enzym wurden als Mixtur angesetzt und mit den vorgelegten PCR-Produkten durch mehrmaliges Auf- und Abziehen in der Pipettenspitze gemischt. Anschließend erfolgte die Inkubation bei für die Enzymaktivität optimaler Temperatur für fünf bis sechs oder 24 Stunden. Nach Zugabe des Ladepuffers wurde der Ansatz auf ein Agarosegel aufgetragen und die Fragmente durch Elektrophorese aufgetrennt. Nach der Färbung mit Ethidiumbromid wurden die Banden auf ihre Länge und damit auf das Vorhandensein der spezifischen Schnittstellen in einem oder beiden Allelen untersucht.

Tabelle 21: Bezeichnungen und Zusammensetzungen, der zu den PCR-RFLP-Analysen eingesetzten Puffern.

	Tris-HCl (pH 7,5)	Magnesium-Chlorid	Natrium-Chlorid	BSA	Dithiothreitol
Puffer Grün	10 mM	10 mM	50 mM	0,1 mg/ml	-
Puffer Orange	50 mM	10 mM	100 mM	0,1 mg/ml	-
Puffer Rot	10 mM	10 mM	100 mM	0,1 mg/ml	-
Puffer NEB 3	50 mM	10 mM	100 mM	-	1 mM
	Tris-Acetat (pH 7,9)	Magnesium-Acetat	Kalium-Acetat	BSA	Dithiothreitol
BfuI-Puffer	50mM	15 mM	100 mM	0,1 mg/ml	-
Puffer Y ⁺ /TANGO	33 mM	10 mM	66 mM	0,1 mg/ml	-
Puffer NEB 4	20 mM	10 mM	50 mM	-	1 mM

3.5.10 Biometrische Methoden

3.5.10.1 Schätzung der genetischen Diversität

Es wurden mit dem Statistikprogramm POPGENE (YEH und YANG, 1999) für alle untersuchten Rassen an allen genotypisierten Loci Allelfrequenzen geschätzt und die beobachtete (H_o) und erwarteten Heterozygotie (H_e) der einzelnen Rassen und die durchschnittliche erwartete Heterozygotie der Gesamtpopulation (H_T) ermittelt. Als Maßstab für die Variabilität innerhalb der Ziegenrassen am *CSN3* wurde die effektive Anzahl der Allele (N_E) ermittelt. Die effektive Anzahl der Allele entspricht dem Kehrwert des erwarteten Homozygotiegrades (HARTL und CLARKE, 1989).

3.5.10.2 Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWG)

Die Allelfrequenzen wurden über alle Rassen sowie innerhalb der Rassen mit dem Programm GENEPOP V3.1 auf Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht geprüft. Dies erfolgte mit Hilfe der Markov Chain Monte Carlo Methode (1000 Wiederholungen) unter Anwendung eines Fisher-Exakt-Tests (GUO und THOMPSON, 1992). Die geschätzten p-Werte wurden ab einem Wert $< 0,01$ als signifikant eingeschätzt.

3.5.10.3 F-Statistik

Es wurden die Fixationindizes F_{IS} , F_{IT} und F_{ST} (W&C) nach WEIR und COCKERHAM bzw. nach NEI (NEI, 1977; WEIR und COCKERHAM, 1984) mit dem Statistikprogramm FSTAT v.2.9.3.2 ermittelt (GOUDET, 2001).

3.5.10.4 Ewens-Watterson-Homozygotie-Test und Identifizierung von „Ausreißer“-Genorten

Die Genorte wurden innerhalb jeder Rasse und über alle Rassen mit POPGENE V (YEH und YANG, 1999) auf Selektionseinflüsse getestet. Der Ewens-Watterson-Homozygotie-Test basiert auf der Theorie der Genotypverteilung neutraler Genorte (EWENS, 1972). Es werden die nach der Theorie erwarteten Genotypfrequenzen gegen die beobachtete Genotypverteilung getestet und entsprechende Konfidenzintervalle errechnet.

Mit dem Programm Fdist v2 (BEAUMONT und NICHOLS, 1996) wurde ermittelt, ob an den untersuchten Genorten mit hoher Wahrscheinlichkeit Selektionseinflüsse wirken. Hierbei wird eine computersimulierte F_{ST} -Nullverteilung erstellt, die der Verteilung von empirischen Daten sehr ähnlich ist. Es werden 20 000 Loci unter Annahme verschiedener Mutationsmodelle („infinite alleles model“ und „stepwise mutation model“) simuliert. Diese Verteilung dient als Grundlage zur Berechnung von 99 %-Konfidenzintervallen und p-Werten für die zu untersu-

chenden Genorte und ermöglicht so die Identifikation von Loci mit ungewöhnlichen F_{ST} -Werten, den sogenannten „Ausreißern“.

3.5.10.5 Berechnung phylogenetischer Bäume für die κ -Kaseingenvarianten bei der Hausziege (*Capra hircus*) und deren verwandten Wildformen (*Capra aegagrus/Capra pyrenaica*).

Die phylogenetischen Bäume wurden mit dem Programm DAMBE (Data Analysis in Molecular Biology and Evolution) erstellt (XIA und XIE, 2001). Innerhalb des Programmes wurde die *maximum parsimony* Methode ausgewählt, um die molekulare Evolution von Nukleotidsequenzen oder Aminosäuresequenzen zu rekonstruieren. Die Methode beruht auf einer Minimierung evolutionärer Schritte innerhalb des zu erstellenden phylogenetischen Baumes. Es wurde ein „Bootstrapping“ mit 50 und 100 Zufallsdatensätzen und ein „Jackknifing“ mit 50 und 1000 Zufallsdatensätzen angewendet, um die Anzahl der generierten Bäume zu reduzieren.

Die grafische Darstellung der errechneten Bäume erfolgte mit dem Programm Treeview (PAGE, 1996).

4 Ergebnisse

4.1 Polymorphismen im κ -Kasein-Gen (*CSN3*) Exon 4

4.1.1 Darstellung der *CSN3* Allele der Ziege

Es wurde ein optimiertes PCR-SSCP-Protokoll (Tabelle 22) für die Typisierung der *CSN3* Varianten bei der Ziege entwickelt. Abbildung 5 zeigt ein silbergefärbtes PCR-SSCP-Gel nach dem optimierten Protokoll, während Abbildung 6 eine ähnlich hochauflösende Temperatur- und Spannungsvariante darstellt. Anschließend wurden die Proben, deren Laufverhalten bei der PCR-SSCP-Analyse keine eindeutige Charakterisierung des Genotyps zuließ, durch PCR-RFLP Untersuchungen weiter typisiert. Es handelte sich hierbei um die Varianten *CSN3*D*, *F*, *I*, *K* und *L* (Abbildung 7 und 8).

Tabelle 22: PCR-SSCP-Protokoll zur Typisierung der *CSN3* Varianten bei der Ziege, inklusive Angaben zu den Konzentrationen im Gelmix und den Elektrophoresebedingungen

	Gelmixzusammensetzung			Elektrophoresebedingungen		
	Acrylamid: Bisacrylamid Verhältnis / Konzentration Acrylamidmix	Glycerol	Puffer	Spannung	Dauer	Temperatur
Exon 4	29:1 / 9,25 %	0,5 %	0,5 x TBE	275 Volt	16 h	12°C

Die angewendete PCR-SSCP-Methode ermöglichte die gleichzeitige Darstellung von 11 verschiedenen Bandenmustern, von denen wiederum 9 spezifisch für das jeweilige *CSN3**-Allel waren (Abbildung 5). Es können 10 der 16 bekannten Allele des *CSN3* der Ziege in drei Reaktionsschritten nachgewiesen werden. Während für die Allele *CSN3*A*, *B/B'*, *B''*, *C*, *C'*, *E*, *H*, *J* und *M* der Nachweis aufgrund des allelspezifischen Laufverhaltens im SSCP-Gel gelang, konnten beim Auftreten von einem der nachweisbaren Bandenmuster die Allele *CSN3*D*, *F*, *G*, *I*, *L* oder *K* vorliegen. Zur Identifizierung des *CSN3*G* wurden Banden, die bei einer reduzierten Formamidzugabe regelmäßig zusätzlich zu den Einzelsträngen auftraten, genutzt. Diese wurden in Abbildung 5 mit einem Pfeilkopf markiert. Es handelt sich hierbei wahrscheinlich um eine Interaktion der beiden Einzelstränge.

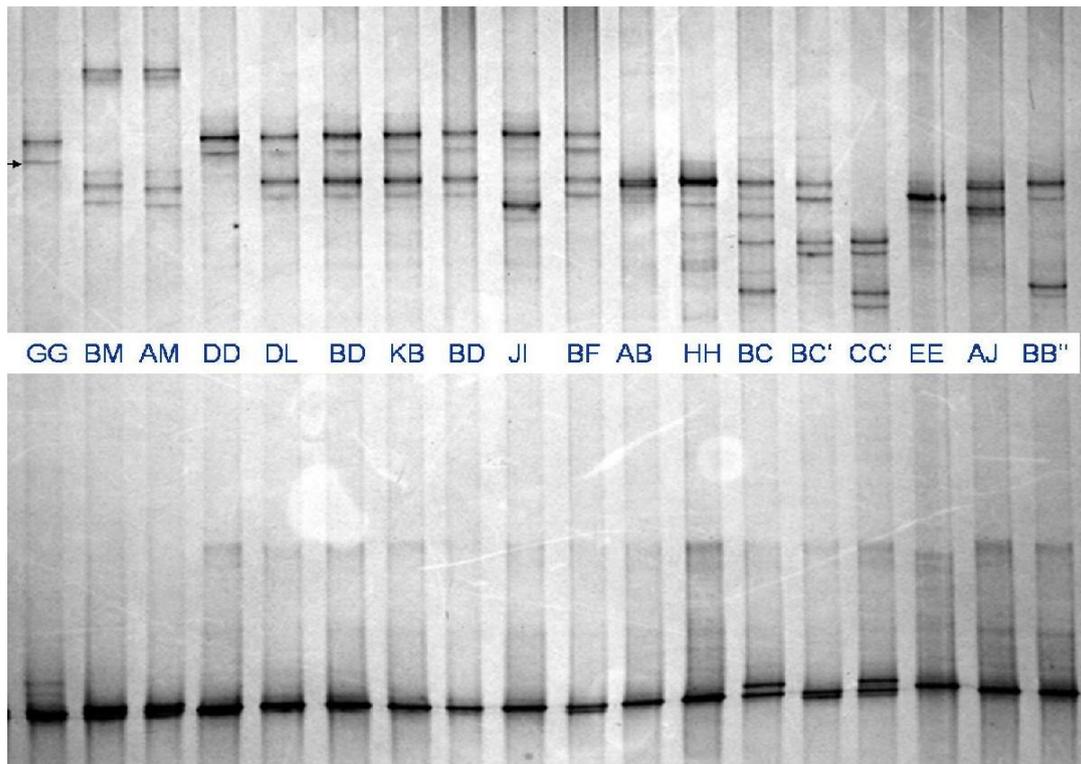


Abbildung 5: PCR-SSCP-Gel nach maximaler Auftrennung unter den optimierten Bedingungen (12°C, 275 Volt, 16h) aus Tabelle 22. *CSN3*G* konnte nur unter zu Hilfenahme der geringgradig schneller migrierenden sekundären Banden (markiert mit Pfeilkopf) von *CSN3*D, L, I* und *K* unterschieden werden.

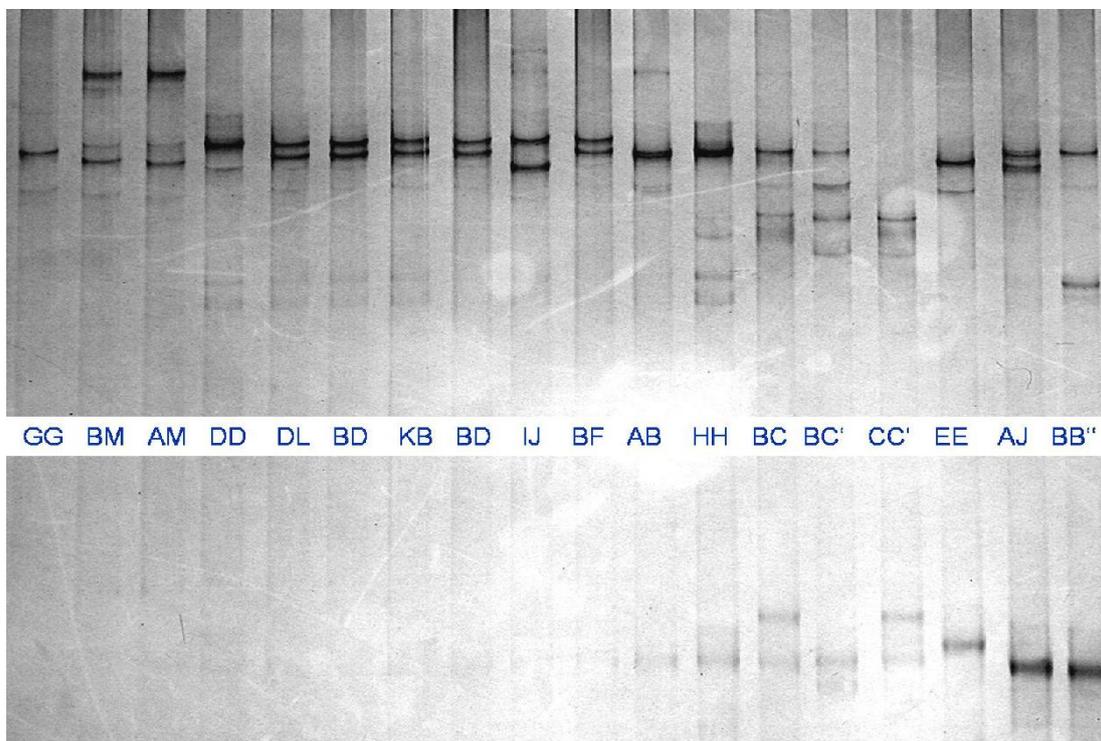


Abbildung 6: PCR-SSCP-Gel nach Silberfärbung unter den Elektrophoresebedingungen: 350 Volt für 16 Stunden bei 5°C. Unter diesen Bedingungen etwas geringere Migrationsgeschwindigkeit der ssDNA gegenüber Abb. 5.

Um eine genauere Differenzierung der Allele zu erreichen, schlossen sich zwei weitere Reaktionsschritte in Form von PCR-RFLPs an. Aufgrund einer für die Allele *CSN3*D*, *F* und *L* spezifischen Schnittstelle der Restriktionsendonuklease *Alw* 44I (Pos. 591 C, Tabelle 23), konnten diese von den Allelen *CSN3*I* und *K* unterschieden werden, die diese nicht aufweisen (Abbildung 7). Um zwischen *CSN3*I* und *K* einerseits bzw. zwischen *CSN3*D* bzw. *L* und *CSN3*F* differenzieren zu können, wurde eine PCR-RFLP-Analyse mit *Bse* NI durchgeführt. *Bse* NI schneidet, wie in Abbildung 8 dargestellt, die allele Variante *CSN3*K* (Pos. 309 G, Tabelle 23) nicht aber *CSN3*I* (Pos. 309 A, Tabelle 23). Im Falle der Allele *CSN3*D*, *CSN3*L* und *CSN3*F* enthält nur *CSN3*F* die Erkennungssequenz (Pos. 309 G, Tabelle 23) und wird damit wie *CSN3*K* geschnitten. Daraus folgt, dass durch die Kombination der beiden angewendeten PCR-RFLP-Analysen innerhalb des durch PCR-SSCP entstandenen Clusters *CSN3*I*, *K*, *D*, *L* und *F* nun *CSN3*I*, *K*, und *F* eindeutig untereinander und von *CSN3*D* und *L* differenziert werden können. Nicht dargestellt werden konnte die Unterscheidung zwischen *CSN3*D* und *CSN3*L*, die an der Position 247 (Tabelle 23) um einen Nukleotidaustausch differieren. Der Sequenzunterschied an dieser Position konnte nicht durch ein Restriktionsenzym detektiert werden. Ebenso konnte beim Nachweis der für *CSN3*B* spezifischen Banden auch die synonyme Variante *CSN3*B'* vorliegen.

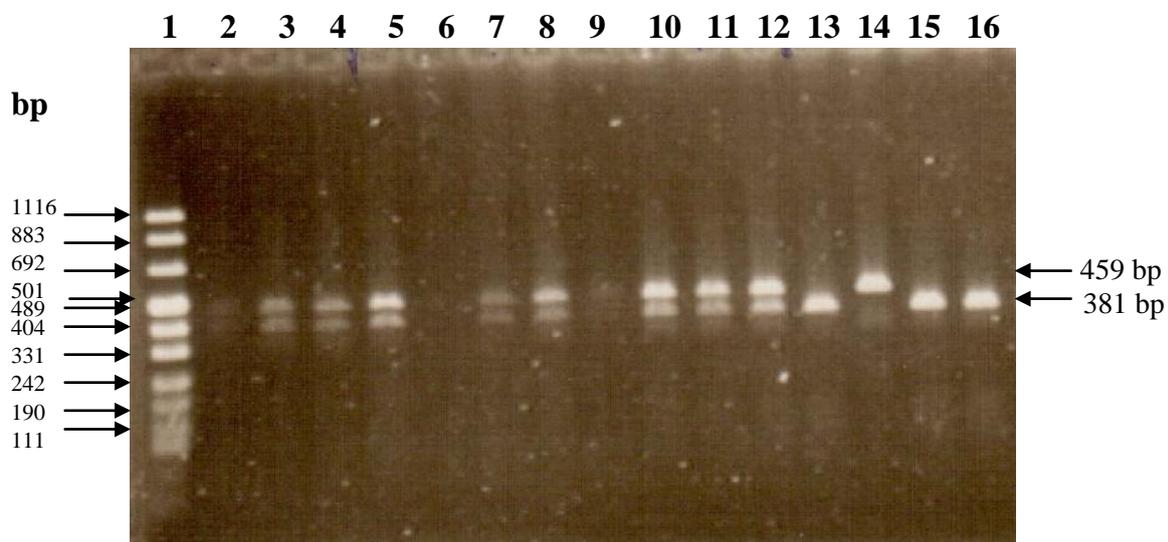


Abbildung 7: Auftrennung von 459 bp DNA-Fragmenten, bei deren DNA ein oder beide Allele nach PCR-SSCP des 405 bp Fragment als *CSN3*D*, *F*, *I*, *K* oder *L* identifiziert wurden, nach PCR-RFLP mit *Alw* 44I. PCR-Produkt in 13,15 und 16 homozygot für Cytosin, in 14 homozygot für Thymin, in 2, 3, 4, 5, 7-12 heterozygot für Thymin/Cytosin an Position 591. Kein PCR-Produkt in 6 darstellbar.

Tabelle 23: Variable Nukleotidpositionen im Exon 4 des κ -Kaseingens im Vergleich mit der Referenzsequenz mit der Gendatenbankeingangsnummer X60763. Allele, die zu Beginn dieser Arbeit noch nicht charakterisiert waren, sind grau hervorgehoben. Kursiv gedruckte Nukleotidaustausche führen nicht zu einer Änderung der Aminosäuresequenzen.

Allel- Bez. 2007	Eingangsnr. Gendatenbank	<u>Nucleotidposition</u>														veröffentlichte Referenz	
		170	245	247	274	284	290	298	309	384	385	471	509	550	583		591
A	X60763	C	T	A	A	G	G	G	G	G	A	G	A	T	C	T	COLL et al. 1993
B	AF434988												A				JANN et al. 2004
	AF485340												A				YAHYAOU I et al. 2001
B'	AY166706	T											A				JANN et al. 2004
B''	AY166707						T						A				JANN et al. 2004
C	AY350425		C			A			A		A				T	C	PRINZENBERG et al. 2005
C'	AF485341		C			A			A		A	G		T	C		YAHYAOU I et al. 2001
D	AY027868		C	G					A		A					C	CAROLI et al. 2004
	AY090465		C	G					A		A					C	YAHYAOU I et al. 2001
E	AF486523										G	A					ANGIOLILLO et al. 2002
F	AY090466		C								A					C	YAHYAOU I et al. 2003
G	AY090467		C						A		A					C	YAHYAOU I et al. 2003
H	AF521022				G						A						JANN et al. 2004
I	AY166710								A		A						JANN et al. 2004
J	AY166711						G				A						JANN et al. 2004
K	AY166709			G							A						JANN et al. 2004
L	AY166708								A		A					C	JANN et al. 2004
M	AY428577		C							A	A		C		C		PRINZENBERG et al. 2005

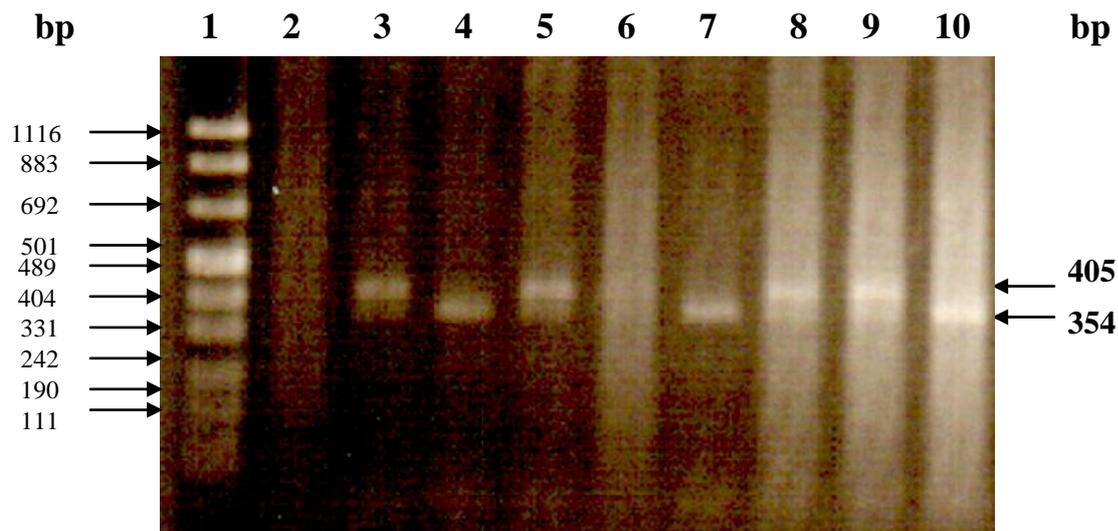


Abbildung 8: Auftrennung der 406bp DNA Fragmente, von denen ein oder beide Allele nach PCR-SSCP als *CSN3**D, F, I, K, oder L identifiziert wurden, nach PCR-RFLP mit *Bse* NI. PCR-Produkte in 4, 7, und 10 homozygot für Guanin, in 3, 5, 8 und 9 heterozygot für Adenin/Guanin an Position 309.

Im Rahmen der Typisierung mit dem optimierten Protokoll und den eingesetzten sequenzierten Standard-DNA-Proben, konnten DNA-Proben identifiziert werden, die ein unbekanntes Laufverhalten im PAGE-Gel zeigten. Diese Proben wurden zunächst mit X und Y bezeichnet (Abbildung 9 und 10) und die betreffenden *CSN3* enthaltenden Abschnitte einer Sequenzanalyse unterzogen. Ausschnitte aus den Ergebnissen der Sequenzanalyse, die die Punktmutationen der Variante Y enthalten, sind den Abbildungen 11 und 12 zu entnehmen.

In Abbildung 10 sind die Standard-Proben und die Proben X und Y ihrer Laufgeschwindigkeit nach geordnet dargestellt, wobei die Varianten mit der geringsten Laufgeschwindigkeit links aufgetragen wurden. Der geringste Unterschied in der Migrationsgeschwindigkeit findet sich zwischen den Allelen *CSN3**A und B/B'. Die seltenen Varianten *CSN3**B'', G, H und J wurden nicht mit aufgetragen.

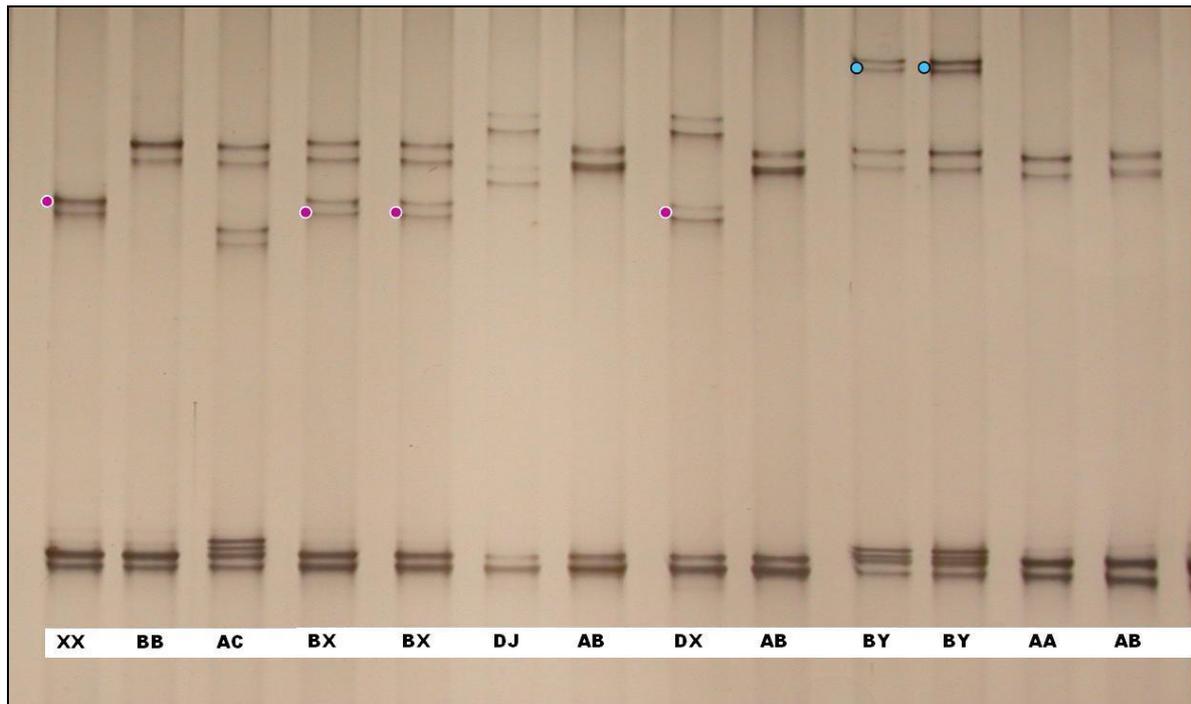


Abbildung 9: Identifizierung zweier Bandenmuster (X und Y) im Rahmen der Typisierung des Probenmaterials am caprinen *CSN*3*, die ein unbekanntes Laufverhalten bei der Polyacrylamidgelelektrophorese zeigen. Die zur Identifizierung der unbekanntenen Allele herangezogenen Banden sind mit einem Kreis gekennzeichnet und wurden zunächst als X und Y bezeichnet.

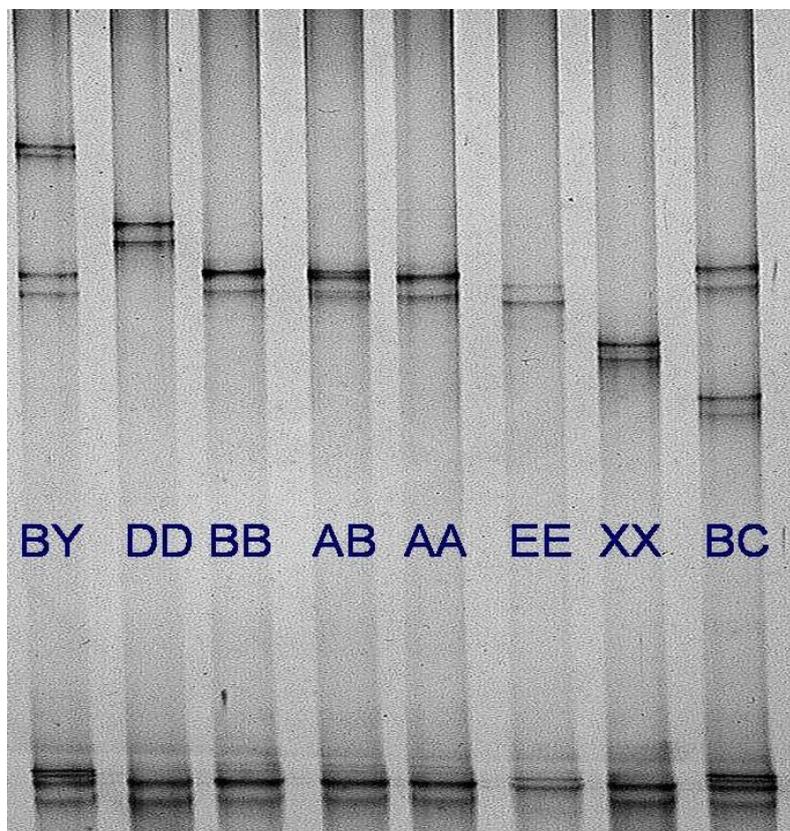


Abbildung 10: Sequenzierte Standardproben des caprinen *CSN3* (*CSN3**A, B, C, D, E) im PCR-SSCP-Gel nach Laufgeschwindigkeit geordnet (Es fehlen *CSN3**G, H, J und B') im Vergleich mit X und Y.

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

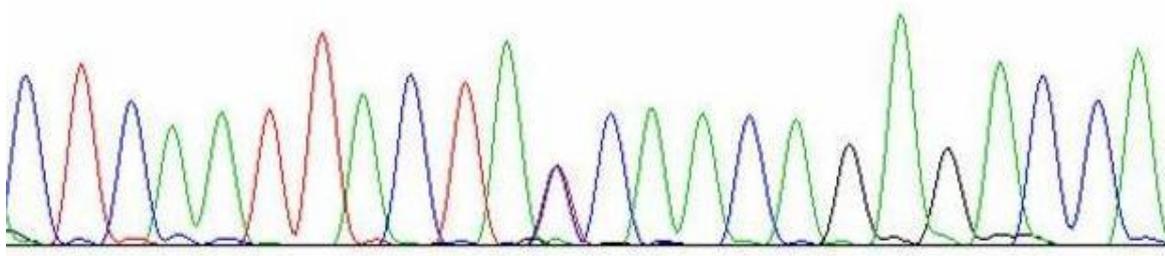


Abbildung 11: Sequenzabschnitt aus Exon 4 von *CSN3**M mit C/T (Y) Austausch an Position 385 nach Referenzsequenz von COLL (1993).

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

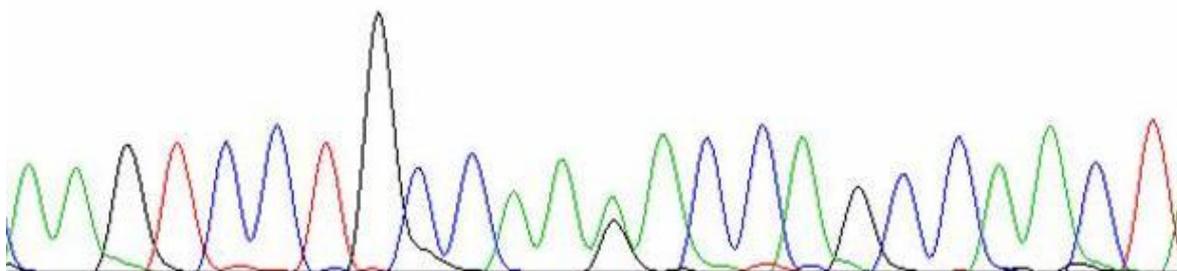


Abbildung 12: Sequenzabschnitt aus Exon 4 von *CSN3**M mit A/G (R) Austausch an Position 550 nach Referenzsequenz von COLL (1993).

Die neu charakterisierten Allele, die hier bisher als X und Y bezeichnet wurden, heißen jetzt der aktuellen Nomenklatur folgend *CSN3**C und *CSN3**M. Ihre Sequenz wurde an die Genbank übermittelt und ist dort unter den Zugangsnummern AY350425 und AY428577 gespeichert (Tabelle 23). *CSN3**C enthält eine synonyme Mutation weniger als die bereits charakterisierte Variante *CSN3**C'.

*CSN3**M weist Mutationen an fünf Positionen auf. Drei dieser Positionen sind von den bisher in der Genbank befindlichen Allelen bekannt, während Mutationen an den beiden zusätzlichen Positionen noch nicht beschrieben wurden. Die Nukleotidaustausche an den neuen Positionen 384 und 550, ausgehend von der Referenzsequenz nach COLL (1993), führen bei-

de zu Aminosäuresubstitutionen im Protein. Alle variablen Positionen können der Tabelle 23 entnommen werden. Die Abbildungen 11 und 12 zeigen die bei der Sequenzierung gefundenen Basenaustausche. Der SNP an Position 550 schafft eine Erkennungssequenz für das Enzym *Pst I*, die dafür genutzt wurde, das durch PCR-SSCP ermittelte Vorliegen dieser Mutation bei *CSN3**M** Allelen zu verifizieren (Abbildung 13). Zusätzlich ergibt sich dadurch die Möglichkeit Proben, die nur mit den bisher gängigen Kombinationen von PCR-RFLPs genotypisiert wurden, auf diesen SNP zu untersuchen und damit *CSN3**F** gegenüber der Variante *CSN3**M** abzugrenzen.

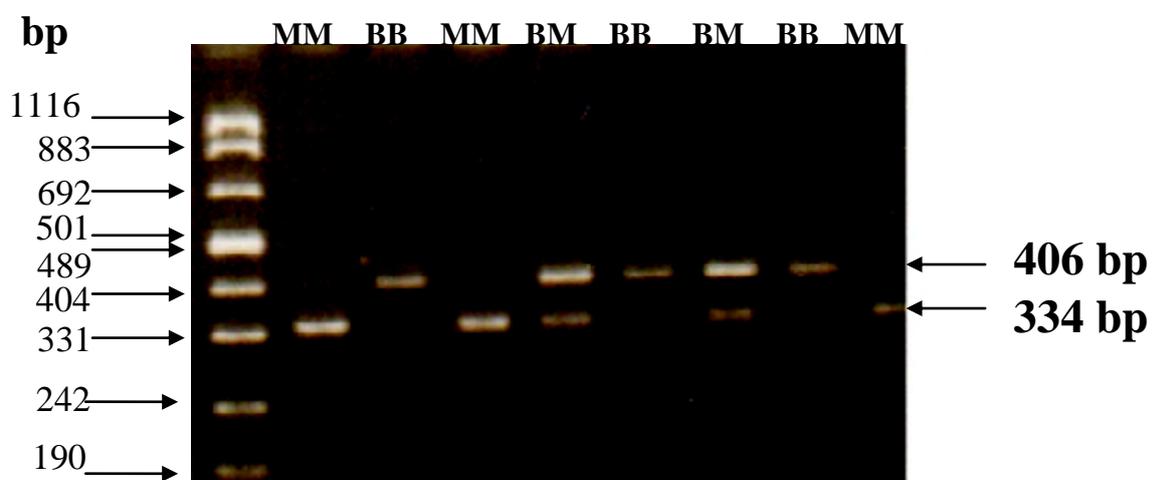


Abbildung 13: Auftrennung der 406 bp PCR-Fragmente nach PCR-RFLP mit *Pst I*. MM homozygot für Cytosin (*CSN3**M**), BB homozygot für Thymin, BM heterozygot für Cytosin/Thymin an Position 550.

4.1.1.1 Frequenzen der *CSN3* Allele der Ziege

Alle geschätzten Allelfrequenzen können der Tabelle 24 entnommen werden.

Die Allele *CSN3**A** und *CSN3**B*/*B*'* treten in allen Rassen auf, *CSN3**B*/*B*'* zeigt in 47 der 50 untersuchten Rassen die höchste Allelfrequenz, gefolgt von *CSN3**A**, das bei den österreichischen Tauernschecken, den französischen Alpenziegen und den italienischen Valdostanziegen die höchste Allelfrequenz aufweist. *CSN3**D*/*L** tritt bei den jordanischen und türkischen Ziegen auf in hohen Frequenzen zwischen 25 % (JOBAL) und 34 % (TKGUR). Außerdem wurde für die italienischen Orobica eine Allelfrequenz von 29 % ermittelt. Insgesamt wurden die Allele *CSN3**D*/*L** bei allen 10 Rassen Asiens, bei 27 von 39 Rassen Europas, aber bei keiner afrikanischen Rasse typisiert.

Neben den Allelen *CSN3**A, *B/B'* und *D/L* konnten auch bisher nur einzelnen Populationen zugeschriebene, seltene oder noch nicht beschriebene Varianten dargestellt werden.

Das Allel *CSN3**E wurde bei den italienischen Grigia molisana, bei Tieren der Rasse Polish improved fawn, den türkischen Angoraziegen aus dem Gebiet Lalahan Tiftik bzw. Yerköy und den albanischen Rassen Mati und Hasi nachgewiesen. Bei der Rasse Grigia molisana konnte die in dieser Untersuchung höchste Allelfrequenz für *CSN3**E von 7 % geschätzt werden. Weitere seltene Allele, wie *CSN3**J traten bei westafrikanischen Zwergziegen und bei den Bunten Deutschen Edelziegen und den Thüringer Waldziegen mit sehr niedriger Allelfrequenz von 1 % auf.

Die Untersuchungen haben ergeben, dass das bisher nicht beschriebene *CSN3**C bei 61 % aller untersuchten Rassen auftrat und die höchsten Allelfrequenzen von 33 % bzw. 20 % für dieses Allel bei den österreichischen Rassen Pinzgauer und Tauernschecken geschätzt werden konnten. Das seltene *CSN3**C' konnte in dieser Arbeit bei 13 der 51 untersuchten Rassen typisiert werden. Die für *CSN3**C' höchste Allelfrequenz von 16 % wurde bei der italienischen Rasse Valdostana festgestellt.

*CSN3**M trat stets in niedrigen Allelfrequenzen zwischen 2 % und 10 % auf und konnte vor allem bei albanischen, türkischen, saudiarabischen und in wenigen italienischen Rassen typisiert werden. In insgesamt 34 % der Rassen konnte dieses Allel dargestellt werden.

Im untersuchten Tiermaterial traten die Allele *CSN3**B'', *I*, *K*, *H* und *F* nicht auf.

Rassecode	n	A	B/B'	B''	C	C'	D/L	E	F	G	H	I	J	K	M
SPFLR	62	0,39	0,61												
SPGDR	62	0,37	0,63												
SPMAL	62	0,30	0,68				0,02								
SPPYY	62	0,32	0,61				0,05								0,02
SPVRT	62	0,35	0,65												
AFRIKA															
Rassecode	n	A	B/B'	B''	C	C'	D/L	E	F	G	H	I	J	K	M
NKBOG	60	0,40	0,60												
NKRSR	64	0,37	0,61												0,02
NKWAD	62	0,30	0,68		0,02										
ASIEN															
Rassecode	n	A	B/B'	B''	C	C'	D/L	E	F	G	H	I	J	K	M
JOBAL	44	0,21	0,52		0,02		0,25								
SABES	62	0,16	0,74				0,03								0,07
SANAG	62	0,13	0,77				0,03								0,07
TKABA	60	0,20	0,40		0,02		0,33			0,02					0,03
TKYER	46	0,13	0,63		0,02		0,18	0,02		0,02					
TKANG	62	0,24	0,45		0,02		0,26								0,03
TKGUR	62	0,16	0,45				0,34								0,07
TKHAI	62	0,34	0,43		0,02		0,19								0,02
TKLTK	44	0,18	0,71		0,02		0,07	0,02							
TKKIL	100	0,28	0,29		0,03	0,01	0,25			0,14					

Die Abkürzung der Länder sind: Albanien (AL), Österreich (AU), Schweiz (CH), Deutschland (DE), Frankreich (FR), Griechenland (GR), Italien (IT), Polen (PL), Portugal (PO), Rumänien (RO), Spanien (SP), Nigeria/Kamerun (NK), Jordanien (JO), Saudi-Arabien (SA), Türkei (TK).

4.1.1.2 Hardy-Weinberg Gleichgewicht

Am caprinen *CSN3* wurde bei einem Test über alle Rassen keine signifikante Abweichung vom Hardy-Weinberg Gewicht festgestellt. Keine der einzelnen Rassen wich an diesem Genort signifikant vom HWG ab.

4.1.1.3 Genetische Diversität am caprinen *CSN3*

Die beobachtete Heterozygotie an diesem Genort betrug 0,500, die durchschnittliche erwartete Heterozygotie über alle Rassen wurde auf 0,575 geschätzt. Der Anteil an genetischer Diversität, der auf die Diversität zwischen den einzelnen Rassen zurückzuführen ist, an der

gesamten genetischen Diversität diese Genortes wird durch einen G_{ST} -Wert von 0,066 ausgedrückt (Tabelle 31). Der F_{ST} -Wert wurde mit 0,078 geschätzt.

Bei sechs der Rassen konnten nur jeweils die beiden Allele *CSN3**A und B genotypisiert werden. Es handelte sich hierbei um drei der fünf untersuchten spanischen Rassen namens Florida (SPFLR), Guadarrama (SPGDR) und Verata (SPVRT), um die italienischen Sarda (ITSAR), die französischen Alpenziegen (FRALP) und die Bornoziegen aus Nigeria und Kamerun (NIBOG). Die H_E der spanischen Rassen lag zwischen 0,454 bei Malaguena (SPMAL) und 0,527 bei Payoya (SPPYY). Ebenfalls etwas niedriger als der durchschnittliche Wert lagen die französischen Rassen mit einer H_E von 0,399 bei den korsischen Ziegen (FRCOR) bis 0,503 bei den französischen Alpenziegen (FRALP), die saudi-arabischen Beeshi (SABES) und Najrani (SANAJ) mit einer H_E von 0,427 respektive 0,385 und die afrikanischen Rassen. Hier betrug die geringste H_E 0,453 bei Westafrican Dwarf Goat (NIWAD) und die höchste 0,496 bei Red Sokoto (NIRSG). Die italienischen Rassen wiesen sowohl hohe H_E -Werte von beispielsweise 0,67 bei den Valdostanziegen (ITVAL) oder auch 0,665 bei den Bionda dell Adamello (ITBIO) auf, als auch sehr niedrige Werte wie 0,337 bzw. 0,338 bei Sarda und Argentata (ITARG). Die Tauernschecken und die Pinzgauerziegen aus Österreich erreichten eine H_E von 0,695 bzw. 0,682. Überdurchschnittlich hohe Werte wurden außerdem bei den albanischen und türkischen Rassen erreicht. Hier wurden bei vier von sechs bzw. bei fünf von sieben Rassen Werte über 0,619 erreicht.

Die geringste effektive Allelezahl (N_E) 1,18 wurde für die Rasse DETWZ ermittelt. Es traten hier 3 der 6 in der Arbeit nachgewiesenen *CSN3* Allele auf und die errechnete Gene diversity betrug 0,152. Maximalwerte wurden bei den türkischen Haarziegen aus der Region Kil Keci erreicht. Hier betrug die N_E 4,07, 6 Allele konnten innerhalb dieser Rasse dargestellt werden und die „Genetische Diversität“ ausgedrückt in der erwarteten Heterozygotie (H_E) nach NEI wurde auf 0,761 geschätzt (Tabelle 26).

34 der 50 untersuchten Rassen wiesen positive F_{IS} -Werte auf mit z. T. sehr hohe Werten von 0,375 bei den französischen Pyrenäenziegen (FRPYR) oder auch 0,354 bei den albanischen Muzhake (ALMUZ). Bei den übrigen 16 Rassen wurden negative F_{IS} -Werte ermittelt.

Tabelle 25: Anzahl der bei den Ziegenrassen gefundenen Allele (No_A) des Exon 4 des κ -Kaseingens, F_{IS} -Werte nach Weir & Cockerham, effektive Allelzahl (N_E), allelic richness (AR) und genetische Diversität H_E nach NEI für die einzelnen Rassen im Exon 4 des κ -Kaseingenlocus (*CSN3*).

Europa Rassecode	W&C Fis	No_A	N_e	AR	H_E nach NEI (1987)
ALCAP	-0,055	6	1,82	5,460	0,458
ALDUK	0,02	6	2,92	5,701	0,669
ALHAS	0,023	5	3,15	4,973	0,694
ALLIQ	0,227	3	2,34	3,000	0,584
ALMAT	0,055	5	3,26	4,931	0,706
ALMUZ	0,354	5	2,53	4,932	0,619
DEBDE	0,024	6	2,40	4,852	0,588
DETWZ	-0,068	3	1,18	2,482	0,152
DEWDE	0,111	5	2,42	4,804	0,598
CHALP	0,175	6	2,18	4,112	0,547
CHGRS	-0,003	3	2,03	2,995	0,515
CHPCG	0,14	5	1,50	4,338	0,338
CHSGB	0,338	3	1,75	2,999	0,439
CHVBN	0,049	3	2,00	2,710	0,509
FRALP	-0,356	2	2,00	2,000	0,503
FRCOR	-0,051	3	1,65	2,999	0,399
FRPYR	0,375	4	1,94	3,517	0,497
FRROV	-0,119	4	1,66	3,419	0,404
GRGRG	-0,041	5	2,57	4,838	0,620
GRSKO	-0,163	5	1,87	4,129	0,472
AUPIZ	-0,099	4	3,07	3,984	0,682
AUTAS	0,151	5	3,17	4,813	0,695
ITARG	0,331	3	1,49	2,999	0,338
ITBIO	0,175	4	2,87	3,995	0,665
ITCAM	0,082	3	2,07	2,919	0,527
ITGIR	0,157	4	2,40	3,906	0,593
ITGMO	0,138	5	2,23	4,908	0,561
ITORO	-0,176	4	2,65	3,919	0,631
ITSAR	-0,054	2	1,5	2,000	0,337
ITVAL	0,085	4	2,92	3,999	0,670
PLBUK	-0,115	4	1,84	3,419	0,463

Europa						
Rassecode	W&C Fis	No_A	Ne	AR	H_E	
POBRA	0,216	4	2,18	3.717	0,553	
ROCAR	0,234	6	2,27	5.491	0,571	
SPFLR	0,065	2	1,90	2.000	0,483	
SPGDR	0,118	2	1,88	2.000	0,475	
SPMAL	0,006	3	1,80	2.710	0,454	
SPPYY	0,144	4	2,01	3.688	0,527	
SPVRT	0,03	2	1,84	2.000	0,466	
AFRIKA						
NIBOG	0,321	2	1,92	2.000	0,491	
NIRSG	0,055	3	1,95	2.688	0,496	
NIWAD	-0,139	3	1,80	2.710	0,453	
ASIEN						
JOBAL	0,146	4	2,64	4.000	0,639	
SABES	0,321	4	1,72	3.914	0,427	
SANAG	-0,006	4	1,60	3.914	0,385	
TKABA	-0,002	6	3,20	5.399	0,699	
TKYER	0,08	6	2,24	5.870	0,567	
TKANG	0,101	5	3,03	4.629	0,682	
TKGUR	0,131	4	2,91	3.995	0,668	
TKHAI	-0,063	5	2,92	4.419	0,668	
TKLTK	0,143	5	1,87	5.000	0,477	
TKKIL	-0,077	6	4,07	5.268	0,761	

4.1.1.4 Phylogenetische Bäume auf Basis der caprinen CSN3 Sequenzen ermittelt mit einer „Maximum Parsimony Analysis“

Die auf Basis der Nukleotidsequenzen ermittelten Übereinstimmungsbäume („Consensus Trees“) (Abbildung 14 und 15) zeigen die genetische Verwandtschaft und die mögliche Evolution der verschiedenen Varianten, indem sie die Punktmutationen als einzelne evolutionäre Schritte betrachten. Zusätzlich wurden die Allele der Wildformen *Capra pyrenaica* und *Capra aegagrus* miteinbezogen, wobei *Capra pyrenaica* dem CSN3*F und *Capra aegagrus* CSN3*B entspricht (URL 11). In Abbildung 15 wurde als mögliche Ausgangssequenz CSN3*B bzw. CSN3* *Capra aegagrus* ausgewählt und DAMBE generierte unter dieser Annahme und der Anwendung von „bootstrapping“ über 50 oder 100 Zufallsdatensätzen und „Jackknifing“ über 50 oder 1000 Datensätzen einen gewurzelten „Maximum-Parsimony-Consensus“- Baum. In Abbildung 14 wurden alle Allele ohne Ausgangssequenz mit den gleichen Optionen auf maximale Übereinstimmung analysiert und ein ungewurzelter Baum entstand. Beide Bäume ergeben ähnliche Ergebnisse in Bezug auf die wahrscheinliche Entwicklung der Allele des caprinen CSN3. Im ungewurzelter Baum ergeben sich zwei Hauptäste, die die Varianten in zwei Hauptgruppen CSN3*B/C. *aegagrus*, A, J, B'', B', K, E und I bzw. CSN3*L, D, G, C, C', M, F/C. *pyrenaica* aufteilen. Innerhalb dieser Gruppen ergeben sich jeweils eigene Äste für CSN3*C und C', für CSN3*F/C. *pyrenaica* und M, für CSN3*A und B/C. *aegagrus*, CSN3*B'' und J und außerdem für CSN3*B', K und E. Im gewurzelten Baum mit der fiktiven Ausgangssequenz CSN3*B/C. *aegagrus* stellt sich dies ebenso dar. Die Varianten CSN3* C, C', D, F/C. *pyrenaica*, G, L und M haben alle ein Cytosin an Position 591 im Gegensatz zu allen anderen Varianten, die an dieser Stelle ein Thymin aufweisen. Mit Ausnahme von CSN3*L haben die Varianten dieses Clusters ebenso ein Cytosin an Position 245 gemeinsam, welches in den übrigen Allelen nicht auftritt.

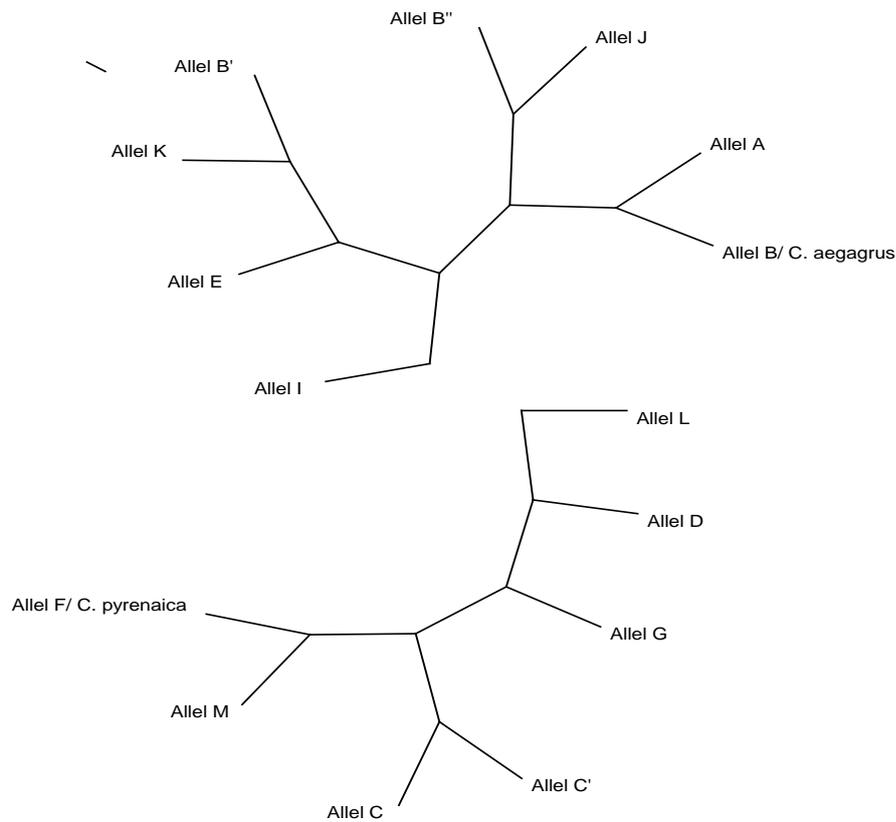


Abbildung 14: Auf Nukleotidsequenzen der *CSN3*-Allele basierender „Maximum-Parsimony-Consensus“-Baum, ungewurzelt

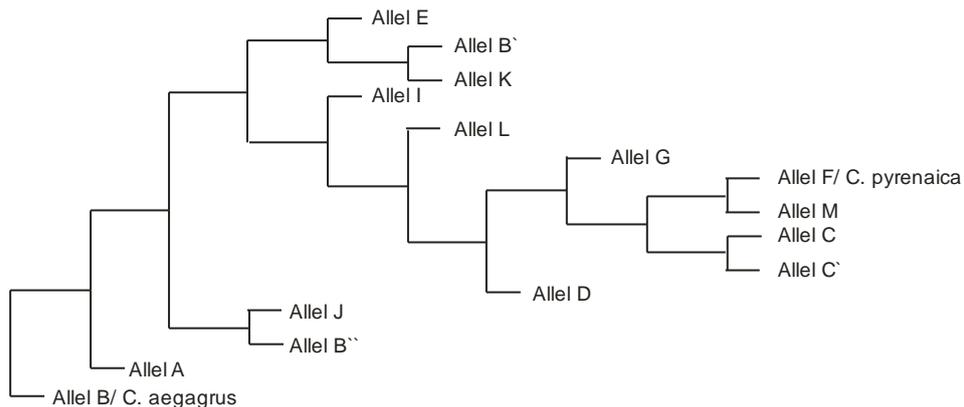


Abbildung 15: Gewurzelter, auf Nukleotidsequenzen der *CSN3*-Allele basierender „Maximum-Parsimony-Consensus“-Baum, der Aufschluss über Verwandtschaftsverhältnisse und die wahrscheinliche evolutionäre Entwicklung der caprinen *CSN3*-DNA gibt. Allel B/ *C. aegagrus* wurde hier als Ausgangssequenz ausgewählt.

4.1.2 Untersuchung des *CSN3* Exon 4 beim Schaf

4.1.2.1 Mutationsuche

Bei 60 aus dem Tiermaterial ausgewählten Tieren unterschiedlicher geographischer Herkunft wurde eine PCR-SSCP-Analyse eines 406 bp umfassenden Sequenzabschnittes des Exon 4 des κ -Kaseingens, welches etwa 95 % des für das Protein kodierenden Bereichs abdeckt, durchgeführt. Für die PCR wurden die Primer aus Tabelle 10 nach CHESSA et al. (2003) verwendet. Die Bandenmuster waren wie in einem Ausschnitt in Abbildung 16 dargestellt alle gleichförmig und gaben somit keinen Hinweis auf Mutationen, die zu einem spezifisch veränderten Laufverhalten führen.

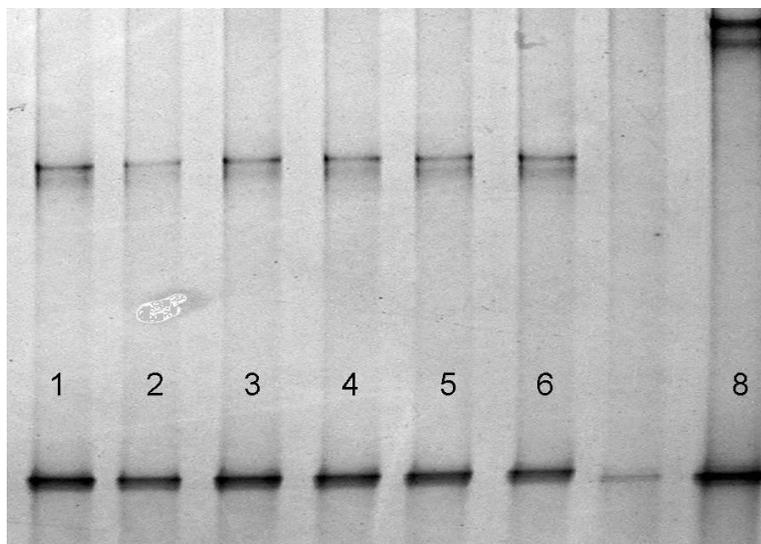


Abbildung 16: Ausschnitt des Ergebnisses der PCR-SSCP-Analyse eines 406 bp umfassenden PCR-Fragments aus dem Exon 4 des κ -Kaseingens unter den für die caprinen Allele entwickelten Bedingungen (12°C, 275 Volt, 16 h). In 1-6 befinden sich ovine *CSN3* Exon 4 Fragmente verschiedener Individuen, während in 8 ein homologes caprines PCR-Fragment als Vergleich aufgetragen wurde.

4.1.2.2 Sequenzanalyse

Es wurde eine Probenauswahl von je 3 Individuen von 11 verschiedenen Rassen aus 7 europäischen Ländern und der Türkei getroffen. Es handelte sich um die Rassen Welsh Mountain Sheep aus dem Vereinigten Königreich, um Rubio del Molar und Merinoschafe aus Spanien, um die Graue gehörnte Heidschnucke und das Rhönschaf aus Deutschland, um die polnische Rasse Zelazna, die italienische Bergamasca und Delle Langhe die rumänische Tsigai, die griechische Karagouniko und die türkische Akkaraman. Diese 33 Tiere wurden durch Sequenzierung des 558 bp umfassenden Sequenzabschnitts untersucht, um mögliche SNPs zu ermitteln. Die PCR wurde mit den Primern aus Tabelle 10 nach JANN et al. (2004) durchgeführt. Die Sequenzanalyse führte, wie in Abbildung 17 zu sehen, zur Identifizierung eines

Nukleotidaustausch an Position 237 nach Referenz cDNA Sequenz X51822 (FURET et al. 1990). Diese C/T Transition führt nicht zum Austausch einer Aminosäure in der Sequenz des reifen κ -Kaseins und stellt somit eine synonyme Mutation dar. Es konnten keine weiteren SNPs dargestellt werden. Die Nukleotidsubstitution von Thymin zu Cytosin verändert die in der Sequenz enthaltene Erkennungsstelle der Restriktionsendonuklease *Bfu* I (5'-GTATCCN-3'/ 3'-CATAGG(N)-5'). Allele, in denen die Mutation vorlag, wiesen keinen Längenpolymorphismus nach PCR-RFLP-Analyse mit dem Enzym *Bfu* I auf (Abbildung 18).

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

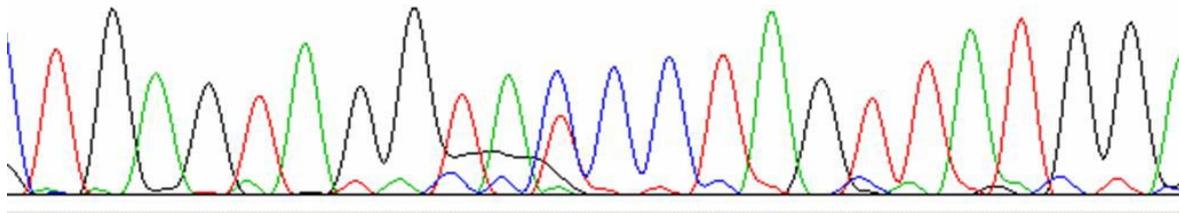


Abbildung 17: Sequenzabschnitt aus *CSN3* Exon 4 eines Schafes der britischen Rasse Welsh Mountain Sheep mit einer C/T Transition an Position 237 (markiert durch ein y = C/T) nach Referenzsequenz von COLL (1993).

4.1.2.3 Allelfrequenzen

Mit Ausnahme der Grauen gehörnten Heidschnucke (DEGGH) trat der Nukleotidaustausch in allen untersuchten Rassen auf. Für das Allel mit Thymin an Position 237 nach Referenz cDNA Sequenz X51822 (FURET et al. 1990) wurden in 53 der 55 Rassen die höheren Allelfrequenzen geschätzt (Tabelle 25). Nur bei einer rumänischen und einer spanischen Merinopopulation konnte für das Allel, das durch ein Cytosin an der polymorphen Position charakterisiert ist, die höhere Frequenz ermittelt werden.

Die durchschnittliche Frequenz des seltenen Allels über alle Rassen betrug 21 %, bei Extremwerten von 3 % bei Scottish Blackface bis 74 % bei den rumänischen Merinoschafen.

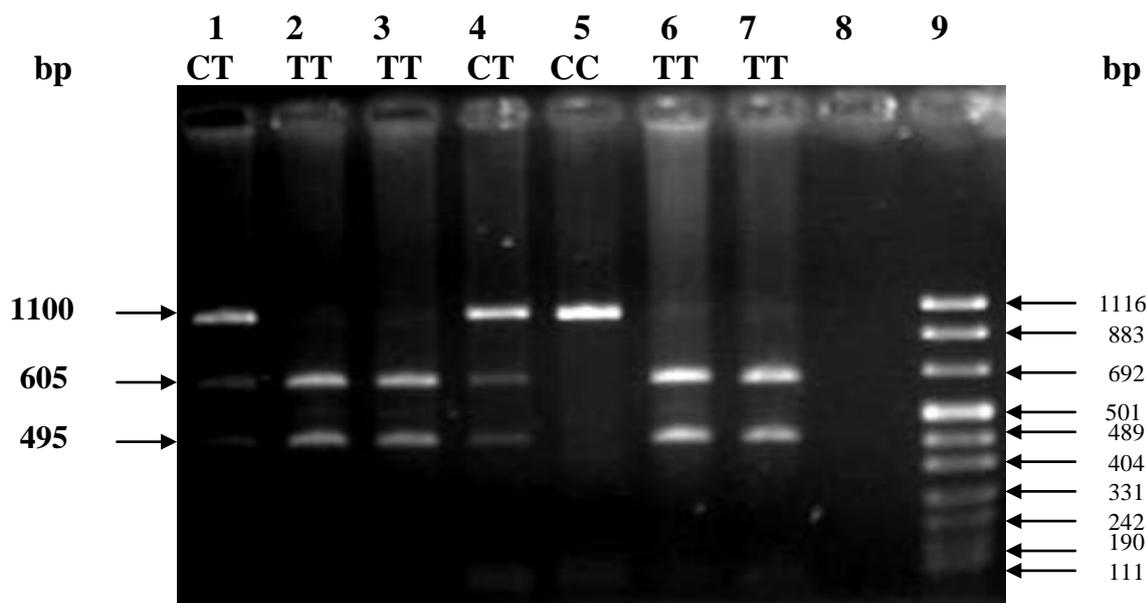


Abbildung 18: Ergebnis der Auftrennung der Fragmente des ovinen *CSN3*, die durch PCR-RFLP mit dem Restriktionsenzym *Bfu* I entstanden sind. Die PCR-Produkte in 1 und 4 sind heterozygot für Cytosin/ Thymin, in 2, 3, 6, 7 homozygot für Thymin und in 5 homozygot für Cytosin an Position 237

4.1.2.4 Hardy-Weinberg Gleichgewicht

Der SNP im ovinen *CSN3* wich im Test über alle Schafpopulationen hoch signifikant vom Hardy-Weinberg Gleichgewicht ab ($p=0,0015$). Dies war auf eine hoch signifikante Abweichung bei neun der 57 Rassen zurückzuführen. Es handelte sich hierbei um die Rassen Rhön-schaf (DERHO), die französischen Thone et Martod (FRTHM), die griechischen Pilioritiko und Skopelos (GRPIL, GRSKO), das polnische Kaminerschaf (PLKAM), die portugiesischen Churra (POCHU), die saudischen Naemi (SANAE) die türkischen Daglic (TKDAG) und die britische Rasse Swaledale (UKSDL), in denen sich ein signifikantes Heterozygotendefizit zeigte (F_{IS} -Werte nach W&C zwischen $+0,554$ (UKSDL) und $+0,905$ (POCHU)). Die italienischen Rassen Altamura und Bergamasca (ITALT und ITBER) zeigten eine signifikante Abweichung vom HWG und F_{IS} -Werte von $+0,654$ respektive $+0,618$ (Tabelle 26).

4.1.2.5 Genetische Diversität am ovinen *CSN3*

Die beobachtete Heterozygotie des SNPs betrug $0,203$ und wich damit signifikant von der durchschnittlichen Gesamtheterozygotie des Markers über alle Populationen (H_T) von $0,327$ ab. Zur genetischen Differenzierung zwischen den Rassen trug der Marker mit 10% bei, da der F_{ST} -Wert auf $0,099$ geschätzt wurde und höchst signifikant ist (Tabelle 28). Die erwartete Heterozygotie (H_E) am ovinen *CSN3* betrug durchschnittlich über alle Rassen $0,295$. Die H_E

der einzelnen Rassen, bei denen Mutation auftrat, wich dabei deutlich vom Durchschnitt ab. So wurde der niedrigste Wert für das deutsche Merinolandschaf geschätzt (0,063), während der Maximalwert 0,514 bei einer spanischen Merinopopulation ermittelt wurde (Tabelle 26).

4.2 Polymorphismen im Interleukin-2-Gen

4.2.1 Allelfrequenzen eines synonymen A/G Basenaustauschs im Exon 1 in den verschiedenen Schafrassen

Mit Hilfe einer PCR-SSCP-Analyse wurde das ovine Exon 1 auf das Vorkommen des A/G Basenaustausches an Position 318 bezogen auf die ovine Gensequenz AF287479 untersucht. Das Migrationsverhalten der Banden nach der PCR-SSCP-Analyse ist in Abbildung 19 dargestellt. Die geschätzten Allelfrequenzen für die Rassen sind der Tabelle 26 zu entnehmen. Die durchschnittliche Frequenz des Allels mit Alanin an Position 318 (Allel A) betrug 47 %, der Minimalwert lag bei 16 %, während als Maximalwert 69 % ermittelt wurde.

4.2.1.1 Hardy-Weinberg Gleichgewicht

Nur die albanische Rasse ALRUD wich an diesem Locus signifikant vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ab. Sie zeigt einen signifikanten Heterozygotieüberschuss und wies einen F_{IS} -Wert nach W&C von -0,622 auf. Der F_{ST} -Wert des Markers wurde auf 0,038 geschätzt (Tabelle 28).

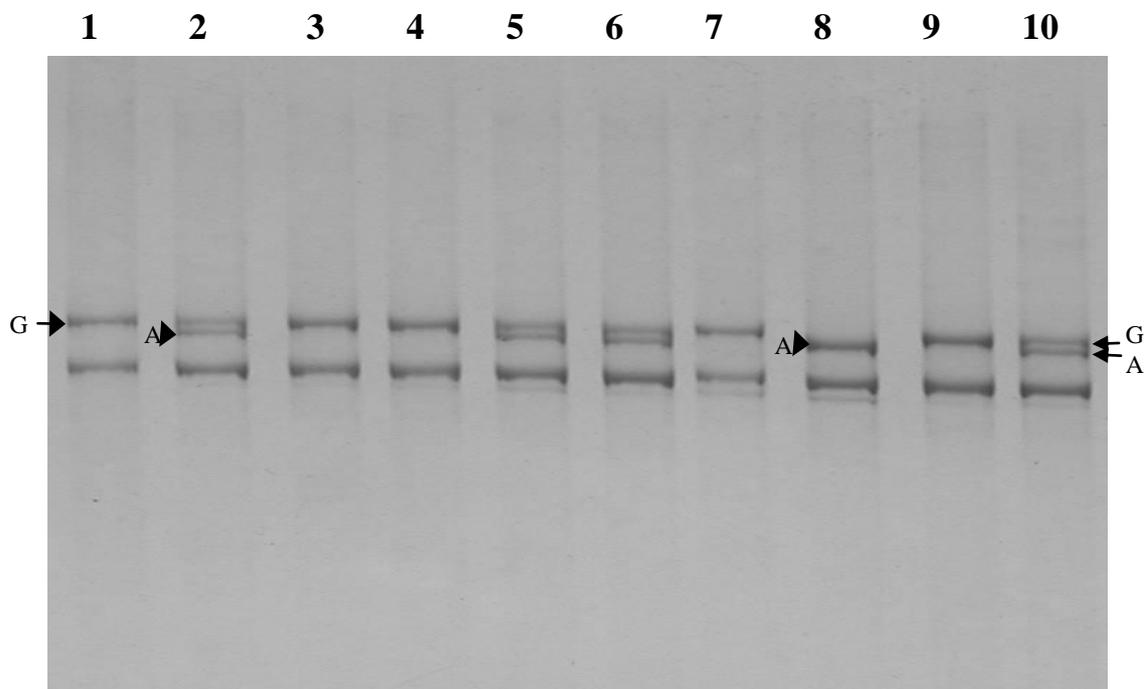


Abbildung 19: Bandenmuster im PCR-SSCP-Gel nach Silberfärbung zur Identifizierung des A/G SNPs im *IL2* Exon 1 an Position 318. Die 500 bp PCR-Fragmente in 1, 3, 4, 7, 9 sind homozygot für Guanin, in 2, 5, 6, 10 heterozygot für Adenin/Guanin, in 8 homozygot für Adenin

4.2.2 Allelfrequenzen eines C/T Austauschs im Intron 3 in den verschiedenen Schaf- rassen

Ebenfalls mit einer PCR-SSCP-Analyse (Abbildung 20) wurde das ovine Intron 3 auf eine C/T Transition an Position 3404 der ovinen Gensequenz AF287479 untersucht und die Allelfrequenzen in den Schafrassen ermittelt (Tabelle 26). Die durchschnittliche Frequenz des seltenen Allels (Allel T) über alle Rassen wurde auf 31 % geschätzt. Die Frequenzen dieses Allels variierten zwischen 10 % bei den britischen Exmoor Horn und 63 % bei den deutschen Weißen Bergschafen.

4.2.2.1 Hardy-Weinberg Gleichgewicht

Der Test auf Abweichungen vom HWG ergab, dass keine der untersuchten Rassen an diesem Genort einen signifikante Hetero- oder Homozygotenüberschuss aufwies. Der F_{ST} -Wert des SNP-Markers wurde auf 0,041 geschätzt. Die Ergebnisse der biometrischen Analysen sind in den Tabelle 26, 27 und 28 aufgelistet.

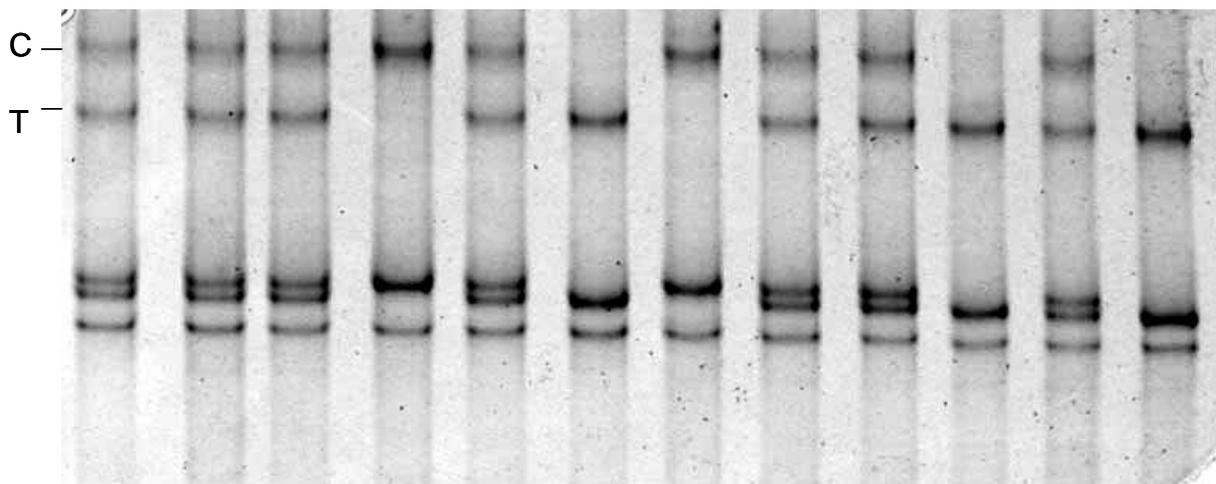


Abbildung 20: Ergebnis der Polyacrylamidgelelektrophorese der 294 bp PCR-Fragmente nach PCR-SSCP mit anschließender Silberfärbung: C/T SNP im Intron 3 des Interleukin-2-Gens beim Schaf.

Tabelle 26: Allelfrequenzen und (W&C) F_{IS} -Werte der Schafrassen für SNP in *IL2* Exon 1 (Allel A und G), Intron 3 (Allel C und T) und für SNP in *CSN3* Exon 4 (Allel C und T)

Rassecode	<i>IL2</i> Exon 1			<i>IL2</i> Intron 3			<i>CSN3</i> Exon 4		
	A	G	F_{IS}	C	T	F_{IS}	C	T	F_{IS}
ALBAR	0,5	0,5	+0,084	0,68	0,32	-0,139	0,04	0,96	-0,019
ALRUD	0,39	0,61	-0,622	0,66	0,34	-0,064	0,23	0,77	+0,459
ALSHK	0,37	0,63	-0,159	0,75	0,25	+0,039	0,14	0,86	+0,147
DEBBS	0,63	0,37	-0,304	0,56	0,44	-0,240	0,13	0,87	+0,455
DEGGH	0,29	0,71	-0,080	0,52	0,48	-0,146	0	1	
DEMLS	0,37	0,63	+0,298	0,57	0,43	+0,293	0,03	0,97	-0,017
DERHO	0,65	0,35	+0,171	0,87	0,13	-0,132	0,13	0,87	+0,721
DEWBS	0,3	0,7	-0,400	0,37	0,63	-0,556	0,09	0,91	-0,077
EGOSS	0,55	0,45	+0,408	0,48	0,52	+0,496	0,23	0,77	+0,506
FRTHM	0,45	0,55	-0,419	0,65	0,35	-0,111	0,19	0,81	+0,597
GRANO	0,65	0,35	-0,111	0,69	0,31	-0,122	0,06	0,94	-0,053
GRKAL	0,68	0,32	-0,017	0,76	0,24	+0,224	0,11	0,89	-0,111
GRKAR	0,39	0,61	-0,071	0,63	0,37	-0,020	0,10	0,90	+0,277
GRKEF	0,6	0,4	+0,011	0,77	0,23	+0,094	0,06	0,94	-0,053
GRKIM	0,42	0,58	-0,176	0,87	0,13	+0,155	0,42	0,58	+0,089
GRLES	0,52	0,48	-0,387	0,79	0,21	-0,054	0,34	0,66	+0,224
GRORI	0,5	0,5	+0,084	0,76	0,24	-0,127	0,08	0,92	+0,362
GRPIL	0,48	0,52	+0,368	0,79	0,21	-0,054	0,13	0,87	+0,721
GRSFA	0,57	0,43	-0,231	0,76	0,24	+0,049	0,06	0,94	-0,053
GRSKO	0,32	0,68	+0,130	0,9	0,1	-0,091	0,13	0,87	+0,721
HUCIK	0,16	0,84	-0,176	0,76	0,24	-0,304	0,32	0,68	+0,423
HUMER	0,5	0,5	-0,210	0,66	0,34	+0,080	0,34	0,66	+0,080
HURAC	0,65	0,35	-0,253	0,69	0,31	-0,122	0,10	0,90	+0,277
HUTSI	0,55	0,45	+0,234	0,5	0,5	-0,081	0,15	0,85	+0,364
ITALT	0,39	0,61	+0,335	0,55	0,45	-0,026	0,24	0,76	+0,654
ITBER	0,43	0,57	+0,470	0,73	0,27	+0,125	0,15	0,85	+0,618
ITGDP	0,26	0,74	+0,006	0,61	0,39	+0,065	0,27	0,73	+0,333
ITLAN	0,69	0,31	+0,030	0,6	0,4	+0,321	0,15	0,85	+0,106
ITLAT	0,43	0,57	-0,099	0,73	0,27	-0,037	0,23	0,77	-0,101
PLGOR	0,62	0,38	+0,100	0,74	0,26	-0,333	0,21	0,79	+0,140
PLKAM	0,52	0,48	-0,146	0,53	0,47	-0,478	0,19	0,81	+0,799
PLMPO	0,34	0,66	-0,354	0,58	0,42	-0,043	0,42	0,58	+0,352
PLPOM	0,58	0,42	+0,089	0,73	0,27	-0,037	0,32	0,68	+0,130
PLWRZ	0,5	0,5	+0,049	0,73	0,27	+0,13	0,11	0,89	-0,111

Rassecode	<i>IL2</i> Exon 1			<i>IL2</i> Intron			<i>CSN3</i> Exon 4		
	A	G	F _{IS}	C	T	F _{IS}	C	T	F _{IS}
PLZEL	0,43	0,57	+0,067	0,85	0,15	+0,361	0,22	0,78	+0,133
POCHU	0,48	0,52	+0,231	0,65	0,35	-0,229	0,22	0,78	+0,905
ROKAR	0,4	0,6	+0,145	0,77	0,23	-0,091	0,29	0,71	+0,233
ROMER	0,52	0,48	-0,277	0,68	0,32	-0,314	0,74	0,26	+0,006
ROTSI	0,48	0,52	+0,128	0,74	0,26	+0,174	0,21	0,79	+0,140
ROTUR	0,58	0,42	+0,089	0,74	0,26	+0,174	0,21	0,79	+0,233
SAHER	0,38	0,62	+0,100	0,66	0,34	+0,366	0,26	0,74	+0,507
SANAE	0,53	0,47	-0,215	0,81	0,19	-0,017	0,13	0,87	+0,721
SANAJ	0,39	0,61	-0,071	0,79	0,21	+0,140	0,25	0,75	+0,216
SPCLM	0,53	0,47	-0,085	0,84	0,16	-0,176	0,44	0,56	+0,202
SPMCG	0,35	0,65	+0,310	0,66	0,34	+0,080	0,04	0,96	-0,034
SPMRS	0,47	0,53	+0,045	0,61	0,39	-0,071	0,61	0,39	+0,433
SPRBM	0,27	0,73	-0,037	0,6	0,4	-0,234	0,43	0,57	+0,140
SPREF	0,43	0,57	+0,032	0,68	0,32	-0,165	0,25	0,75	+0,202
SPSGR	0,42	0,58	-0,043	0,77	0,23	-0,091	0,11	0,89	+0,355
TKAKK	0,47	0,53	+0,153	0,81	0,19	+0,141	0,15	0,85	-0,143
TKDAG	0,45	0,55	-0,156	0,73	0,27	-0,200	0,24	0,76	+0,571
TKKRY	0,53	0,47	-0,596	0,71	0,29	+0,233	0,23	0,77	+0,270
TKMOR	0,31	0,69	+0,181	0,77	0,23	-0,091	0,33	0,67	+0,474
UKEXH	0,65	0,35	+0,030	0,9	0,1	-0,091	0,33	0,67	+0,474
UKSBF	0,55	0,45	+0,234	0,73	0,27	+0,446	0,03	0,97	1
UKSDL	0,37	0,63	-0,298	0,47	0,53	-0,215	0,34	0,66	+0,554
UKWMT	0,5	0,5	+0,177	0,66	0,34	+0,080	0,16	0,84	+0,300

4.2.2.2 Genetische Diversität der untersuchten Abschnitte des *IL2* bei den zur Analyse eingesetzten Schafrassen

Die beobachtete und die durchschnittliche erwartete Heterozygotie sowohl innerhalb der Subpopulation (H_S) als auch im Durchschnitt über alle Populationen (H_T) wichen nicht signifikant voneinander ab. Die durchschnittliche beobachtete Heterozygotie der beiden biallelen Marker im *IL2*-Gen betrug 0,488 bzw. 0,414. Zur genetischen Diversität zwischen den Rassen trugen die beiden SNP-Marker mit einem D_{ST} -Wert von 0,018 und 0,019 bei, so dass der Koeffizient der Gendifferenzierung (G_{ST}) auf 0,039 respektive 0,044 geschätzt wurde. Die F_{IS} -Werte über alle Rassen waren für beide Marker nicht signifikant unterschiedlich von 0 (Tabelle 27 und

28). Die erwarteten Heterozygotiewerte der einzelnen Rassen für die jeweiligen Marker und über alle Marker unter Annahme des HWG sind in der Tabelle 26 aufgeführt. Die H_E -Werte für die einzelnen Rassen am *IL2* Exon 1 lagen zwischen 0,274 bei den ungarischen Cikta und 0,517 bei den türkischen Akkaraman. Insgesamt lagen die Rassen sehr nahe am Durchschnittswert von 0,488. Am *IL2* Intron 3 variierten die Werte der einzelnen Rassen etwas deutlicher vom Durchschnitt. So wurde die H_E bei den englischen Exmoor Horn und den griechischen Skopelos mit dem Minimalwert von 0,177 und bei den ägyptischen Ossimi mit dem höchsten Wert von 0,512 geschätzt. Die durchschnittliche H_E der einzelnen Rassen über die drei betrachteten Marker lag zwischen 0,214 bei den englischen Exmoor Horn und 0,501 bei einer spanischen Merinopopulation.

Tabelle 27: Durchschnittliche erwartete Heterozygotiewerte (H_E) unter Annahme des HWG zur Beurteilung der Gendiversität nach NEI für die einzelnen Rassen je Genort und über alle drei Genorte

Rassecode	H_E CSN3 Exon 4	H_E IL2 Exon 1	H_E IL2 Intron 3	H_E gesamt
ALBAR	0,070	0,509	0,439	0,339
ALRUD	0,358	0,477	0,455	0,430
ALSHK	0,243	0,473	0,382	0,366
DEBBS	0,229	0,479	0,504	0,404
DEGGH	0,000	0,418	0,506	0,308
DEMLS	0,063	0,475	0,502	0,347
DERHO	0,231	0,467	0,228	0,309
DEWBS	0,231	0,429	0,471	0,377
EGOSS	0,352	0,507	0,512	0,457
FRTHM	0,320	0,500	0,465	0,428
GRANO	0,123	0,465	0,431	0,340
GRKAL	0,203	0,444	0,374	0,340
GRKAR	0,178	0,482	0,474	0,378
GRKEF	0,123	0,489	0,356	0,323
GRKIM	0,496	0,494	0,229	0,406
GRLES	0,457	0,505	0,337	0,433
GRORI	0,152	0,509	0,372	0,344
GRPIL	0,231	0,511	0,337	0,360
GRSFA	0,123	0,498	0,373	0,331
GRSKO	0,231	0,445	0,177	0,284
HUCIK	0,447	0,274	0,371	0,364
HUMER	0,456	0,506	0,456	0,473
HURAC	0,178	0,463	0,431	0,357
HUTSI	0,254	0,505	0,508	0,422
ITALT	0,377	0,485	0,503	0,455
ITBER	0,262	0,503	0,405	0,390
ITGDP	0,400	0,389	0,483	0,424
ITLAN	0,253	0,432	0,491	0,392
ITLAT	0,363	0,499	0,404	0,422
PLGOR	0,338	0,482	0,387	0,402
PLKAM	0,322	0,506	0,502	0,443
PLMPO	0,498	0,453	0,495	0,482
PLPOM	0,445	0,496	0,404	0,448
PLWRZ	0,203	0,509	0,405	0,372
PLZEL	0,346	0,500	0,261	0,369
POCHU	0,351	0,511	0,461	0,441
ROKAR	0,420	0,490	0,355	0,422
ROMER	0,389	0,505	0,442	0,445
ROTSI	0,338	0,510	0,390	0,413
ROTUR	0,420	0,496	0,390	0,435

Rassecode	H _E CSN3 Exon 4	H _E IL2 Exon 1	H _E IL2 Intron 3	H _E gesamt
SAHER	0,392	0,482	0,458	0,444
SANAE	0,231	0,504	0,317	0,351
SANAJ	0,383	0,482	0,338	0,401
SPCLM	0,501	0,505	0,274	0,427
SPMCG	0,094	0,468	0,456	0,339
SPMRS	0,514	0,506	0,482	0,501
SPRBM	0,338	0,404	0,486	0,409
SPREF	0,501	0,500	0,443	0,481
SPSGR	0,172	0,495	0,355	0,341
TKAKK	0,257	0,517	0,324	0,366
TKDAG	0,376	0,502	0,403	0,427
TKKRY	0,366	0,501	0,420	0,429
TKMOR	0,444	0,433	0,355	0,411
UKEXH	0,000	0,466	0,177	0,214
UKSBF	0,065	0,505	0,408	0,326
UKSDL	0,464	0,472	0,504	0,480
UKWMT	0,276	0,510	0,456	0,414

Tabelle 28: Durchschnittliche beobachtete Heterozygotie und durchschnittliche erwartete Heterozygotie innerhalb der Subpopulationen (H_O und H_E), totale erwartete Heterozygotie (H_T) über alle Populationen für die untersuchten SNPs an drei Genorten.

Locus	H _O	H _E	H _T
CSN3 Exon 4	0.203	0.295	0.327
IL2 Exon 1	0.488	0.480	0.498
IL2 Intron 3	0.414	0.406	0.424
Über alle Loci	0.368	0.393	0.416

Tabelle 29: F_{ST}-Werte nach WRIGHT an den verschiedenen Genorten über alle Schafrassen und deren Signifikanz je Locus über alle Rassen und über alle Loci.

Locus	F _{ST}	F _{IT}	F _{IS}
CSN3 Exon 4	0.099***	0.382***	0.143***
IL2 Exon 1	0.041***	0.023	-0.014
IL2 Intron 3	0.038***	0.023	-0.016
Über alle Loci	0.060***	0.103***	0.110***

*signifikant, ** hoch signifikant, *** höchst signifikant

4.2.2.3 Ausreißeranalyse für die untersuchten SNP-Marker

Zur Identifizierung der ‚Ausreißer Genorte‘ wurden die errechneten F_{ST} -Werte mit den Heterozygotiewerten geplottet und Basislinien Werte mit dem Programm Fdist (BEAUMONT und NICHOLS, 1996b) berechnet. Während *IL2* Exon 1 und *IL2* Intron 3 innerhalb der errechneten Grenzen liegen, wurde *CSN3* als Ausreißer detektiert (Abbildung 21).

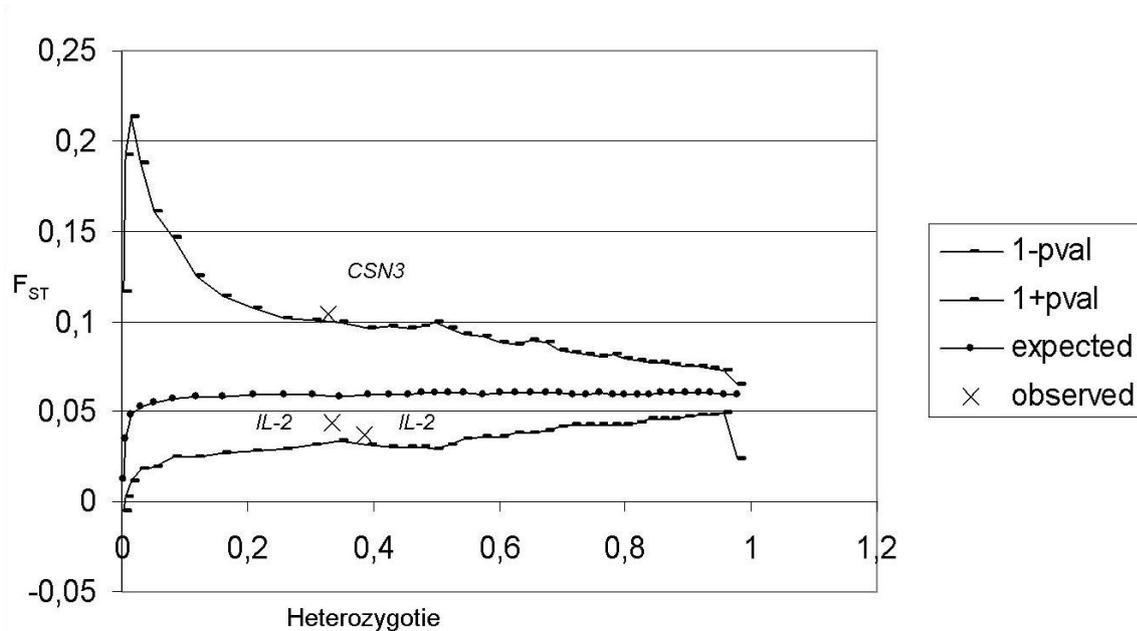


Abbildung 21: Streudiagramm beobachteter F_{ST} -Werte und Heterozygotiewerte der Genorte *CSN3* und *IL2* zur Identifizierung so genannter Ausreißer-Loci beim Schaf. Die mit Querstrichen markierten Linien begrenzen das 99 %-Konfidenzintervall simulierter F_{ST} -Werte. Die Genorte sind mit einem Kreuz markiert.

4.2.3 Mutationsuche am caprinen IL2 Genort

4.2.3.1 Mutationssuche in der 5'UTR-Region des *IL2* bei verschiedenen Ziegenrassen

Es wurden 50 Ziegen aus 12 verschiedenen Rassen mit unterschiedlicher geografischer Herkunft (Südeuropa, Westeuropa, Osteuropa und Jordanien) durch PCR-SSCP-Analyse untersucht. Das eingesetzte 500 bp umfassende PCR-Produkt umfasste die Promotorregion im 5'UTR, das Exon 1, das Intron 1 und das Exon 2.

Die PCR-SSCP-Analyse (Abbildung 22) ergab minimale Unterschiede im Laufverhalten, die sich aber mit keinem der getesteten Protokolle zuverlässig reproduzieren und optimieren ließen.

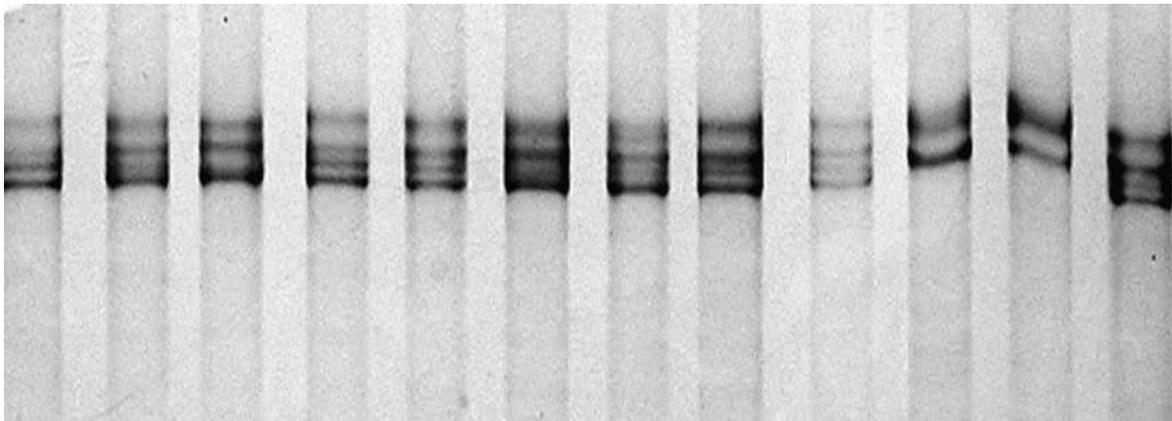


Abbildung 22: Ausschnitt der PCR-SSCP-Analyse von 500 bp großen, die Exons 1 und 2 umfassenden PCR-Fragmenten des caprinen *IL2* von 12 der 50 untersuchten Ziegen.

4.2.3.2 Sequenzanalyse von PCR-Produkten, die die Promotorregion, Exon 1, 2, 3 und Intron1 und 2 umfassten

Die Sequenzanalyse der PCR-Fragmente aus Tabelle 11 von 30 Ziegen aus 12 Rassen mit unterschiedlicher geografischer Herkunft ergab ein monomorphes Bild der untersuchten transkribierten Bereiche des *IL2* bei Ziegen. Die ermittelten Nukleotidsequenzen stimmten mit keiner, der in der Gendatenbank von RIMSTADT et al., BEYER et al. und YING et al. (1995) veröffentlichten unterschiedlichen cDNA-Sequenzen vollständig überein, setzte sich aber aus ihnen zusammen. Lediglich ein Individuum wies einen Basenaustausch von T nach C in der 5'UTR 36 bp hinter der TATA-Box an Position 88 bezogen auf die Gensequenz beim Schaf (AF287479) auf. Zusätzlich wurde bei einer DNA-Probe im Intron 2 an Position 931 (AF287479) eine G/T Transversion festgestellt.

4.2.3.3 Position der Mutation in der 5'UTR des Interleukin-2-Gens

Der ermittelte C/T-Basenaustausch an Position 88 wurde auf seine Nähe zu TATA-Box und Transkriptionsfaktorbindungsstellen mit dem Programm DNASIS[®] untersucht. Die TATA-Box befindet sich 36 bp hinter der Mutation. Der Basenaustausch verändert die Transkriptionsfaktorbindungsstelle für den GMCSF_CS (Granulocyte-macrophage-colony-stimulating-Factor-CS), so dass sie mit Auftreten der Mutation verschwindet.

4.2.3.4 Genotypisierung und Allelfrequenzen der Mutation in der 5'UTR bei Ziegenrassen

Der durch die Sequenzanalyse ermittelte Basenaustausch an Position 88 führt zur Entstehung der Erkennungsstelle der Restriktionsendonuklease *Hpy* 188I, so dass diese betroffene Allele zweimal schneidet, während Allele ohne Austausch einmal geschnitten werden (Abbildung 23). Dies ergibt für den SNP enthaltende Varianten drei Fragmente mit den Längen 350 bp, 71 bp und 79 bp und für PCR-Fragmente ohne den C/T-Austausch 2 Fragmente, die 428 und 72 bp umfassen. Dieser Längenpolymorphismus wurde für die Typisierung der Mutation eingesetzt. Die geschätzten Allelfrequenzen, F_{IS} -Werte und erwartete Heterozygotien (H_E) sind in der Tabelle 29 aufgeführt. Die durchschnittliche Allelfrequenz des seltenen Allels über alle Rassen betrug 1 %, wobei die Frequenzen nur in geringen Grenzen von 1-7 % schwanken. Die 7 % wurden bei den Schweizer Gemsfarbigen Gebirgsziegen typisiert, während bei 21 der 44 untersuchten Rassen der Polymorphismus nicht auftrat.

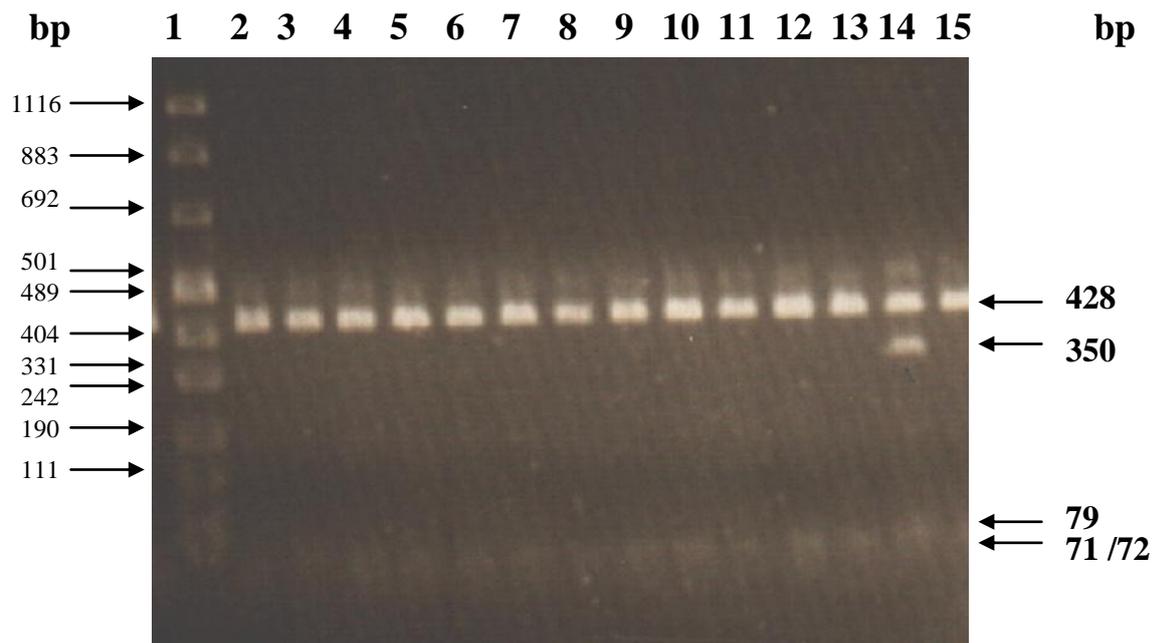


Abbildung 23: Auftrennung der 500 bp umfassenden PCR-Fragmente aus der 5'UTR des *IL2*-Gens (Tabelle 10), die durch den PCR-RFLP mit Hpy 188 entstanden sind. PCR-Produkte in 2-13 homozygot für Thymin, in 14 heterozygot für Cytosin/Thymin an Position 88.

Tabelle 30: Allelfrequenzen, $(W\&C)F_{IS}$ -Werte und erwartete Heterozygotiewerte (H_E) unter Annahme des HWG zur Beurteilung der Gendiversität nach NEI des SNP in der 5'UTR des *IL2* für die einzelnen Ziegenrassen.

Locus <i>IL2</i> 5'UTR				
Rassecode	C	T	$(W\&C) F_{IS}$	H_E
ALCAP	0,02	0,98		0,033
ALDUK	0,02	0,98		0,040
ALHAS	0,02	0,98		0,033
ALLIQ	0,03	0,97	-0,18	0,068
ALMAT	0	1		
ALMUZ	0,05	0,95	-0,34	0,094
AUPIZ	0	1		
AUTAS	0	1		
CHALP	0,07	0,93	-0,17	0,136
CHGRS	0	1		
CHPCG	0	1		
CHSGB	0	1		
CHVBN	0,02	0,98		0,032
DEBDE	0,05	0,95	-0,34	0,094
DETWZ	0,02	0,98		0,032
FRALP	0,05	0,95	-0,44	0,100
FRCOR	0,03	0,97		0,063

Locus <i>IL2</i> 5'UTR				
Rassecode	C	T	(W&C) F_{IS}	H_E
FRPYR	0,02	0,98	-0,17	0,036
FRROV	0	1		
GRGRG	0,05	0,95		0,094
GRSKO	0,03	0,97		0,063
ITARG	0	1		
ITBIO	0	1		
ITCAM	0,05	0,95		0,094
ITGIR	0	1		
ITGMO	0	1		
ITORO	0	1		
ITSAR	0	1		
ITVAL	0	1		
JOBAL	0,03	0,97	-0,17	0,063
PLBUK	0,05	0,95	-0,34	0,094
POBRA	0	1		
ROCAR	0	1		
SABES	0,02	0,98		0,032
SANAG	0,02	0,98		0,032
SPFLR	0	1		
SPGDR	0	1		
SPMAL	0	1		
SPPYY	0	1		
SPVRT	0	1		
TKABA	0,02	0,98		0,032
TKANG	0	1		
TKGUR	0	1		
TKHAI	0,02	0,98		0,032

4.2.3.5 Allelfrequenzen der Mutation im Intron 2 des Interleukin-2-Gens bei Ziegenrassen

Der G/T SNP im Intron 2 an Position 931 konnte mit der Restriktionendonuklease *Bsl* I detektiert werden (Abbildung 24). Es handelt sich bei dieser Basensubstitution um eine Transversion. Dabei entstehen bei der Guanin-Variante aus dem 550 bp langen PCR-Produkt (Tabelle 10) zwei Fragmente mit einer Länge von 341 und 209 bp. Die ermittelten Allelfrequenzen, F_{IS} -Werte und erwartete Heterozygotien (H_E) können der Tabelle 30 entnommen werden. Nur

bei den griechischen Skopelos trat die Mutation nicht auf. Die durchschnittliche Allelfrequenz des seltenen Allels über alle Rassen betrug 20 %. Die Frequenzen schwankten für dieses Allel (Allel T) zwischen 3 % bei den albanischen Capore und 63 % bei der Schweizer Rasse Sankt Gallener Stiefelgeiß (CHSGB).

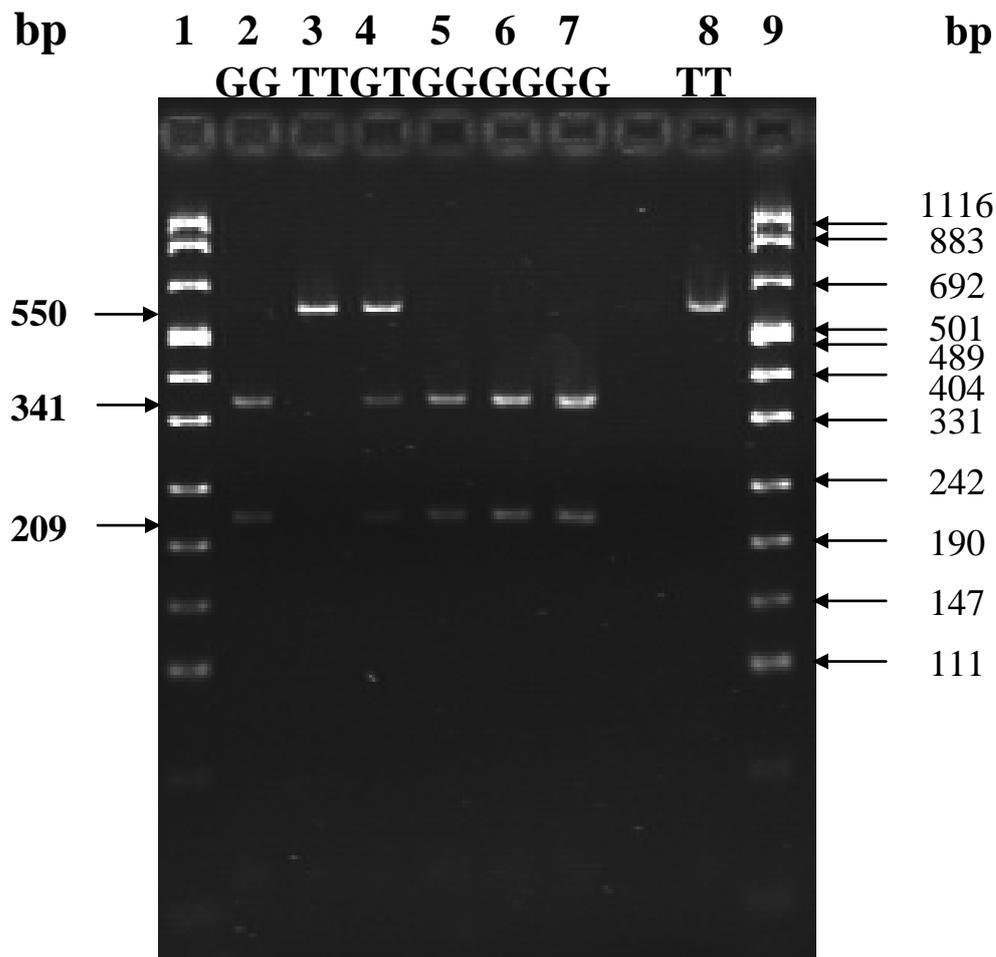


Abbildung 24: Auftrennung der Fragmente nach PCR-RFLP mit *Bsl I*. PCR-Produkt in 2 und 5-7 homozygot für Guanin, in 3 und 8 homozygot für Thymin, 4 heterozygot für Guanin/Thymin.

4.2.3.6 Hardy-Weinberg Gleichgewicht

Die jordanische Rasse Baladie und die türkische Rasse Abaza befanden sich am Genort des SNP-Markers nicht im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Die Abweichung kam durch ein Heterozygotendefizit zustande und spiegelte sich in hohen positiven F_{IS} -Werten (W&C) von 0,585 und 0,528 wieder (Tabelle 30). Im Ewens-Watterson Test wurde der Marker, sowohl bei der Berechnung über alle Rassen als auch innerhalb der einzelnen Rasse, als neutral eingeschätzt.

4.2.3.7 Genetische Diversität der untersuchten Abschnitte des *IL2* bei Ziegen

Die beobachtete und die durchschnittliche erwartete Heterozygotie sowohl innerhalb der Subpopulation (H_E) als auch im Durchschnitt über alle Populationen (H_T) wichen an beiden Genorten nicht signifikant voneinander ab. Die beobachtete Heterozygotie der beiden biallelen Marker betrug 0,03 bzw. 0,293. Die H_E des Polymorphismus in der 5'UTR des caprinen *IL2* betrug in den Rassen, in denen die Mutation typisiert werden konnte, zwischen 0,032 (türkische Abaza und Hair, saudische Najrani und Beeshi, deutsche Thüringer Waldziegen und Walisische Schwarzhalsziegen aus der Schweiz) und 0,136 (Schweizer Gemsfarbige Gebirgsziege). Die H_E des SNP im Intron 2 variierte zwischen 0,068 bei den albanischen Capore und 0,508 bei den italienischen Orobica. Die durchschnittliche H_E über alle Rassen am *IL2* Intron 2 betrug 0,302.

Zur genetischen Differenzierung zwischen den Rassen trug nur der SNP-Marker im Intron 2 mit einem Wert von 0,029 bei, so dass der Koeffizient der Gendifferenzierung (G_{ST}) für diesen Marker auf 0,089 geschätzt wurde (Tabelle 31 und 32).

Tabelle 31: Allelfrequenzen, (W&C) F_{IS} -Werte und erwartete Heterozygotiewerte (H_E) unter Annahme des HWG zur Beurteilung der Gendiversität nach NEI des SNP im Intron 2 des *IL2* für die einzelnen Ziegenrassen.

Rassecode	Locus <i>IL2</i> Intron 2			
	G	T	(W&C) F_{IS}	H_E
ALCAP	0,97	0,03	-0,18	0,068
ALDUK	0,89	0,11	-0,106	0,201
ALHAS	0,91	0,09	-0,077	0,160
ALLIQ	0,87	0,13	-0,132	0,228
ALMAT	0,8	0,2	-0,234	0,324
ALMUZ	0,88	0,12	-0,115	0,209
AUPIZ	0,77	0,23	-0,277	0,354
AUTAS	0,76	0,24	-0,304	0,371
CHALP	0,84	0,16	-0,184	0,272
CHGRS	0,77	0,23	+0,094	0,356
CHPCG	0,88	0,12	+0,205	0,217
CHSGB	0,37	0,63	-0,159	0,473
CHVBN	0,65	0,36	+0,030	0,466
DEBDE	0,81	0,19	-0,224	0,316
DETWZ	0,76	0,24	+0,398	0,375
FRALP	0,73	0,27	+0,077	0,400
FRCOR	0,9	0,1	-0,094	0,183
FRPYR	0,86	0,14	-0,143	0,241
FRROV	0,79	0,21	-0,054	0,337

Rassecode	Locus <i>IL2</i> Intron 2			
	G	T	(W&C) F_{IS}	H_E
GRGRG	0,87	0,13	-.132	0.228
GRSKO	1	0		0.000
ITARG	0,82	0,18	+.242	0.298
ITBIO	0,77	0,23	-.277	0.354
ITCAM	0,69	0,31	+.030	0.432
ITGIR	0,89	0,11	+.213	0.199
ITGMO	0,9	0,1	+.277	0.178
ITORO	0,48	0,52	+.016	0.508
ITSAR	0,92	0,08	+.362	0.152
ITVAL	0,74	0,26	+.174	0.390
JOBAL	0,59	0,41	+.585	0.499
PLBUK	0,42	0,58	-.012	0.494
POBRA	0,73	0,27	-.349	0.395
ROCAR	0,81	0,19	+.064	0.312
SABES	0,73	0,27	+.446	0.408
SANAG	0,81	0,19	+.189	0.318
SPFLR	0,82	0,18	+.015	0.305
SPGDR	0,84	0,16	-.176	0.274
SPMAL	0,88	0,12	-.115	0.209
SPPYY	0,89	0,11	-.111	0.203
SPVRT	0,86	0,15	-.154	0.252
TKABA	0,63	0,37	+.528	0.478
TKANG	0,74	0,26	+.006	0.389
TKGUR	0,9	0,1	-.091	0.177
TKHAI	0,82	0,18	+.242	0.298

Tabelle 32: Durchschnittliche beobachtete und erwartete Heterozygotie (H_O und H_E), totale erwartete Heterozygotie (H_T) und Anteil der Diversität zwischen den Rassen an der gesamten Diversität (G_{ST}) über alle Ziegenrassen für die untersuchten Allele an den drei Genorten *CSN3* Exon 4 bzw. *IL2* 5' UTR und Intron 2.

Locus	H_O	H_E	H_T	G_{ST}
<i>CSN3</i> Exon 4	0,500	0,537	0,575	0,066
<i>IL2</i> 5'UTR	0,030	0,030	0,030	0,010
<i>IL2</i> Intron 2	0,293	0,302	0,332	0,089
Über alle Loci	0,368	0,393	0,416	0,055

Tabelle 33: F_{ST} -Werte nach WRIGHT an den verschiedenen Genorten über alle Ziegenrassen und deren Signifikanz über alle Rassen und über alle Loci

Locus	F_{ST}	FIT	FIS
<i>CSN3</i> Exon 4	0,078***	0,135***	0,062***
<i>IL2</i> 5'UTR	0,012***	0,027	0,015
<i>IL2</i> Intron 2	0,088***	0,112***	0,026
Über alle Loci	0,059***	0,091 **	0,034

*signifikant, ** hoch signifikant, *** höchst signifikant

4.2.3.8 Ausreißeranalyse für die caprinen SNP-Marker

Zur Identifizierung der ‚Ausreißer Genorte‘ wurden auch hier die errechneten F_{ST} -Werte mit den Heterozygotiewerten geplottet und Basislinien Werte mit dem Programm Fdist berechnet. Während *IL2* Intron 2 innerhalb der errechneten Grenzen liegt, wurden die Marker in der 5'UTR des *IL2* und des *CSN3* Exon 4 als Ausreißer detektiert, weil ihre F_{ST} -Werte unterhalb der simulierten Werte lagen. Es wurden zum einen die beschriebenen Allele des *CSN3* Exon IV betrachtet und zum anderen der F_{ST} -Wert des einzelnen SNP an Position 471 des caprinen *CSN3*. Durch diese Mutation unterscheidet sich *CSN3**A von allen anderen Varianten (Abbildung 25).

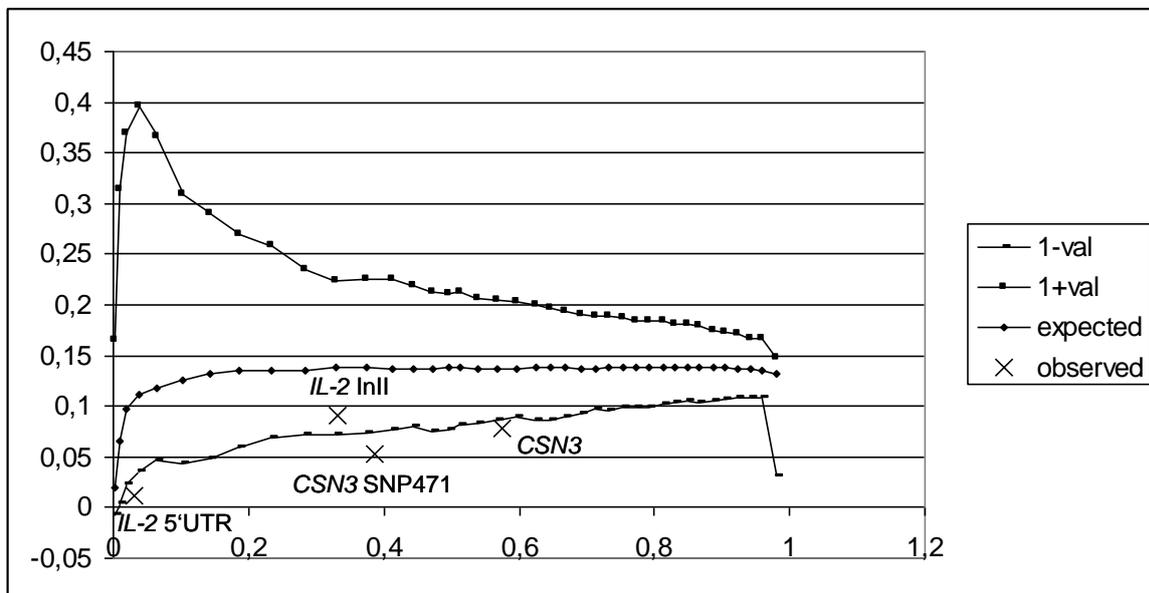


Abbildung 25: Diagramm beobachteter F_{ST} -Werte und Heterozygotiewerte der caprinen Genorte *CSN3* und *IL2* zur Identifizierung so genannter Ausreißer-Loci. Die mit Quadraten bzw. Querstrichen markierten Linien begrenzen das 99 %-Konfidenzintervall simulierter F_{ST} -Werte. Die Genorte sind mit einem Kreuz markiert.

5 Diskussion

Zu Beginn dieser Arbeit waren bereits 12 Proteinvarianten und 14 Allele des caprinen *CSN3* charakterisiert und auf ihr Auftreten in einigen europäischen, v. a. in italienischen und spanischen Ziegenrassen untersucht worden (ANGIOLILLO et al., 2002; CAROLI et al., 2001; JANN et al., 2004; YAHYAOUÏ et al., 2001). Dazu waren verschiedene Techniken wie die isoelektrische Fokussierung zur Typisierung der Proteinvarianten bzw. Sequenzanalysen, PCR-RFLP und PCR-SSCP zur Typisierung der Mutationen auf DNA-Ebene angewendet worden.

In der vorliegenden Studie wurden verschieden große Sequenzabschnitte, die die bereits charakterisierten Mutationen, bzw. die 13 resultierenden polymorphen Positionen enthalten, mit einem PCR-SSCP analysiert und optimale Trennbedingungen für eine maximale Anzahl an Allelen ermittelt. Das Ziel war es, in möglichst wenigen Reaktionsschritten eine genaue Zuordnung der Allele innerhalb von 51 Ziegenrassen im Untersuchungsmaterial zu erreichen. Es gelang die Entwicklung eines PCR-SSCP-Protokolls, das die simultane Darstellung von 10 Bandenmustern erlaubt, von denen wiederum 8 allelspezifisch und zwei zumindest auf zwei respektive fünf Allele zurückzuführen sind. Die Methode erwies sich zusätzlich als potentes Hilfsmittel bei der Detektion noch nicht charakterisierter Mutationen innerhalb des Sequenzabschnittes. So konnten bei der Typisierung des Untersuchungsmaterials zwei noch nicht in der Literatur beschriebene Allele aufgedeckt und anschließend durch Sequenzanalyse charakterisiert werden. Die Sequenzen der *CSN3** Varianten wurden in die Gendatenbank eingegeben und analog der überarbeiteten Nomenklatur als *CSN3*C* und *CSN3*M* bezeichnet. Die Variante, die zuvor mit *CSN3*C* (Stand 2003) bezeichnet wurde, erhält nach der von PRINZENBERG et al. (2005) vorgeschlagenen neuen Nomenklatur ein Apostroph (') angehängt und wird somit zu *CSN3*C'*. Diese Bezeichnung trägt der Tatsache Rechnung, dass es sich um eine synonyme Variante des neu charakterisierten *CSN3*C* handelt. So erhalten die Allele, die zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz führen, Buchstaben in chronologischer Reihenfolge, während zusätzliche synonyme Substitutionen innerhalb der Proteinvarianten durch Anfügen einer entsprechenden Anzahl an Apostrophen angezeigt werden (PRINZENBERG et al. 2005).

Um eine weitere Differenzierung innerhalb der Varianten zu erzielen, die kein allespezifisches Laufverhalten bei der PCR-SSCP-Analyse aufwiesen, wurde der Sequenzabschnitt zusätzlichen PCR-RFLP-Analysen unterzogen, deren Längenpolymorphismen mit den

Restriktionsendonukleasen *Alw* 44I und *Bse* NI eine Unterscheidung von *CSN3**I, K und D, respektive L ermöglichen. Mit dieser Methode in etwas modifizierter Form untersuchten auch schon YAHYAOUÏ (2001) das caprine *CSN3*, allerdings ohne die Möglichkeit der Differenzierung derjenigen Allele, die in dieser Studie bereits im ersten Schritt durch die PCR-SSCP-Analyse erfolgte. Die Autoren konzentrierten sich 2001 auf zwei der variablen Positionen, nämlich 309 (mögliche Schnittstelle für *Bse* NI) und 591 (mögliche Schnittstelle für *Alw* 44I). Dabei wurden die Allele *CSN3**A/B und C' typisiert und ihre Frequenzen in vier spanischen Rassen (Malaguena, Payoya, Canaria, Murciano-Granadina) und bei den französischen Saanenziegen bestimmt (Tabelle 2). Die wichtige Differenzierung zwischen den beiden häufigsten Allelen *CSN3**A und B fand nicht statt. Außerdem wird durch dieses Vorgehen *CSN3**C, aus der dieselbe Proteinvariante resultiert wie aus *CSN3**C' als *CSN3**A/B typisiert. Bei dieser Typisierungsmethode wird außer Acht gelassen, dass genetische Varianten existieren, die weitere oder weniger variable Positionen aufweisen als die typisierten. Im Falle von *CSN3**C' wird der synonyme Austausch an Position 509 zur Charakterisierung des Allels herangezogen, der bei *CSN3**C nicht auftritt. Im PCR-SSCP dagegen sind alle vier Allele in nur einem Reaktionsschritt eindeutig zu unterscheiden, mit der Einschränkung, dass es sich beim Vorliegen von *CSN3**B theoretisch auch um die synonyme Variante *CSN3**B' handeln könnte.

Mit der Kombination dieser beiden Untersuchungstechniken konnten 10 der 12 bisher beschriebenen Proteinvarianten und 3 Allele, die nicht zu einer Änderung der Aminosäuresequenz führen, dargestellt werden.

Zusätzlich ergab sich die Möglichkeit, weitere bisher unbekannte Allele mit dem entwickelten PCR-SSCP-Protokoll zu detektieren, was beispielsweise dann von Vorteil sein kann, wenn man distinkte Ziegenpopulationen anderer Kontinente, die sich unabhängig von den bisher untersuchten Ziegenrassen entwickelt haben, genotypisiert. Insgesamt war damit die Typisierung von 13 *CSN3** Allelen *CSN3**A, B/B', C, C', D/L, E, F, G, H, I, J, K und M möglich.

Der Vorteil der Methode gegenüber anderen liegt des Weiteren in der Möglichkeit durch die PCR-SSCP-Analyse in wenigen Schritten eine große Anzahl der Varianten unterscheiden zu können. Im Gegensatz dazu konzentriert sich ein PCR-RFLP auf eine Position. So untersuchte z. B. ANGIOLILLO (2002) et al. Ziegenrassen auf das Vorliegen von *CSN3**E mit der Restriktionsendonuklease *HAE* 3 (Tabelle 2), während die Variante in dieser Studie simultan mit 8 weiteren typisiert werden konnte.

Von den im Exon 4 des κ -Kaseingens vorkommenden SNPs sind 10 im Para- κ -Kasein zu finden, während 5 im CMP lokalisiert wurden. Die Anzahl an variablen Positionen erhöhte sich auf insgesamt 15. Die bereits beschriebene hohe Variabilität (CAROLI et al., 2006; CHESSA et al., 2003; JANN et al., 2004) an diesem Genort konnte somit bestätigt und weitere variable Positionen charakterisiert werden.

Alle im κ -Kaseingens vorkommenden SNPs waren C/T oder A/G Austausche und damit Transitionen. Es ist bekannt, dass die Frequenzen der verschiedenen SNP-Typen sich unterscheiden. Transitionen sind mit einem Anteil von über 65 % im humanen Genom gegenüber den Transversionen überrepräsentiert, obwohl unter der Annahme der Zufälligkeit von Mutationsprozessen 2/3 der Nukleotidaustausche Transversionen darstellen müssten (HALUSHKA et al., 1999; WANG et al., 1998). Der große Anteil an C/T Austauschen (einschließlich der revers complementären A/G Austausch) resultiert wahrscheinlich aus der Deaminierung von 5-Methylcytosin, die häufig an CpG-Dinukleotiden stattfindet und den Austausch von Cytosin zu Thymin verursacht. Dieser molekulare Mechanismus dürfte der Hauptgrund für das große Defizit an CG Dinukleotiden sein, den man in genomischen Sequenzen vorfindet (MILLER und KWOK, 2001).

In bisherigen Untersuchungen, die sich mit der Phylogenese des κ -Kaseingens befassen, wird *CSN3*B* als eine der originären Sequenzen diskutiert, indem die Autoren die Übereinstimmung mit dem Allel der Wildziege *Capra aegagrus* (Bezoarziege) ins Feld führen (JANN et al., 2004). Auch YAHYAOUÏ et al. (2003) betrachten *CSN3*B* als Ausgangsvariante unter dem Aspekt, dass dieses Allel die höchsten Allelfrequenzen bei einer großen Anzahl an Populationen aufweist. Dies konnte in dieser Arbeit ebenfalls gezeigt werden. *CSN3*B/B'* konnte in allen untersuchten Populationen nachgewiesen werden und war mit Ausnahme der österreichischen Tauernschecken, der italienischen Valdostanaziege und der Französischen Alpenziege stets das Allel, für das die höchsten Allelfrequenzen geschätzt wurden. Die erste publizierte cDNA-Sequenz (COLL et al., 1993) entspricht der des *CSN3*A*, welches sich durch einen zum Aminosäureaustausch führenden SNP an Position 471 vom *CSN3*B* unterscheidet. Dieses Allel wurde ebenfalls in allen untersuchten Rassen typisiert und eine durchschnittliche Allelfrequenz von 26 % geschätzt. Die Spanne der Allelfrequenzen umfasste dabei Werte zwischen 6 % bei den Thüringer Waldziegen (93 % *CSN3*B/B'*) bis 51 % bei den Tauernschecken. Insgesamt konnten 9 bzw. 11 verschiedene Allele des *CSN3* im Untersuchungsmaterial nachgewiesen werden, wenn man die Tatsache berücksichtigt, dass zwischen B und B'

und zwischen D und L nicht differenziert werden konnte. Die Allele *CSN3*B''*, *F*, *H*, *I*, und *K* traten nicht auf. Bei *CSN3*B''*, *H*, *I*, und *K* handelt es sich um sehr seltene Allele, die auch bei JANN et al. (2004) nur bei jeweils einem der 31 untersuchten Tiere auftraten. *CSN3*H* wurde bisher nur bei einer Ziege einer südostasiatischen Rasse aus Malaysia charakterisiert. Das Fehlen von *CSN3*H* in dieser Studie, könnte darauf hindeuten, dass es sich hierbei um eine Variante handelt, die in europäischen, afrikanischen und Rassen des Nahen Ostens nicht auftritt. Dies könnte eine weitere Bestätigung der „multiple maternal origin“ Theorie bezüglich der Entstehung der Hausziege sein, die erstmals von LUIKART et al. (2001) und MANNEN et al. (2001) vertreten wurde. Die Autoren folgerten, dass die von ihnen aus mtDNA Informationen ermittelten drei Haplotypen A, B und C, aus divergierenden Wildziegenarten oder Linien entstanden sind, oder durch Introgression anderer Haplotypen nach dem ersten Domestikationsereignis (LUIKART et al., 2001; MANNEN et al., 2001). *CSN3*B''*, *I*, und *K* traten bei JANN et al. (2004) bei jeweils einem Tier der 31 in die Untersuchung eingegangenen Hausziegen auf. Es handelte sich hierbei jeweils um eine Bunte Deutsche Edelziege (persönliche Kommunikation mit dem Autor). Da diese Rasse in großer Anzahl (n= 73) auch in der vorliegenden Arbeit genotypisiert wurde, wäre ein Auftreten der Allele in niedriger Frequenz zu erwarten gewesen. Das Ausbleiben bei BDE und verwandten europäischen Rassen deutet daraufhin, dass es sich vielleicht um Mutationen handelt, die sehr kurz zurückliegen und dementsprechend wenig verbreitet sind. *CSN3*F* wurde von (YAHYAOUÏ et al., 2003) erstmals beschrieben und trat bei *Capra pyrenaica* als das Allel mit der höchsten Frequenz von 98 % auf (Tabelle 2). Außerdem gelang den Autoren die Typisierung des Allels bei den spanischen Teramana und den italienischen Girgentana und Sarda in niedrigen Frequenzen von 5 % - 14 % (Tabelle 2). Während die spanische Rasse in dieser Arbeit nicht analysiert wurde, konnte bei den Rassen Girgentana und Sarda trotz größerer Tierzahlen kein *CSN3*F* typisiert werden. Studien z. B. die angeführte von YAHYAOUÏ et al. (2003), die das *CSN3*F* unter Anwendung von den beiden PCR-RFLPs mit *Alw* 44I und *Bse* NI untersucht haben, hätten eventuell vorliegende *CSN3*M* als *CSN3*F* interpretiert. Dies wäre eine Erklärung dafür, dass *CSN3*F* in dieser Arbeit bei keiner der 50 Rassen typisiert werden konnte, während *CSN3*M* regelmäßig in niedrigen Frequenzen festgestellt wurde. Zusätzliche PCR-RFLP-Analysen mit dem im Rahmen dieser Arbeit angewendeten Enzym *Pst* I könnten hier zur Abklärung beitragen, da die Schnittstelle des Enzyms eine der zusätzlichen variablen Positionen von *CSN3*M* gegenüber *CSN3*F* detektiert. Allerdings trat bei den Rassen

Girgentana und Sarda *CSN3***M* ebenfalls nicht auf. Von den sizilianischen Girgentanaziegen ist bekannt, dass die Population von 5000 Tieren (1992) auf unter 100 Tiere (2001) geschrumpft ist (URL 3). Maßnahmen zur Erhaltung dieser Rasse konnten zwar dazu beitragen ihren Fortbestand zu sichern (URL 3), die Folgen eines solchen so genannten genetischen Flaschenhalses (d.h. eines starken Rückgangs der Populationsgröße) für die intrapopuläre Variabilität können jedoch gravierend sein und zur Auslöschung einer Rasse führen (CORNUET und LUIKART, 1996; LANDE, 1994).

Die Allele *CSN3***D*, *C*, *C'*, *F*, *G* und *M* weisen an Position 591 im CMP die Aminosäure Prolin anstelle von Serin bei *CSN3***A*, *B*, *E*, *H*, *I*, *J* und *K* auf. Dieser nicht synonyme C/T Austausch findet sich auch bei der Wildziege *Capra pyrenaica* (AY090466), deren Aminosäuresequenz der des *CSN3***F* von *Capra hircus* entspricht, bei den *Capra ibex* Allelen B und C sowie bei eng verwandten Spezies wie *Ovis aries*, *Bos taurus*, *Capricornis crispus* und *Camelus dromedarius*. Aber auch bei weniger verwandten Arten wie *Suis scofra*, *Homo sapiens*, *Rattus rattus*, *Mus musculus* ist an dieser Position die Aminosäure Prolin beschrieben. Diese Übereinstimmungen sind für JANN et al. (2004) und YAHYAOUÏ et al. (2003) ein Anzeichen dafür, dass die Varianten mit Prolin also *CSN3***F* und nicht *CSN3***B* wie zunächst erläutert, die genetisch ältere Variante darstellen könnte. Die Erklärung für die Allelfrequenzen fällt bei dieser Annahme schwer. Aufgrund der wichtigen physiologischen Funktionen des κ -Kaseins ist es unwahrscheinlich, dass dieser Genlocus nicht unter Selektionsdruck steht. WARD et al. (1997) konnte für die Familie der *Bovidae* anhand des Verteilungsmusters der SNPs in der Gensequenz entfernt verwandter Spezies der Familie *Bovidae* Hinweise auf positive Selektion, die zu einer Beschleunigung der Divergenz zwischen diesen Spezies führte, darstellen (WARD et al., 1997). So erklären YAHYAOUÏ et al. die niedrigen Frequenzen, die sie für *CSN3***F* gefunden haben durch Selektion und sehr frühen Ersatz von *CSN3***F* durch *CSN3***B*. Eine weitere Erklärung könnte im Auftreten von genetischer Drift oder wiederholter Gründer-Effekte (founder effects) im Rahmen der Migration liegen (CYMBRON et al., 2005).

Die bei JANN et al. (2004) postulierte Aufteilung der *CSN3** Allele in zwei Gruppen, wobei *CSN3** *A*, *B*, *B''*, *E*, *H*, *I*, *J* und *K* auf Mutationen der *CSN3***B*/*Capra aegagrus* Sequenz basieren und *CSN3***D*, *C'*, *G* und *L* sich von *CSN3** *F* ableiten konnte mit den Ergebnissen dieser Untersuchungen und der Auswertung mit DAMBE ähnlich dargestellt werden (Abbildung 14 und 15). Daraus kann abgeleitet werden, dass diese Gruppen am wahrscheinlichsten aus divergierenden Wildziegenarten oder Linien entstanden sind. Dies bekräftigt wiederum die

bereits angesprochene Theorie, die LUIKART et al. (2001) und MANNEN et al. (2001) auf mtDNA Datenbasis gewonnen haben.

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals auch afrikanische Ziegen am *CSN3*-Genort untersucht. Hierbei fällt auf, dass *CSN3*D*, *F*, *G* und *L* nicht auftreten. Dies wiederum widerspricht deutlich einer der Theorien von YAHYAOUÏ et al. (2003) *CSN3*F* als alleinige Vorfahrenvariante zu verstehen. Da von den vermuteten Domestikationzentren ausgehend Tiere nach Afrika verbracht worden sein müssten (MASON, 1996; URL 15), müssten auch hier noch Hinweise auf ursprüngliche Allele zu finden sein. Die Wahrscheinlichkeit, dass die originären Allele durch genetische Drift beim Verbringen der Tiere auf einen anderen Kontinent verloren gegangen sind, ist nur dann hoch, wenn die Allelfrequenzen für diese Allele bereits vorher sehr niedrig waren. Jedoch kann ein Allelverlust die Konsequenz aus wiederholten Gründereffekten während Migrationsereignissen sein (CYMBRON et al., 2005).

In geographischer Nähe zum vermutlichen Domestikationzentrum (BRUFORD et al., 2003; SALAMINI et al., 2002; ZEDER et al., 2005) dem Gebiet des „Fruchtbaren Halbmond“ liegt Saudi-Arabien. Die zwei dort beheimateten Rassen aus dem Untersuchungsmaterial Beeshi und Najrani weisen sehr niedrige Allelfrequenzen von jeweils 3 % bei je 31 untersuchten Individuen (CHSABES und CHSANAJ) für die Allele *CSN3*D* bzw. *L* auf, dafür aber sehr hohe von 74 % respektive 77 % für *CSN3*B/B'* (CHSABES und CHSANAJ). *CSN3*F* und *G* treten gar nicht auf. Auch hier wären wie bei den afrikanischen Rassen höhere Allelfrequenzen für originäre Genvarianten zu erwarten. Auch Jordanien und die Türkei zeichnen sich durch geographische Nähe zur Region des „fruchtbaren Halbmonds“ aus. Hier finden sich tatsächlich bei 6 von 8 untersuchten Populationen Allelfrequenzen von 20-40 % für *CSN3*D*, *G* und *L* und bei 2 Rassen immerhin Allelfrequenzen von 16 % respektive 15 %. Allerdings konnte wiederum kein *CSN3*F* gefunden werden. Das Vorkommen der Allele *CSN3*D/L* und *G* zu ähnlichen Anteilen konnte nur bei wenigen türkischen Rassen festgestellt werden, meist war nur *CSN3*D/L* zu finden. *CSN3*D/L* unterscheiden sich von *CSN3*G* um einen Aminosäureaustausch an Position 44 von Glycin zu Alanin im Para-κ-Kasein. Dieser Austausch findet sich nur bei *CSN3*D*, *L* und *K*. Alle verwandten Spezies weisen an dieser Stelle das Glycin auf, das die anderen caprinen Allele kennzeichnet. Daraus kann geschlossen werden, dass *CSN3*G* phylogenetisch vor *CSN3*D/L* und in unmittelbarer Nähe zu *CSN3*F/ Capra pyrenaica* einzuordnen ist.

Die erstmals in dieser Untersuchung aufgetretenen Allele *CSN3***C* und *M* lassen sich der Gruppe mit den Allelen *CSN3***C'*, *D*, *F*, *G* und *L* zuordnen. So unterscheidet sich *CSN3***C* von *CSN3***C'* durch das Fehlen einer stillen Mutation an Position 509; daraus ergibt sich im Bezug auf die angenommene Ursprungssequenz *CSN3***F*, dass es sich hierbei um die phylogenetische Vorgängersequenz von *CSN3***C'* handeln könnte. Dies wäre auch in Übereinstimmung mit den durchweg höheren Allelfrequenzen für *CSN3***C* im Vergleich mit denen, die für *CSN3***C'* geschätzt wurden. In 24 % aller Rassen wurde *CSN3***C'* festgestellt, während *CSN3***C* bei 68 % typisiert wurde. Außerdem trat mit Ausnahme der korsischen Ziegen, der wallisschen Schwarzhalsziegen und der portugiesischen Bravia *CSN3***C'* in den Rassen auf, in denen *CSN3***C* ebenfalls vertreten war. Dies deutet wiederum auf einen Zusammenhang bei der Entwicklung dieser Allele hin. Die Ergebnisse zeigen, dass die Änderung der Nomenklatur PRINZENBERG et al. (2005) dieser Allele zum besseren phylogenetischen Verständnis beiträgt und gleichzeitig die unterschiedliche Frequenz ihres Auftretens widerspiegelt.

*CSN3***M* weist ebenfalls die größte Übereinstimmung mit *CSN3***G* bzw. *F* auf, verfügt aber über zwei weitere Mutationen an Positionen, die bisher für keine Variante beschrieben worden sind. Eine dieser zusätzlichen Mutationen liegt an Position 550 im Bereich des von JANN et al. (2004) als hoch konserviert beschriebenen CMPs. Die andere Mutation fand an Position 384 statt und liegt damit direkt neben der Mutation, die an Position 385 für *CSN3***E* beschrieben worden ist (ANGIOLILLO et al., 2002). Dies zeigt einmal mehr die hohe Variabilität des Para- κ -Kaseins, die von mehreren Autoren postuliert wird (CHESSA et al., 2003; JANN et al., 2004; YAHYAOUUI et al., 2003), gibt aber gleichzeitig Hinweis darauf, dass auch im CMP mehr Mutationen auftreten als bisher angenommen wurde. *CSN3***M* trat stets in niedrigen Frequenzen auf. Es konnte in 17 (ca. 34 %) der untersuchten Rassen typisiert werden und trat v. a. in den türkischen, saudi-arabischen und albanischen Rassen in Frequenzen zwischen 2 % und 12 % auf. Generell war das Auftreten von *CSN3***M* auf die Rassen des Mittelmeerraums und Osteuropa beschränkt, es trat in keiner der westeuropäischen Rassen auf und konnte nur bei einem Einzeltier der afrikanischen Rasse Red Sokoto typisiert werden.

Die seltene Allele (Allelfrequenzen deutlich unter 10%) traten nur bei zehn der 51 untersuchten Rassen auf. So konnte das von JANN et al. (2004) als erstes bei einer Bunten Deutschen Edelziege beschriebene *CSN3***J* nur in den vier Rassen Bunte Deutsche Edelziege, Thüringer Waldziege, Französische Alpenziege und Westafrikanische Zwergziege bei jeweils einem Individuum festgestellt werden. Das bisher nur in Montefalconeziegen beschriebene *CSN3***E*

trat wieder in einer italienischen Rasse dieser Region auf. Innerhalb dieser Arbeit wird die untersuchte Rasse als Grigia molisana (CHITGMO) bezeichnet. Die Probennahme fand direkt in der Gegend der Stadt Montefalcone statt und so kann davon ausgegangen werden, dass es sich um die gleiche Rasse handelt. Die Allelfrequenz für *CSN3*E* liegt mit 6 % (n=31) deutlich unter den von ANGIOLILLO et al. (2002) beschriebenen von 16 % (n=62) und noch deutlicher unter den 41 % (n=17) die YAHYAOUÏ et al. (2003) angeben (Tabelle 2). Außerdem konnte dieses Allel bei zwei albanischen (ALMAT und CAP), zwei türkischen Angoraziegenrassen (TKYER und LTK) und einer polnischen Rasse (PLBUK) mit 3 % respektive 2 % typisiert werden. Dies widerspricht der bisherigen Annahme der beiden vorher genannten Autoren, dass es sich hierbei um ein Privatallel von Grigia molisana handelt. Eine Verwandtschaft der Rassen ist geografisch unwahrscheinlich und auch durch die jeweiligen Informationen, die über die betreffenden Rassen zu Verfügung stehen, nicht nachzuvollziehen (URL 9). Bei Grigia molisana handelt es sich um eine sehr distinkte Rasse aus Norditalien, die polnischen Ziegen ähneln phänotypisch den BDE, mit denen sie verwandt sind (URL 9). Eine Verwandtschaft zwischen den türkischen Angoraziegen ist anzunehmen, da ihre Betrachtung als zwei Populationen hauptsächlich der Tatsache Rechnung trägt, dass die Probennahme in unterschiedlichen Gebieten stattfand und dass kein Herdbuch oder Vergleichbares geführt wird. Über die beiden albanischen Rassen ist nur bekannt, dass es sich um braune Milchziegen aus zwei autochthonen Rassen mit hoher absoluter Populationsgröße handelt. Für die Rasse Mati wird außerdem Adaption an hohe Gebirgslagen beschrieben (URL 9).

Bei der Betrachtung der genetischen Diversität am caprinen *CSN3* wurde zunächst die intrapopuläre Komponente betrachtet. Die größten absoluten Allelzahlen (n_a) wurden bei 8 Rassen festgestellt; hier konnten jeweils sechs verschiedene *CSN3* Allele dargestellt werden. Insgesamt zeichneten sich die Rassen in geographischer Nähe des „fruchtbaren Halbmondes“ durch eine höhere Diversität am *CSN3* aus. Die Länder mit höchsten n_a und erwarteten Heterozygotiewerten (H_E „genetische Diversität“ nach NEI) waren die Türkei und Albanien. Die höchste H_E 0,761 wurde für die türkischen Haarziegen aus der Region Südwestanatolien (Kil Keci), die auch Anatolien Black genannt werden, ermittelt. Ähnliche Ergebnisse fanden auch CANON et al. (2006), die einige dieser Rassen auf der Basis von Mikrosatelliten untersuchten. Auch sie ermittelten die höchsten mittleren Allelzahlen (MNA) pro Locus und H_E -Werte bei den türkischen, saudischen und südosteuropäischen Populationen (MNA 7,5 (saudische Najrani)- MNA 9,1 (türkische Abaza)). Die H_E -Werte lagen in dieser Untersuchung für

die türkischen und albanischen Rassen zwischen 0,712 (Mati) und 0,772 (Abaza) bei einer durchschnittlichen H_E von 0,690. Die hohe Variabilität in diesen Rassen aus geographischer Nähe zum vermuteten Domestikationszentrum „fruchtbarer Halbmond“ könnte ein Hinweis darauf sein, dass die hohe Variabilität eher schon aus der Zeit vor der Domestikation der Ziege stammt, als auf eine kürzer zurückliegende Selektion innerhalb der landwirtschaftlichen Nutzung der Ziegenrassen zurückzuführen ist. Diese Vermutung stellte auch NADERI et al. (2007) aufgrund der von weiteren Autoren (JOSHI et al., 2004; LUIKART et al., 2001; SULTANA et al., 2003) mit Hilfe von mtDNA Daten errechneten Divergenzzeit zwischen den charakterisierten Haplotypen, die weit vor dem oder den angenommenen Domestikationsereignissen liegt (NADERI et al., 2007). Eine Ausnahme stellt die Bunte Deutsche Edelziege (DEBDE) und die Schweizer Gemsfarbige Gebirgsziege (CHALP) dar. Trotz ihrer mitteleuropäischen Herkunft konnte hier ebenfalls eine n_a von 6 festgestellt werden, allerdings nur eine H_E von 0,588 respektive 0,547. Auch CANON et al. (2006) ermittelten für diese Rassen eine relativ hohe MNA von 7,0 respektive 7,3 im Vergleich zu durchschnittlichen 5,9 bei den übrigen schweizerischen bzw. deutschen Populationen. Die H_E fiel dagegen bei beiden moderat mit 0,693 und 0,648 aus. Sowohl die BDE als auch die Schweizer Gemsfarbige Gebirgsziege stellen eine vergleichsweise große Population dar, während die anderen hier untersuchten Rassen dieser beiden Ländern deutlich niedrigere Tierzahlen aufweisen und teils sogar als in ihrem Fortbestand bedroht gelten (URL 5, 9, 10). Diese höhere Variabilität bezüglich der Allelzahl könnte ein Hinweis sein, dass die Populationsgröße Einfluss auf die genetische Diversität haben kann. Von einer solchen positiven Korrelation in ihrem Untersuchungsmaterial berichten auch CANON et al. (2006), wenn gleich BRUFORD et al. (2004) zeigen konnten, dass es keine konstante Korrelation zwischen den beiden Größen gibt.

Die höchste effektive Allelzahl (n_e) wurde bei den türkischen Angoraziegen (TKYER) ermittelt, sie betrug 0,587, auch die anderen türkischen Rassen wiesen deutlich höhere n_e auf als mittel- und westeuropäische und afrikanische Populationen. Die jordanischen Ziegen unmittelbar aus der Region des vermuteten Domestikationszentrum wiesen eine erwartungsgemäß hohe Variabilität auf ausgedrückt in einer H_E von 0,639 bei einer mittleren n_e und n_a von 2,64 und 4.

Eine Zwischenstellung nehmen die italienischen Rassen ein. Hier gibt es sowohl Rassen mit sehr niedrigen als auch mit hohen Werten. Die niedrigen Werte wurden bei den Rassen der Inseln Sardinien und Sizilien gefunden. Dies könnte auf einen Gründereffekt oder eine sehr geringe Populationsgröße zurückzuführen sein. Dem widerspricht, dass z. B. bei den stark

gefährdeten sizilianischen Girgentanaziegen (ITGIR) eine hohe AR von 4,0 und eine n_a von 4 festgestellt wurde. Dies wiederum zeigt, dass auch mit der Erhaltung kleinen Populationen seltene Allele bestimmter Genorte erhalten bleiben können. Die italienischen Rassen Orobica und Valdostana (ITORO und ITVAL) wiesen teilweise eine höhere H_E auf als einige Rassen aus unmittelbarer Nähe zum Domestikationszentrum. Die Ergebnisse bezüglich der genetischen Variabilität am *CSN3* der italienischen Rassen unterscheidet sich sehr deutlich von denen die CANON et al. (2006) durch Mikrosatellitenanalyse ermittelten. Während hier die Girgentana- und Orobicaziegen niedrigste MNA und H_E -Werte aufweisen, die am *CSN3* zumindest moderate Werte erreichen, sind die Rassen Sarda (ITSAR) und Argentata dell'Etna (ITARG) überdurchschnittlich polymorph an den Mikrosatellitenloci. Beide haben aber nur zwei bzw. drei Allele am *CSN3*. Die Informationen, die durch verschiedene Analysemethoden im Bezug auf die genetische Diversität gewonnen werden, können sich demnach deutlich widersprechen. TABERLET et al. (2007) berichten davon, dass es zu einer Überschätzung der Heterozygotiewerte kommen kann, weil man durch die Auswahl besonders variabler Marker z. B. der Mikrosatellitenmarker die Konzentration auf chromosomale Regionen ohne Selektionsdruck richtet. Das unterschiedliche Ergebnis könnte ebenfalls darauf hinweisen, dass im Gegensatz zu den neutralen Mikrosatellitenloci wie bereits angesprochen selektiver Druck am *CSN3* wirkt. So kann die Untersuchung der genetischen Diversität, die bisher v. a. durch Mikrosatellitenanalysen erfolgte, sinnvoll durch die Untersuchung von Kandidatengenorten ergänzt werden, da Rassen, die sich an neutralen Loci als wenig polymorph erwiesen haben, durchaus eine höhere Variabilität in für beispielsweise Leistungsmerkmale interessante Regionen haben können.

Die geringste Variabilität am *CSN3* wiesen die Thüringer Waldziegen (DETWZ) auf. Ausgedrückt wird dies durch die niedrigste ermittelte effektive Allelzahl (n_e) 1,18 und die geringste erwartete Heterozygotie (H_E) von 0,152 trotz einer n_a von immerhin 3. Bei der Mikrosatellitenanalyse durch CANON et al. (2006) betrug die H_E zwar 0,664, lag aber auch unter dem Durchschnitt von 0,69.

Sechs Rassen haben eine n_a von 2, dazu gehören die drei spanischen Populationen Florida, Guadarrama und Verata, die italienischen Sarda und die nigerianische Rasse Bornogoat. Sehr geringe absolute Tierzahlen und sinkende Bestandszahlen könnten zu einem deutlichen Rückgang der genetischen Diversität bei diesen Rassen geführt haben. Im Widerspruch dazu steht, dass insbesondere die hier untersuchten afrikanischen Rassen sehr hohe Tierzahlen vorweisen

können und keine dieser Rassen laut DAD-IS derzeit als vom Aussterben bedroht eingestuft wird (URL 9 und 10).

Insgesamt betrachtet sinkt die Variabilität der untersuchten Populationen mit Entfernung vom Domestikationszentrum im Mittleren Osten deutlich ab, mit Extremwerten in Westeuropa (Spanien, Frankreich) und Afrika. Ähnliche Beobachtungen machten bereits CANON et al. (2006) bei Ziegen, PETER et al. (2007) bei Schafen, LOFTUS et al. (1999) und CYMBRON et al. (2005) bei Rindern. Ausnahmen bilden z. B. einige Populationen, die nicht zu den seltenen Rassen gehören und eine entsprechend große effektive Populationsgröße haben, wie die Gemsfarbige Gebirgsziege aus der Schweiz und die Bunte Deutsche Edelziege. Aber auch autochthone Rassen aus Österreich wie die Tauernschecken mit extrem niedrigen Tierzahlen, die als vom Aussterben bedroht eingestuft werden, fallen durch hohe Diversitätswerte auf.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bezüglich der höheren genetischen Variabilität der Rassen des Mittleren Ostens und Südosteuropa am *CSN3* sind in Übereinstimmung mit denen CANON et al. (2006) und indizieren damit, dass diese Rassen ein Reservoir genetischer Diversität der Ziege darstellen.

Die beobachtete Heterozygotie am caprinen *CSN3* über alle Rassen betrug 0,500 und die durchschnittliche erwartete Heterozygotie wurde auf 0,575 geschätzt. Die durchschnittliche H_E eines Großteils der hier untersuchten Rassen, die im Rahmen einer Mikrosatellitenanalyse geschätzt wurde, betrug 0,69 und liegt damit deutlich über der am *CSN3* (CANON et al. 2006). Der Unterschied kommt dadurch zustande, dass bei einzelnen Rassen extrem niedrige H_E -Werte (DETWZ, Schweizer Pfauenziegen (CHPCG), italienischen Argentata (ITARG)) unter 0,34 und bei einigen niedrige unter 0,5 ermittelt wurden. Die Maximalwerte lagen in beiden Untersuchungen über 0,76 (türkische Abaza H_E 0,772 ermittelt durch Mikrosatellitenanalyse, türkische Kil Keci H_E 0,761 am *CSN3*). Damit zeigt sich, dass die Untersuchung des caprinen *CSN3* zur Charakterisierung genetischer Diversität durchaus geeignet erscheint.

Eine durchschnittliche genetische Differenzierung (F_{ST}) von 7,8 % am caprinen *CSN3* impliziert, dass 92,2 % der genetischen Variation an diesem Genort innerhalb der Rassen zwischen den Individuen zu finden ist. Auch CANON et al. (2006) ermittelten eine genetische Differenzierung (F_{ST}) von 7 % in den von ihnen mit Mikrosatelliten untersuchten 45 europäischen Rassen und Rassen des Mittleren Ostens. Sie schätzen diesen F_{ST} -Wert als moderat ein. Der Anteil der genetischen Diversität der zwischen den Rassen anzutreffen ist, wird durch einen sehr niedrigen D_{ST} -Wert von nur 0,038 ausgedrückt und ergibt einen Gendifferenzierungsquotienten G_{ST} von 0,066. Autoren die 16 bzw. 5 Ziegenrassen mit anderen Markersystemen

z. B. AFLPs und Mikrosatelliten untersuchten, fanden etwas höhere Anteile der Diversität zwischen den Populationen. So konnten AJMONE-MARSAN et al. (2001) und CREPALDI et al. (2001) mit einer AFLP-Analyse 11 % bzw. 9 % Variabilität zwischen den Rassen feststellen, während SAITBEKOVA et al. (1999) mit einer Mikrosatellitenanalyse bei 8 Schweizer, einer karibischen Ziegenrasse und Bezoarziegen sogar 17 % interpopuläre Diversität schätzten. Im letzteren Fall liegt die Erklärung für den etwas höheren Prozentsatz wahrscheinlich in der Einbeziehung der Wildziegenpopulation *Capra aegagrus*. Generell zeigte sich aber schon bei diesen Untersuchungen, dass die zuvor allgemein akzeptierte Annahme, dass etwa 30-50 % der Variation zwischen den Rassen zu finden ist (OLDENBROEK, 1999) sich mit derzeit angewendeten Methoden zur Charakterisierung genetischer Diversität nicht bestätigt. Die Eignung des caprinen *CSN3* als Marker zur Schätzung genetischer Diversität ist durch die hohe Anzahl an Allelen zwar gegeben, muss aber dadurch relativiert werden, dass viele Allele nur in sehr niedrigen Frequenzen auftreten und in 18 Rassen die $n_a < 4$ ist. Beim Rind konnte gezeigt werden, dass selektiver Druck auf diesen Genort als sehr wahrscheinlich gilt (WARD et al., 1997). Deswegen ist diese Annahme auch bei *Capra hircus* begründet und könnte die hohen Frequenzen für die beiden Hauptallele *CSN3**A und B verursachen.

Die Eignung zur genetischen Differenzierung zwischen den Rassen ist gering, da der G_{ST} mit 0,066 niedrig ist. Private Allele konnten nicht dargestellt oder bestätigt werden. Das zunächst als solches angesehene *CSN3**E, das zunächst nur bei italienischen Montefalconeziegen (ANGIOLILLO et al., 2002; YAHYAOUUI et al., 2003) charakterisiert worden war, konnte im Rahmen dieser Arbeit auch in anderen Rassen dargestellt werden.

Auswirkungen der κ -Kasein-Varianten auf Milchmenge und Zusammensetzung bei der Hausziege waren zu Beginn dieser Arbeit wenig untersucht. Inzwischen konnten CHIATTI et al. (2007) einen Effekt der κ -Kaseinpolymorphismen auf die Zusammensetzung der Milch bei Ziegen der italienischen Rasse Orobica darstellen. Hierbei wurden die beiden Milchproteinvarianten A^{IEF} und B^{IEF} untersucht, wobei B^{IEF} bei den untersuchten Orobica aus der genetischen Variante *CSN3**D resultierte. B^{IEF} führte zu hoch signifikanten Effekten sowohl auf den Protein- als auch auf den Kaseinanteil der Milch. Die Rasse Orobica zeichnete sich auch bei den Analysen im Rahmen dieser Arbeit durch die hohe Allelfrequenz von 29 % der genetischen Variante *CSN3**D/L aus. Eine reine Betrachtung der beiden Proteinvarianten zur Berechnung der Effekte auf die Milchzusammensetzung ohne Einbeziehung der zugrunde liegenden genetischen Varianten könnte zu anderen Ergebnissen führen, da außer *CSN3**D auch *CSN3**E, K

und M zu B^{IEF} führen. Es erscheint also sinnvoll, wie in der angeführten Studie erfolgt, zusätzlich zur IEF-Analyse, die zugrunde liegende genetische Varianten mit den in dieser Arbeit vorgeschlagenen Methoden zu typisieren. Die entwickelte Technik ermöglicht die laktationsunabhängige, relativ schnelle und kostengünstige Genotypisierung von einer Vielzahl an Zuchttieren.

Durch die enge Kopplung der Calcium-sensitiven Kaseingenen und des κ -Kaseingens erscheint eine Betrachtung von Kaseinhaplotypen bei der Evaluierung der phänotypischen Effekte sinnvoller als die Auswertung an einem Einzelgenort (CAROLI et al., 2006). Durch die Berücksichtigung der charakterisierten κ -Kaseingenvarianten erweitert sich demzufolge das bereits etablierte Kaseingencluster bei der Ziege.

Bei der Ausreißeranalyse fiel der Genort *CSN3* sowohl unter Einbeziehung aller allelen Varianten als auch bei ausschließlicher Betrachtung des SNP an Position 471, durch den sich die beiden Allele *CSN3**A und *B* unterscheiden, mit F_{ST} -Werten unterhalb der simulierten Grenzwerte auf. Dies wurde von den Autoren (BEAUMONT und NICHOLS, 1996b) zunächst als Hinweis auf balancierende Selektion gewertet. Dann konnten (BEAUMONT und BALDING, 2004) allerdings zeigen, dass die Methode zum Nachweis balancierender Selektion eher ungeeignet ist.

Zu Beginn dieser Arbeit waren keine genetischen Polymorphismen des ovinen κ -Kaseins bekannt (MOIOLI et al., 1998). RFLP-Analysen mit anschließendem Southern Blot ergaben bei zwei voneinander unabhängigen Studien Polymorphismen mit den Endonukleasen *Hind* 3, *Pvu* 2, und *Pst* I (GREGORIO et al., 1991; LEVEZIEL et al., 1991). Diese wurden aber nicht genauer charakterisiert. Das besondere Interesse an dem analysierten Genlocus liegt zum einen in der bereits beschriebenen großen Variabilität bei eng verwandten Spezies wie Ziege oder Rind, zum anderen an den Ergebnissen von QTL-Analysen für Milchmenge, die gezeigt haben, dass sich ein oder mehrere solcher Loci auf dem Chromosom 6 und einer speziell in der Nähe des Kaseingenclusters befindet (DIEZ-TASCON et al., 2001; RENDO et al., 2003). Die Variabilität des ovinen κ -Kaseingens sollte innerhalb dieser Arbeit erneut unter Einbeziehung eines möglichst großen, aus sehr unterschiedlichen Phänotypen mit sehr diverser geographischer Herkunft rekrutierten DNA-Panels untersucht werden, mit dem Ziel molekular-genetische Marker zu finden.

Bei der Suche nach Mutationen mit Hilfe mehrere PCR-SSCP-Analysen mit unterschiedlichen Versuchsprotokollen konnten keine Hinweise auf Polymorphismen gewonnen werden.

Eine Anzahl von 33 Individuen aus 11 verschiedenen Rassen wurden daraufhin einer Sequenzanalyse unterzogen, deren Auswertung die Identifizierung von 3 Tieren ermöglichte, die bezogen auf die Position 237 nach Referenz cDNA Sequenz X51822 heterozygot waren. Es handelt sich bei dem Basenaustausch im Exon 4 des *CSN3* um eine Transition zwischen Thymin und Cytosin, die nicht zu einer Änderung der Aminosäuresequenz des κ -Kasein führt. Dieser SNP konnte nicht mit den bereits beschriebenen Polymorphismen aus der oben angeführten Literatur in Verbindung gebracht werden, da er durch die verwendeten Restriktionsendonukleasen nicht detektiert werden konnte. Inzwischen ist der C/T-Austausch von FELIGINI et al. publiziert worden (2006).

Das Auftreten dieser Mutation in niedrigen Frequenzen konnte durch PCR-RFLP-Untersuchungen der 55 Schafrassen aus dem Untersuchungsmaterial bestätigt werden. Nur bei der Rasse Graue gehörnte Heidschnucke (OADEGGH) konnte der SNP nicht festgestellt werden. Auch bei PETER et al. (2007) fiel diese Rasse durch eine deutlich geringere Variabilität bzw. einen höheren Differenzierungsgrad im Vergleich mit den anderen 54 untersuchten Rassen auf. Die Autoren konnten mit einer „Principal component analyse“ (PCA) und der Berechnung der genetischen Distanz nach Reynolds zeigen, dass die am wenigsten variablen Rassen, sich am deutlichsten von den anderen abgrenzen, wenn man die Differenzierung einer Population auf der Basis von Allelfrequenzen an Mikrosatellitenloci schätzt.

Die Allelfrequenzen der Cytosinvariante lagen zwischen 3 % (Deutsche Merinolandschafe OADEMRS und Scottish Blackface OAUKSBF) und 74 % (Rumänische Merinoschafe OAROMRS). Die durchschnittliche Allelfrequenz der Mutation war jedoch deutlich geringer als der Maximalwert und lag bei 21 %. Beträgt die durchschnittliche Allelfrequenz des seltenen Allels bei einem SNP-Marker über 5 % erscheint er für den Einsatz bei populationsgenetischen Studien für geeignet (PARISET et al., 2006). Bei 53 der 55 untersuchten Populationen lagen die geschätzten Allelfrequenzen der Thyminvariante über 50 %. Nur bei den bereits erwähnten rumänischen Merinoschafen und einer spanischen Merinopopulation (OASPMRS) war die Cytosinvariante mit 74 respektive 61 % die häufigere Variante. Diesen Ergebnissen zu Folge kann davon ausgegangen werden, dass die Nukleotidsequenz mit der Base Thymin an Position 238 die phylogenetisch ältere Variante darstellt. Die niedrigen Allelfrequenzen für Cytosin und das auf die Spezies Schaf beschränkte Vorkommen geben Hinweis auf das relativ geringe Alter des Basenaustausches. Der frühe Beginn einer divergenten Entwicklung könnte ein Grund für das Fehlen dieser allelen Varianten bei den Grauen gehörnten Heidschnucken

sein, jedoch muss bei seltenen oder bedrohten Rassen, die eine oder mehrere Flaschenhalsperioden durchgemacht haben, immer auch der mögliche Verlust von Allelen im Rahmen von genetischer Drift im Auge behalten werden. Hinweise auf solche Perioden einer deutlichen Reduktion der Populationsgröße bei der Heidschnucke geben BEHRENS et al. (1982). So sank die Anzahl der Grauen gehörnten Heidschnucken zwischen 1848 bis 1920 von ca. 380 000 auf 35 000. Die genetische Drift hat wie bereits beschrieben dann einen sehr großen Einfluss auf die genetische Differenzierung zwischen den Rassen, wenn man Allelfrequenzen zu ihrer Berechnung heranzieht. PETER et al. (2007) berichten in ihrer Mikrosatellitenstudie von einer hohen Differenzierung der Grauen gehörnten Heidschnucke, so dass Drift auch für die Typisierungsergebnisse am *CSN3* am wahrscheinlichsten scheint.

Der SNP am ovinen *CSN3* wich über alle Rassen hoch signifikant vom HWG ab. Diese Abweichung begründet sich im hoch signifikanten Abweichen vom HWG von neun der 55 Rassen, alle wiesen dabei ein Heterozygotendefizit auf. Es handelte sich hierbei um die deutsche Rasse Rhönschaf, die französische Thone et Martod, die griechische Pilioritiko und Skopelos, die polnische Kaminerschaf, die spanische Colmenarena, die saudische Naemi, die türkische Daglic und die englische Rasse Swaledale. Inzucht innerhalb der Population oder der Wahlundeffekt sind Gründe für Abweichungen vom HWG durch ein Heterozygotendefizit (WEIR, 1990), dies allein scheint aber hier als Begründung nicht auszureichen, da dieselben Rassen an den drei anderen untersuchten Genorten nicht vom HWG abweichen. Der Wahlundeffekt wurde 1928 nach seinem Erstbeschreiber Wahlund benannt und tritt auf, wenn eine Rasse als Gesamtpopulation betrachtet wird, die eigentlich aus verschiedenen Subpopulationen besteht, zwischen denen kein oder nur noch wenig Genfluss stattfindet. Beide Effekte müssten sich aber auf alle analysierten Marker auswirken. Eine weitere Kraft, die sich in Richtung eines Heterozygotendefizites in kleinen Populationen auswirken kann, ist die genetische Drift. Was letztendlich in den ermittelten Rassen zur Abweichung vom HWG am ovinen *CSN3* geführt hat, lässt sich nicht definitiv beantworten. Wahrscheinlich addieren sich alle drei Effekte zur geschätzten Abweichung.

Die genetische Diversität an diesem Genort für die einzelnen Rassen war sehr unterschiedlich und reichte von 0,00 bei der Grauen gehörnten Heidschnucke (DEGGH) und den englischen Exmoor Horn (UKEXH) bis zu H_E -Werten von 0,514 bei den spanischen Merinos (SPMRS). Das erwartete Gefälle der Diversität vom Domestikationszentrum und den Rassen Südosteuropas hin zu den Rassen vom Mittel- und Westeuropa, das von anderen Autoren beschrieben wurde (CANON et al., 2006; PETER et al., 2007), konnte an diesem Genort nicht eindeutig

bestätigt werden, allerdings fallen die fünf deutschen und drei der vier englischen Rassen durch extrem niedrige H_E -Werte 0,00 bis 0,276 auf.

Der Beitrag des Markers zur genetischen Differenzierung zwischen den Rassen ist mit 9,9 % als moderat einzuschätzen. Verglichen mit F_{ST} -Werte anderer SNP-Marker liegt er etwa im Durchschnitt. So fanden PARISET et al. (2006) Werte zwischen unter 1 % (0,0058) und 81 % bei einem durchschnittlichen F_{ST} -Wert von 12 %. Unter Ausschluss der Marker *MC1R_1* und *MC1R_2*, die die extremen F_{ST} -Werte aufgrund von außergewöhnlichen hohen Allelfrequenzen in einer einzelnen Rasse für das jeweils seltene Allel von 89 % aufweisen, liegt der dann ermittelte Durchschnittswert mit 8 % sogar etwas niedriger. Im Vergleich mit den anderen SNP Markern innerhalb dieser Arbeit weist dieser Marker den höchsten F_{ST} -Wert auf.

Mit Hilfe der Ausreißer-Analyse von BEAUMONT & NICHOLS (1996) konnte ein Hinweis darauf gewonnen werden, dass der charakterisierte SNP-Marker am ovinen *CSN3* als positiver Ausreißer potentiell unter adaptiver Selektion steht. Aufgrund der bereits dargelegten Bedeutung des κ -Kaseins im Rahmen der Milchkoagulation sind solche Einflüsse denkbar. Da es sich aber um eine synonyme Mutation ohne direkten Einfluss auf das reife Milchprotein handelt, scheint ein direkter Zusammenhang unwahrscheinlich. Es wäre eher zu erwarten, dass der detektierte Selektionseinfluss durch eine Kopplung mit einer noch unbekanntem genetischen Komponente an einer nahen Position innerhalb der Genregion zu Stande kommt. Hinweise auf solche bestehen bereits durch QTL-Analysen in der Nähe des ovinen *CSN3* (RENDO et al., 2003).

Trotz ausführlicher Sequenzanalysen und dem Einsatz eines aus sehr unterschiedlichen Phänotypen zusammengestellten DNA-Panels bestätigte sich wiederum das bisher beschriebene monomorphe Bild des ovinen *CSN3* im Gegensatz zu den eng verwandten Spezies *Bos taurus* und *Capra hircus*, bei denen sich dieser Genort als hochpolymorph erwiesen hat (MOIOLI et al., 1998).

Die am ovinen *IL2* nach LÜHKEN et al. (2000) charakterisierten Polymorphismen im Exon 1 und im Intron 3 konnten in allen 55 Schafrassen des Untersuchungsmaterials typisiert werden. Es wurden in keiner Rasse Abweichungen vom HWG gefunden. Mit der Ausreißer-Analyse von BEAUMONT & NICHOLS (1996) und mit dem Ewens-Watterson-Test auf Neutralität wurden erwartungsgemäß keine Selektionseinflüsse detektiert.

Die durchschnittliche erwartete Heterozygotie (H_E) innerhalb der Subpopulationen am ovinen *CSN3* betrug über alle Schafrassen nur 0,295, während die H_E für beide Marker am ovinen *IL2* deutlich höher bei 0,480 und 0,406 lag. Die H_E gilt als gutes Maß für die genetische Diversität innerhalb der Rassen. Die Werte sind für biallele Marker sehr hoch, fanden doch PARISET et al. (2006) bei ihren SNP-Markern durchschnittliche erwartete Heterozygotien zwischen 0,0239 und 0,5 und durchschnittliche beobachtete Heterozygotien (H_O -Werte) von 0,0242 und 0,482. Die H_E -Werte der einzelnen Rassen für den SNP-Marker im Exon 1 des *IL2* waren insgesamt bei allen Rassen sehr hoch mit einem Maximalwert von 0,517 bei den türkischen Akkaraman (TKAKK). Nur die ungarischen Cikta (HUCIK) fielen mit dem Minimalwert von 0,274 auf. Der SNP-Marker im Intron 3 wies deutlichere Schwankungen der H_E -Werte zwischen 0,177 bei den griechischen Skopelos und den englischen Exmoor Horn (UKEXH) und 0,512 bei den ägyptischen Ossimi (EGOSS) auf. Wieder zeichnete sich der Großteil der Rassen durch eine mittlere bis hohe genetische Diversität an diesem Genort aus. Die Ausnahmen waren nicht rein geografisch zu begründen, sondern im Falle von Exmoor Horn eher auf die Tatsache zurück zu führen, dass es sich um eine ausgeprägt distinkte Rasse handelt (MASON, 1996). Bei den Skopelosschafen könnte die geringe Populationsgrößen (URL 9 und 10) und die Insellage mit ihren Folgen von vermindertem Genfluss und genetischer Drift eine Rolle spielen. Auffällig ist, dass einige Rassen an den drei analysierten Genorten sehr unterschiedliche H_E -Werte aufweisen. So findet man beispielsweise bei den spanischen Colmenarena sehr hohe H_E -Werte am *CSN3* Exon 4 und am *IL2* Exon 1 von 0,501 respektive 0,505 aber eine unterdurchschnittliche H_E - am *IL2* Intron 3 von 0,274. Ebenfalls ungewöhnliche Werte wurden für die britischen Exmoor Horn ermittelt. Während hier wie bereits angesprochen die H_E am *CSN3* Exon 4 0 ist und auch am *IL2* Intron 3 der Minimalwert von 0,177 erreicht wurde, beträgt sie am *IL2* Exon 1 0,466 und liegt damit nur wenig unter dem Durchschnitt.

Die Allelfrequenzen beider Marker lagen mit 47 % und 31 % deutlich über den geforderten 5 % für das jeweils seltene Allel, was beide für einen Einsatz in populationsgenetischen Studien geeignet erscheinen lässt.

Beide Marker am ovinen *IL2* fielen durch ihre niedrigen F_{ST} -Werte von 3,8 % und 4 % auf. Diese Werte besagen, dass die hohe in alle untersuchte Schafrassen gefundene Diversität an diesem Locus zu 96 % auf die genetische Diversität innerhalb der Rassen zurückzuführen ist und nur zu 4 % auf die Diversität zwischen den Populationen.

Am caprinen *IL2* wurde für die Mutation in der 5'UTR in einigen Rassen ein Abweichen vom HWG gefunden. Außerdem fiel der Polymorphismus bei der Ausreißer-Analyse durch einen extrem niedrigen F_{ST} -Wert (1,2 %) auf. BEAUMONT & NICHOLS (1996) interpretierten dies zunächst als Hinweis darauf, dass der Marker möglicherweise unter balancierender Selektion steht. Neuere Untersuchungen zeigen jedoch auf, dass die angewandte Methode zur Identifizierung balancierender Selektion doch nicht geeignet erscheint (BEAUMONT und BALDING, 2004).

Die durchschnittliche Allelfrequenz für das seltene Allel betrug nur 1 %. Damit erscheint der Marker laut PARISET et al. (2006) wenig geeignet für den Einsatz bei populationsgenetischen Studien. Da er nur in einer einzelnen Rasse aus der Schweiz den Gemsfarbigen Gebirgsziegen (CHALP) in einer Frequenz von 7 % auftrat, könnte das als ein Hinweis auf künstliche Selektion innerhalb dieser Population gewertet werden. Eine Kopplung des SNP-Marker mit einem Rassemerkmal könnte dann zu einer Erhöhung der Allelfrequenz geführt haben. Die genetische Diversität geschätzt mit Hilfe der H_E fiel erwartungsgemäß in allen Rassen sehr niedrig aus.

Untersuchungen eines SNPs in der 5'UTR des humanen *IL2* konnten, wie bereits erläutert, deutliche funktionelle Unterschiede in der Immunreaktion der verschiedenen Genotypen nachweisen. Aufgrund der niedrigen Allelfrequenzen für die charakterisierte Mutation in der 5'UTR des caprine *IL2* werden Zusammenhänge zwischen Phänotyp und Genotyp bei Ziegen nicht ermittelt werden können.

Die jordanische Rasse Baladie (JOBAL) und die türkische Rasse Abaza (TKABA) fielen durch extrem hohe F_{IS} -Werte auf (0,858 und 0,825) und ein Abweichen vom HWG des Markers im Intron 2 des caprinen *IL2* auf. Hohe F_{IS} -Werte entstehen durch ein Heterozygotendefizit und weisen wie bereits angesprochen auf Inzucht und/oder den Wahlundeffekt hin. Beide Effekte müssten sich an allen Genorten gleichermaßen auswirken. Dies konnte allerdings am *CNS3* bei diesen Rassen nicht festgestellt werden. Beide Rassen hatten hier mit 0,146 und -0,002 sogar auffällig niedrige F_{IS} -Werte. In kleinen Populationen ist auch genetische Zufallsdrift als Ursache für ein Abweichen vom HWG denkbar.

Der Marker im Intron 2 des caprinen *IL2* empfahl sich in allen biometrischen Analysen als neutral. Die durchschnittliche Allelfrequenz für das seltene Allel betrug 20 %. Nur bei der griechischen Rasse Skopelos (CHGRSKO) trat das seltene Allel nicht auf. Dies kann vermutlich durch einen Gründereffekt erklärt werden, da die Tiere dieser Population auf mehreren

Inseln leben (URL 9). Durch genetische Drift kann es hierbei zum Allelverlust kommen. Die höchsten Frequenzen von 63 % respektive 52 % wurde für die Schweizer Rasse Sankt Gallener Stiefelgeiß (CHSGB) und die italienische Rasse Orobica (ITORO) gefunden. Während die italienischen Orobicaziegen als sehr distinkt beschrieben werden (CREPALDI et al., 2001), wird für die Stiefelgeiß eine enge Verwandtschaft mit der Gernfarbigen Gebirgsziege ebenfalls aus der Schweiz angenommen (URL 16). Diese Rasse, wie auch die anderen Schweizer Populationen, zeigte allerdings eine viel niedrigere Allelfrequenz von 16 % für die seltenere Thyminvariante. Alle anderen Rassen lagen in ihren Allelfrequenzen sehr nahe am Durchschnitt.

Die H_O (0,293) wich nicht signifikant von der H_E (0,302) ab. Die Werte und damit die genetische Diversität innerhalb der Rassen an diesem Genort waren deutlich niedriger als am *CSN3*. Die H_E bei den einzelnen Rassen, in denen die Mutation auftrat, lag mit hohen Schwankungen zwischen 0,068 bei den albanischen Capore (ALCAP) und hohen 0,508 bei den italienischen Orobica (ITORO). Eine auffällige geographische Verteilung der genetischen Diversität der einzelnen Rassen wurde nicht gefunden. Zur genetischen Differenzierung zwischen den Ziegenrassen trug der Marker moderat mit 8,8 % bei. Dies entspricht dem durchschnittlichen F_{ST} -Wert den auch PARISET et al. (2006) für ihre Marker ermittelt haben.

Im Vergleich mit dem caprinen *CSN3* war die genetische Variabilität am caprinen *IL2* deutlich geringer, was wahrscheinlich durch die bedeutende biologische Funktion des Interleukin-2 im Rahmen der Immunabwehr zu interpretieren ist (SREEKUMAR et al., 2002). Die Wirkung der Zytokine ist eng mit der Effektivität der Synthese des Proteins (HOFFMANN et al. 2001) und außerdem mit ihrer Rezeptorbindungsaffinität (CHANG et al., 1996) gekoppelt. Die Rezeptoren bestehen aus mehreren Untereinheiten und jede geringfügige Änderung z. B. der Tertiärstruktur kann dazu führen, dass der Prozess der Ankopplung sich verändert und damit die biologische Aktivität niedriger oder höher wird. Dementsprechend kommt es dann zu nicht ausreichender oder überschießender Stimulation der Interleukin-2 abhängigen Zelltypen und damit zu einem möglicherweise letalen biologischen Ereignis.

6 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, die genetische Diversität von 51 Ziegenrassen aus Europa, Afrika und Asien am caprinen *CSN3* zu ermitteln und ihre Verteilung innerhalb und zwischen diesen Rassen zu bewerten. Dazu wurde zunächst ein System entwickelt, mit dem die Variabilität an diesem Genort in möglichst wenigen Arbeitsschritten, so spezifisch wie möglich analysiert werden konnte, um dann im nächsten Schritt dieses System auf die DNA-Proben der zu untersuchenden Rassen anzuwenden. Es wurden insgesamt 1659 Tiere aus 16 Ländern analysiert. Die Anzahl der untersuchten Tiere pro Rasse lag zwischen 18 und 73. Mit dem angewendeten PCR-SSCP gelang die simultane, eindeutige Typisierung von *CSN3***A*, *B*'', *C*, *C*', *E*, *G*, *H*, *J* und *M*. Da die Allele *CSN3***D/L*, *F*, *I*, und *K* im PCR-SSCP dasselbe Laufverhalten zeigen, wurden die fraglichen DNA-Proben durch zwei PCR-RFLPs mit den Enzymen *Alw44* und *Bse NI* weiter analysiert. Mit der Kombination der Analyseverfahren konnten 12 genetischen Varianten (*CSN3***A*, *B*'', *C*, *C*', *E*, *F*, *G*, *H*, *I*, *J*, *K* und *M*), eindeutig dargestellt werden, während zwei Typisierungsergebnisse aus jeweils zwei allelen Varianten *CSN3***D* und *L* bzw. *CSN3***B* und *B*' resultieren konnten. Eine weitere Differenzierung zwischen den Allelen *CSN3***D* und *L* bzw. *CSN3***B* und *B*' gelang mit den verwendeten Methoden nicht.

*CSN3***A* und *B/B*' waren die Allele mit den höchsten Frequenzen und traten in allen Rassen auf. Die italienischen Orobica und die türkischen Abaza und Gurcu fielen durch hohe Frequenzen von 29 %, 33 % und 34 % für die allelen Varianten *CSN3***D/L* auf. Das neu charakterisierte *CSN3***C* wurde bei 31 der 51 untersuchten Rassen nachgewiesen, während die bereits bekannte synonyme Variante *CSN3***C*' bei 13 der Populationen gefunden wurde. Die Frequenzen für *CSN3***C* lagen zwischen 2 % (in 14 Rassen) und 32 % (Pinzgauer aus Österreich), und für *CSN3***C*' zwischen 1 % (türkische Haarziegen aus Kil Keci) und 16 % (italienische Valdostanziegen). Das zuvor noch nicht beschriebene *CSN3***M* trat in 17 der 51 analysierten Rassen aus den Ländern Albanien, Griechenland, Italien, Rumänien, Spanien, Nigeria/Kamerun, Saudi-Arabien und der Türkei in Allelfrequenzen zwischen 2 % (in sechs Rassen) und 10 % (albanische Muzhake) auf. Die seltenen Allele *CSN3***E*, *G* und *J* wurden in 6 bzw. je 3 Rassen nachgewiesen. *CSN3***E* trat bei den italienischen Grigia molisana in der höchsten Frequenz von 7 % auf. *CSN3***G* wurde nur bei türkischen Rassen nachgewiesen (Abaza 2 %, Angoraziegen aus Yerköy 2 %, Haarziegen aus Kil Keci 14 %), während *CSN3***J* in drei mitteleuropäischen Ziegenrassen, den Thüringer Waldziegen, den Bunten Deutschen Edelziegen und den Schweizer Gemsfarbigen Gebirgsziegen mit einer

Allelfrequenz von je 2 % typisiert wurde. *CSN3**B'', *I*, *K*, *H* und *F* traten im untersuchten Tiermaterial nicht auf.

Die Anzahl an gefundenen Allelen pro Rasse am *CSN3* variierte zwischen zwei und sechs, die H_E -Werte zwischen 0,152 bei den Thüringer Waldziegen und 0,761 bei den türkischen Haarziegen (Anatolien Native) aus dem Gebiet Kil Keci. Sechs verschiedene Allele wiesen die albanischen Capore und Dukati, die rumänischen Karpathenziegen, die türkischen Abaza, die Angoraziegen aus Yerköy, die Haarziegen aus Kil Keci und die beiden mitteleuropäischen Rassen Bunte Deutsche Edelziege und Schweizer Gemsfarbige Gebirgsziege auf. Die durchschnittlich höchsten Allelzahlen und H_E -Werte wurden bei den Rassen Südosteuropas (Albanien, Rumänien) und der Türkei ermittelt. Die Erhaltung dieser Rassen erhält dadurch eine besondere Bedeutung, da sie als „Reservoir“ genetischer Diversität betrachtet werden können. Die durchschnittliche H_E über alle Rassen am *CSN3* lag bei 0,537 und die beobachtete H_O bei 0,500. Keine der untersuchten Rassen wich an diesem Genort vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ab. Die durchschnittliche genetische Differenzierung der Ziegenrassen, die in diese Analyse eingegangen sind, am *CSN3* betrug 8 %.

Des Weiteren wurde mit Hilfe einer sehr diverse Phänotypen enthaltenden Probenauswahl eine Analyse des ovinen *CSN3* durchgeführt. Dafür wurden DNA von je drei Tiere von 11 verschiedenen Rassen aus 8 Ländern unterschiedlicher Regionen Europas und der Türkei zu PCR-SSCP- und Sequenzanalysen eingesetzt und schließlich ein SNP im Exon 4 dargestellt. Dieser Polymorphismus wurde in den 55 Schafrassen aus 14 Ländern des Untersuchungsmaterials typisiert und biometrisch analysiert. Nur bei einer der untersuchten Rassen, der Grauen gehörnten Heidschnucke (DEGGH), trat er nicht auf. Die Allelfrequenzen für das seltenere Allel mit Cytosin statt Thymin an Position 237 variierten zwischen 3 % bei Scottish Blackface und 74 % bei den rumänischen Merinos bei durchschnittlichen 21 % über alle Rassen. Nur bei den beiden Merinopopulationen aus Rumänien und Spanien waren die Frequenzen für die Cytosinvariante höher als für die Thyminvariante (74 % und 61 %). Zur genetischen Differenzierung zwischen den untersuchten Rassen trug der Marker am ovinen *CSN3* mit 10 % bei. Neun der 55 Rassen wichen an diesem Genort hoch signifikant vom Hardy-Weinberg, bei dreien war die Abweichung signifikant. Die Ausreißer-Analyse erbrachte Hinweise, dass möglicherweise adaptive Selektion auf diesen Marker wirkt.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden SNPs an einem anderen ovinen und caprinen Genort, dem *IL2*, untersucht. Die variablen Positionen des *IL2* befanden sich im ovinen Intron 3 und Exon

1 und im caprinen Intron 2 und der 5'UTR. Bei den Schafrassen wurden hierfür zwei bereits charakterisierte genetische Marker eingesetzt und biometrisch analysiert.

Das Auftreten, der beim Schaf charakterisierten SNPs, am caprinen *IL2* wurde untersucht und konnte nicht bestätigt werden. Stattdessen gelang der Nachweis jeweils einer G/T Transversion im Intron 2 und einer C/T Transition in der 5'UTR durch Sequenzanalysen. Die G/T Transversion trat mit einer durchschnittlichen Allelfrequenz von 20 % für die seltenere Thyminvariante auf. Die Werte variierten zwischen 3 % bei den albanischen Capore und 63 % bei den Stiefelgeißen aus der Schweiz. Nur bei den griechischen Skopelos wurde die Mutation nicht nachgewiesen. Die durchschnittliche Allelfrequenz für die seltenere Cytosinvariante in der 5'-UTR betrug nur 1 %. Der C/T Austausch trat bei 23 der 44 untersuchten Rassen auf. Die höchste Frequenz von 7 % wurde bei den Schweizer Gemsfarbigen Gebirgsziegen geschätzt.

Es konnte gezeigt werden, dass sich der SNP im Intron 2 des *IL2* neutral verhält, während für den SNP in der 5'UTR des caprinen *IL2* der mögliche Einfluss von balancierender Selektion dargestellt werden konnte.

Die SNPs im Exon 1 und Intron 3 des ovinen *IL2* konnten in allen Schafrassen dargestellt werden und wurden in den biometrischen Untersuchungen als neutral eingeschätzt.

Die Frequenz für die seltenere Adeninvariante im Exon 1 betrug durchschnittlich 47 % über alle Rassen. Die Werte lagen zwischen 16 % bei den ungarischen Cikta und 69 % bei der italienischen Rasse Delle Lange. Für den C/T-Austausch im Intron 3 des ovinen *IL2* wurde eine durchschnittliche Allelfrequenz für die seltenere Thyminvariante von 31 % über alle Rassen ermittelt. Der Minimalwert von 10 % wurde für die griechischen Skopelosschafe und die britischen Exmoor Horn ermittelt und der Maximalwert von 69 % für die Rasse Weißes Bergschaf aus Deutschland.

Für beide Marker wurden hohe durchschnittliche erwartete Heterozygotiewerte von 0,480 (*IL2* Exon 1) und 0,406 (*IL2* Intron 3) in den untersuchten Rassen ermittelt. Der Beitrag der beiden Marker am ovinen *IL2* zur genetischen Differenzierung zwischen den Rassen war mit je 4 % gering.

Die Untersuchung der beiden Kandidatengenorte auf mögliche genetische Marker bei den Ziegenrassen hat eine sehr unterschiedliche genetische Variabilität ergeben. Während sich gezeigt hat, dass die Variabilität am *CSN3* sogar noch höher ist, als bereits in der Literatur beschrieben, war es ungleich schwieriger, SNPs am *IL2* zu detektieren.

Bei den untersuchten Schafrassen dagegen war die Variabilität am *CSN3* im Vergleich mit den eng verwandten Spezies *Capra hircus* und *Bos taurus* sehr gering. Der gefundene C/T Austausch an Position 237 im Exon 4 des ovinen *CSN3* führt nicht zum Aminosäureaustausch und damit nicht zu einer Variante auf Proteinebene.

7 Summary

The aim of the present study was to estimate the genetic diversity at *CSN3* within and between 51 goat breeds from Europe, Africa and Asia. Therefore we developed a system for analysing the variability of caprine *CSN3* in the most specific way and in least possible steps. This system was then used in an extensive DNA-sample. We analysed 1659 animals from 16 countrys. The number of typed individuals per breed ranged between 18 and 73. With the used PCR-SSCP method we could genotype simultaneously and unambiguously *CSN3**A, *B*'', *C*, *C*', *D*, *E*, *G*, *H*, *J* and *M*. Because *CSN3**D/L, *F*, *I*, and *K* showed the same pattern in PCR-SSCP analysis we additionally analysed questionable DNA-samples with two different PCR-RFLPs with the enzymes *Alw* 44 and *Bse* NI. With the combination of the this methods we were able to clearly differentiate between 12 genetic variants (*CSN3**A, *B*'', *C*, *C*', *D*, *E*, *F*, *G*, *H*, *I*, *J*, *K* und *M*), while the results for *CSN3**D and *L* could not be used to discriminate between the two different genotypes. Same was true for *CSN3**B and *B*'.

The highest allele frequencies in all breeds was found for *CSN3**A and *B/B*'. Both were genotyped in all analysed populations. The Italian breed Orobica and the Turkish Abaza and Gurcu showed especially high frequencies of 29 %, 33 % and 34 % for the allelic variant *CSN3**D/L. The newly characterized *CSN3**C was found in 31 of the 51 analysed breeds, while the formerly known synonym *CSN3**C' was genotyped in 13 of the populations. The frequencies for *CSN3**C ranged between 2 % (in 13 breeds) and 32 % (Pinzgauer from Austria) and for *CSN3**C' between 1 % (Turkish Hairgoats from Kil Keci) and 16 % (Italian breed Valdostana). *CSN3**M, which was unknown before genotyped in this study, was found in 17 of the 51 analysed breeds. Those breeds come from 9 different countrys (Albany, Greece, Italy, Romania, Spain, Nigeria/Cameroon, Saudi-Arabia and Turkey). The allele frequencies varied between 2 % (in 6 breeds) and 10 % (Muzhake from Albany). The rare alleles *CSN3**E, *G* und *J* was found in 6 (*CSN3**E) and 3 breeds (*CSN3**G and *J*). The highest frequency of 7 % for *CSN3**E was genotyped in Grigia molisana from Italy. *CSN3**G was only present in three Turkish breeds (Abaza 2 %, Angoragoats from Yerköy 2 %, Hairgoats from Kil Keci 14 %), while *CSN3**J could be typed in three breeds from the middle of Europe, the Thuringian Forestgoats, the German Alpine and the Swiss Alpine with low allele frequencies of 2 %. *CSN3**B'', *I*, *K*, *H* and *F* were not found in the analysed populations. The number of alleles per breed at caprine *CSN3* varied from two to six, H_E -value from 0,152 in Thuringian Forestgoats to 0,761 in Turkish Hairgoats (Anatolien Native) from Kil Keci region. Six different

alleles were genotyped in Capore and Dukati from Albany, in the Carpathian from Romania, in the Turkish Abaza, Angoragoats from Yerköy, Hairgoats from Kil Keci region and the two Middle European breeds German Alpine and Swiss Alpine. The highest average number of alleles and heterozygosity were estimated in the breeds of Southeastern Europe (Albany, Romania) and Turkey. The conservation of these breeds is therefore of especially high priority, because of their significance as a „reservoir“ of genetic diversity. The average heterozygosity (H_E) over all breeds at *CSN3* was 0,537 and the observed heterozygosity (H_O) 0,500. None of the analysed breeds showed deviation from Hardy-Weinberg-equilibrium. The average genetic differentiation of the goat breeds in the study at *CSN3* was estimated with 8 %.

Furthermore an analysis of ovine *CSN3* was made via using a very diverse DNA-panel. Therefore we used three individuals of 11 breeds from 8 different countries from different regions of Europe and Turkey. PCR-SSCPs and sequence analysis were done and finally succeeded in the detection of a SNP in Exon 4. This polymorphism was genotyped in the 55 sheep breeds from 14 countries of the study and afterwards biometrically analysed. The SNP was present in all breeds with the exception of the Grey Heath (DEGGH). The allele frequencies for the rare allele with cytosin instead of thymine at position 237 varied from 3 % in Scottish Blackface to 74 % in the Merino population from Romania and were averagely 21 % over all breeds. Only for two Merino populations from Romania and Spain higher frequencies for the cytosin variant than for the thymine variant were estimated (74 % und 61 %). The average genetic differentiation between the sheep breeds in the study at *CSN3* was 10 %. Nine of the 55 analysed breeds showed highly significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium, in three others the deviation was significant. An outlier-analysis revealed possible adaptive selection affecting this SNP-marker.

In the second part of the study various SNPs at a different caprine and ovine gene locus *IL2* were genotyped. The SNPs in *IL2* are located in the ovine Exon 1 and Intron 3 and in caprine Intron 2 and 5'UTR. In sheep breeds two already characterised genetic markers from different regions of *IL2* were used and biometrically analysed.

The variable positions characterized in the sheep were analysed at caprine *IL2* using the screening DNA panel but could not be found. Instead a sequence analysis and a following genotyping via PCR-PFLPs in 30 individuals allowed the characterisation of a G/T transversion in Intron 2 and a C/T transition in 5'UTR. The G/T transversion showed an average allele frequency of 20 % for the thymine variant. Values ranged between 3 % in Capore from Albany and 63 % in Sankt Gallen Booted Goat from Swiss. Only in Greek Skopelos the muta-

tion could not be genotyped. In the 5'UTR the average allele frequency for the rare allele with cytosin was estimated with 1 %. The variant was genotyped in 23 of the 44 analysed breeds. The highest frequency of 7 % was estimated in Swiss Alpine. While the marker in Intron 2 of caprine *IL2* could be proved neutral, possible influence of balancing selection for the SNP in 5'UTR is assumed.

The SNPs in Exon 1 and Intron 3 of ovine *IL2* were genotyped in all 55 ovine breeds of the study and could be proved neutral. The frequency for the rare adenin variant at Exon 1 was estimated with 47 % over all breeds. The range was between 16 % in Hungarian Cikta and 69 % in Italian Delle Lange. For the C/T Substitution in Intron 3 of ovine *IL2* the average allele frequency for the rare thymin variant was 31 %. The lowest value was estimated in the Greek Skopelos and the British Exmoor Horn with 10 % and the highest in the White Mountain Sheep from Germany with 69 %. Both markers showed high average expected heterozygosity, 0,480 for the SNP in Exon 1 and 0,406 for the SNP in Intron 3. The contribution of the two markers at ovine *IL2* to genetic differentiation between breeds was estimated with 4 % which is moderate to low.

The analysis of genetic markers in the two chosen caprine candidate genes showed a very different genetic variability. While variability at *CSN3* was shown to be even higher than already described in literature, it was uneven more difficult to detect SNPs in *IL2*.

In the analysed sheep breeds the variability in *CSN3* compared with close related species like *bos taurus* und *capra hircus* was very low. The identified SNP at position 237 in exon 4 of ovine *CSN3* doesn't change the amino acid sequence and therefore it doesn't result in a variant on protein level.

8 URL-Liste

URL 1: CBD

<http://www.biodiv.org/convention/articles.asp>

URL 2:

http://www.genres.de/CF/tgrden/Rasseb_pdf/pdf_schaf/moorschnucke.pdf

URL 3:

<http://www.monitoring.eu.com/pdf/Ziegen.pdf>

URL 4:

<http://www.genres.de>

URL 5: "Rote Liste"

http://www.genres.de/CF/genres/IBVdownloads/publikationen/rote_Liste.pdf

URL 6:

http://www.landwirtschaft-mlr.baden-wuerttemberg.de/servlet/PB/menu/1064896_L1/index.html

URL 7:

http://idw-online.de/public/pmid-5852/zeige_pm.html

URL 8: GOATMAP:

<http://locus.jouy.inra.fr/cgi-bin/lgbc/mapping/common/intro2.pl?BASE=goat>

URL 9: DAD-IS

<http://dad.fao.org>

URL 10:

<http://www.ilri.org>

URL 11:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

URL 12:

<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>

URL 13:

<http://www.biosphaeren-reservat-rhoen.de/projekte/rhoenschafe.html>

URL 14:

<http://orgprints.org/13715/01/13715-03OE323-uni-giessen-brandt-2007-oekologischeSchweinemast.pdf>

URL 15

<http://dagris.ilri.cgiar.org/display.asp?ID=802>

URL 16

<http://www.zwergziegen.ch/stiefeltext.html>

9 Literaturverzeichnis

- ADAMS, E.J. and PARHAM, P.** (2001): Species-specific evolution of MHC class I genes in the higher primates. *Immunol Rev* 183, 41-64.
- AJMONE-MARSAN, P., NEGRINI, R., CREPALDI, P., MILANESI, E., GORNI, C., VALENTINI, A. and CICOGLA, M.** (2001): Assessing genetic diversity in Italian goat populations using AFLP markers. *Anim Genet* 32, 281-288.
- ALEANDRI, R., BUTTAZZONI, G. and SCHNEIDER, J.C.** (1990): The effects of milk protein polymorphism on milk components and cheese producing abilities. *J Dairy Sci* 73, 241-255.
- ANDERSSON, L.** (2001): Genetic dissection of the 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.
- ANGIOLILLO, A., YAHYAOU, M.H., SANCHEZ, A., PILLA, F. and FOLCH, J.M.** (2002): Short communication: characterization of a new genetic variant in the caprine kappa-casein gene. *J Dairy Sci* 85, 2679-2680.
- ARRANZ, J.J., BAYON, Y. and SAN PRIMITIVO, F.** (1998): Genetic relationships among Spanish sheep using microsatellites. *Anim Genet* 29, 435-440.
- BARKER, J.S.F., TAN, S.G., MOORE, S.S., MUKHERJEE, T.K., MATHESON, J.L. and SELVARAJ, O.S.** (2001): Genetic variation within and relationships among populations of Asian goats (*Capra hircus*). *J Anim Breed Genet* 118, 213-233.
- BASSAM, B.J., CAETANO-ANOLLÉS, G. and GRESSHOFF, P.M.** (1991): Fast and sensitive silver staining of DNA in Polyacrylamide gels. *Analytic Biochemistry* 196, 80-83.
- BAUMUNG, R., CUBRIC-CURIK, V., SCHWEND, K., ACHMANN, R. and SÖLKNER, J.** (2006): Genetic characterisation and breed assignment in Austrian sheep breeds using microsatellite marker information. *J Anim Breed Genet* 123, 265-271.
- BEAUMONT, M.A. and BALDING, D.J.** (2004): Identifying adaptive genetic divergence among populations from genome scans. *Mol Ecol* 13, 969-980.
- BEAUMONT, M.A. and BRUFORD, M.W.** (1999): Microsatellites in conservation genetics. In: *Microsatellites- Application and evolution*. Eds.: D. B. Goldstein and C. Schlotter. Oxford University Press, Oxford, 165-180.
- BEAUMONT, M.A. and NICHOLS, R.A.** (1996): Evaluating loci for use in the genetic analysis of population structure. *P ROY SOC LOND B BIO* 263, 1619-1626.
- BEHRENS, H., DOEHNER, H. and SEEFELDT, G.** (1982). *Die Graue gehörnte Heidschnucke*. Kommunalverlag Lüneburger Heide, Melbeck.
- BEIER, D.R.** (1993): Single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis as a tool for genetic mapping. *Mamm Genome* 4, 627-631.
- BERTAGLIA, M.** (2005), *Livestock biodiversity conservation: the case of sheep and goat breeds in European marginal areas*. Dissertation, Christian-Albrecht-Universität Kiel.
- BMELV** (2008). *Broschüre: Tiergenetische Ressourcen in Deutschland: Nationales Fachprogramm zur Erhaltung und nachhaltigen Nutzung tiergenetischer Ressourcen in Deutschland*, Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz: 67-69.
- BÖKÖNYI, S.** (1976): Development of early stock rearing in the Near East. *Nature* 264, 19-23.
- BRUFORD, M.W.** (2004). *Conservation genetics of UK livestock: from molecules to management*. University of Nottingham Press, Nottingham.
- BRUFORD, M.W., BRADLEY, D.G. and LUIKART, G.** (2003): DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. *Nat Rev Genet* 4, 900-910.

- BRUFORD, M.W. and WAYNE, R.K.** (1993): Microsatellites and their application to population genetic studies. *Curr Opin Genet Dev* 3, 939-943.
- BRUMFIELD, R.T., BEERLI, P., NICKERSON, D.A. and EDWARDS, S.V.** (2003): The utility of single nucleotide polymorphisms in inferences of population history. *Trends Ecol Evol* 18, 249-256.
- CANON, J., D., G., GARCIA-ATANCE, M.A., OBEXER-RUFF, G., LENSTRA, A., AJMONE-MARSAN, P., DUNNER, S. and THE ECONOGENE CONSORTIUM** (2006): Geographical partitioning of goat diversity in Europe and the Middle East. *Anim Genet* 37, 327-334.
- CAPPUCIO, I., PARISSET, L., AJAMONE-MARSAN, P., DUNNER, S., CORTES, O., ERHARDT, G., LÜHKEN, G., GUTSCHER, K., JOOST, S., NIJMAN, I.J., LENSTRA, A., ENGLAND, P.R., ZUNDEL, S., OBEXER-RUFF, G., BEJA-PEREIRA, A., VALENTINI, A. and ECONOGENE_CONSORTIUM** (2006): Allele frequencies and diversity parameters of 27 single nucleotide polymorphisms within and across breeds. *Mol Ecol Notes* 6, 992-997.
- CAROLI, A., CHIATTI, F., CHESSA, S., RIGANESE, D., BOLLA, P. and PAGNACCO, G.** (2006): Focusing on the goat casein complex. *J Dairy Sci* 89, 3178-3187.
- CAROLI, A., CHIATTI, F., CHESSA, S., RIGANESE, D., IBEGHA-AWEMU, E.M. and ERHARDT, G.** (2007): Characterization on the casein gene complex in Western African goats and description of a new alpha-s-1-casein polymorphism. *J Dairy Sci* 90, 2989-2996.
- CAROLI, A., JANN, O., BUDELLI, E., BOLLA, P., JÄGER, S. and ERHARDT, G.** (2001): Genetic polymorphism of goat kappa-casein (CSN3) in different breeds and characterization at DNA level. *Anim Genet* 32, 226-230.
- CHANG, D.Z., TASAYCO, M.L. and CIARDELLI, T.L.** (1995): Structural analogs of interleukin-2: a point mutation that facilitates biological response. *Mol Pharmacol* 47, 206-211.
- CHANG, D.Z., WU, Z. and CIARDELLI, T.L.** (1996): A point mutation in interleukin-2 that alters ligand internalization. *J Biol Chem* 271, 13349-13355.
- CHESSA, S., BUDELLI, E., GUTSCHER, K., CAROLI, A. and ERHARDT, G.** (2003): Short communication: Simultaneous identification of five kappa-casein (CSN3) alleles in domestic goat by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism. *J Dairy Sci* 86, 3726-3729.
- CHIATTI, F., CHESSA, S., BOLLA, P., CIGALINO, G., CAROLI, A. and PAGNACCO, G.** (2007): Effect of kappa-casein polymorphism on the milk composition in the Orobica goat. *J Dairy Sci* 90, 1962-1966.
- CHIKUNI, K., MORI, Y., TABATA, T., SAITO, M., MONMA, M. and KOSUGIYAMA, M.** (1995): Molecular phylogeny based on the kappa-casein and cytochrome b sequences in the mammalian suborder ruminantia. *J Mol Evol* 41, 859-866.
- CLARKE, S.W., TUCKER, E.M. and OSTERHOFF, D.R.** (1989): Blood groups and biochemical polymorphisms in the Naquama sheep breed. *Anim Genet* 20, 279-286.
- COLL, A., FOLCH, J.M. and SANCHEZ, A.** (1993): Nucleotide sequence of the goat kappa-casein cDNA. *J Anim Sci* 71, 2833.
- CORNUET, J.M. and LUIKART, G.** (1996): Description and power analysis of two tests for detecting recent bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144, 2001-2014.
- CREPALDI, P., NEGRINI, R., MILANESI, E., GORNI, C., CICOGLA, M. and AJMONE-MARSAN, P.** (2001): Diversity in five goat populations of the Lombardy Alps com-

- parison of the estimates obtained from morphometric traits and molecular markers. *J Anim Breed Genet* 118, 173-180.
- CRONIN, M.A., STUART, R., PIERSON, B.J. and PATTON, J.C.** (1996): K-casein gene phylogeny of higher ruminants (Pecora, Artiodactyla). *Mol Phylogenet Evol* 6, 295-311.
- CYMBRON, T., FREEMAN, A.R., MALHEIRO, M.I., VIGNE, J.D. and BRADLEY, D.G.** (2005): Microsatellite diversity suggests different histories for Mediterranean and Northern European cattle populations. *Proc R Soc Lond B Bio Sci* 272, 1837- 1843.
- DEBELJAK, M., SUSNIK, S., MARINSEK-LOGAR, R., MEDRANO, J.F. and DOVC, P.** (2000): Allelic differences in bovine kappa-CN gene which may regulate gene expression. *Pflugers Arch* 439, R4-6.
- DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR ZÜCHTUNGSKUNDE E.V.** (1999). Erhaltung der genetischen Vielfalt bei landwirtschaftlichen Nutztieren. Bericht über die Tätigkeit des Arbeitsausschusses der DGFZ zur Erhaltung der genetischen Vielfalt bei landwirtschaftlichen Nutztieren. Ed. DGFZ. Schriftreihe: Heft 14.
- DIEZ-TASCON, C., BAYON, Y., ARRANZ, J.J., DE LA FUENTE, F. and SAN PRIMITIVO, F.** (2001): Mapping quantitative trait loci for milk production traits on ovine chromosome 6. *J Dairy Res* 68, 389-397.
- DIEZ-TASCON, C., LITTLEJOHN, R.P., ALMEIDA, P.A. and CRAWFORD, A.M.** (2000): Genetic variation within the Merino sheep breed: analysis of closely related populations using microsatellites. *Anim Genet* 31, 243-251.
- DOPPELBAUER, J.P.** (2002). Ziegenzucht und Ziegenhaltung in der EU und den Beitrittsländern. In: 1.Fachtagung für Ziegenzüchter und -halter, Irnding, Österreich, 12.-13. November 2002,
- DURIEZ, B., SOBRIER, M.L., TIXIER-BOICHARD, M., DECUYPERE, E., COQUERELLE, G., ZEMAN, M., GOOSSENS, M. and AMSELEM, S.** (1993): A naturally occurring growth hormone receptor mutation: in vivo and in vitro evidence for the functional importance of the WS motif common to all members of the cytokine superfamily. *Mol Endocrinol* 7, 806-814.
- ERHARDT, G., MÜNSCHER, A., BEUNG, R., GRANDKE, R. and RENZ-SCHAUEN, A.** (1996): Effect of genetic polymorphisms of bovine milk protein on cheese yield under practical conditions. Vortrag auf der Jahrestagung der Europäischen Vereinigung für Tierzucht vom 25.-29.08.1996 in Lillehammer/Norwegen.
- EWENS, W.** (1972): The sampling theory of selectively neutral alleles. *Theor. Popul. Biol.* 3, 87-112.
- FAO** (1998). Primary guidelines for development of national farm animal genetic resources management plans. Stand:
- FAO** (2000). World Watch List (3. Ausgabe).
- FAO** (2007). The state of world's genetic resources for food and agriculture. Rom,
- FELIGINI, M., VLACO, S., CURIK, V.C., PARMA, P., GREPPI, G.F., ENNE, G.** (2006): A single nucleotide polymorphism in the sheep kappa-casein coding region. *J Dairy Res* 72, 317-321
- FERNANDEZ, H., HUGHES, S., VIGNE, J.D., HELMER, D., HODGINS, G., MIQUEL, C., HÄNNI, C., LUIKART, G. and TABERLET, P.** (2006): Divergent mtDNA lineages of goats in an Early Neolithic site, far from initial domestication areas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 15375-15379.
- FREYER, G., LIU, Z., ERHARDT, G. and PANICKE, L.** (1999): Casein polymorphism and relation between milk production traits. *J Anim Breed Genet* 116, 87-97.

- GANDINI, G.C. and OLDENBROEK, J.K.** (1999): Choosing the conservation strategy. In: Genebanks and the conservation of farm animal genetic resources. Ed. J. K. Oldenbroek. ID-Leylstad, Institute for Animal Science and Health, Leylstad, Netherlands.
- GANDINI, G.C., OLLIVIER, L., DANELL, B., DISTL, O., GEORGIOUDIS, A., GROENEWALD, E., MARLYMINK, E., VAN AREDONK, J.A.M. and WOLLIAM, J.A.** (2004): Criteria to assess the degree of endangerment of livestock breeds in Europe. *Livestock Prod Sci* 91, 173-182.
- GATESY, J., HAYASHI, C., CRONIN, M.A. and ARCTANDER, P.** (1996): Evidence from milk casein genes that cetaceans are close relatives of hippopotamid artiodactyls. *Mol Biol Evol* 13, 954-963.
- GAULY, M. and ERHARDT, G.** (2001): Genetic resistance to gastrointestinal nematode parasites in Rhon sheep following natural infection. *Vet Parasitol* 102, 253-259.
- GOUDET, J.** (2001). FSTAT: a program to estimate and test gene diversities and fixation indices. Stand:
- GRAUR, D. and LI, W.H.** (2000). Fundamentals of molecular evolution, Sunderland, MA.
- GRAVERT, H.O.** (1996): Nutzung tiergenetischer Ressourcen in der wirtschaftlichen orientierten Tierzucht. In: Vergleichende Aspekte der Nutzung und Erhaltung pflanzen- und tiergenetischer Ressourcen. Band 5. Begemann, F. ZADI Bonn, Tagungsband, Symposiums 7. bis 9. Oktober 1996, Mariensee, 152-157.
- GREGORIO, P.D., RANDO, A., PIERAGOSTINI, E. and MASINA, P.** (1991): DNA polymorphism at the casein loci in sheep. *Anim Genet* 22, 22-30.
- GROBET, L., PONCELET, D., ROYO, L.J., BROUWERS, B., PIROTTIN, D., MICHAUX, C., MENISSIER, F., ZANOTTI, M., DUNNER, S. and GEORGES, M.** (1998): Molecular definition of an allelic series of mutations disrupting the myostatin function and causing double-muscling in cattle. *Mamm Genome* 9, 210-213.
- GROSCLAUDE, F. and MARTIN, P.** (1997). Casein polymorphisms in the goat. In: Milk Protein Polymorphism 2, Palmerston North, New Zealand, 241-253.
- GROSZ, M.D. and MACNEIL, M.D.** (2001): Putative quantitative trait locus affecting birth weight on the bovine chromosome 2. *J Anim Sci* 79, 68-72.
- GULDBERG, P. and GUTTLER, F.** (1993): A simple method for identification of point mutations using denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res* 21, 2261-2262.
- GUO, S.W. and THOMPSON, E.A.** (1992): Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 48, 361-372.
- GUTIÉRREZ-ADÁN, A., MAGA, E.A., MEADE, H., SHOEMAKER, C.F., MEDRANO, J.F., ANDERSON, G.B. and MURRAY, J.D.** (1996): Alterations of the physical characteristics of milk from transgenic mice producing bovine kappa-casein. *J Dairy Sci* 79, 791-799.
- HADRY, H., BALICK, M. and SCHIERWATER, B.** (1992): Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Mol Ecol* 1, 55-63.
- HALL, S.J.G. and BRADLEY, D.G.** (1995): Conserving livestock breed biodiversity. *Trends Ecol Evol* 10, 267-270.
- HALUSHKA, M.K., FAN, J.B., BENTLEY, K., HSIE, L., SHEN, N., WEDER, A., COOPER, R., LIPSHUTZ, R. and CHAKRAVARTI, A.** (1999): Patterns of single-nucleotide polymorphisms in candidate genes for blood-pressure homeostasis. *Nat Genet* 22, 239-247.
- HAMADA, H., SEIDMANN, M., HOWARD, B.H. and GORMAN, C.M.** (1984): Enhanced expression by the poly (dT-dG) poly (dC-dA) sequence. *Mol Cell Biol* 4, 2622-2630.
- HAMMOND, K. and LEITCH, H.** (1996): The FAO global programme for the management of farm animal genetic resources. In: Biotechnology's Role in the Genetic Improvement

- of Farm Animals., Ed. P. V. Miller R., Norman H. (Eds.). American Society of Animal Science, Beltsville Symposia in Agricultural Research. XX., IL: 24-42.
- HARTL, D.L. and CLARKE, A.G.** (1989). Principles of population genetics. zitiert nach Yeh & Yang (1999), Sunderland, MA.
- HAYES, H., PETIT, E., BOUNIOL, C. and POPESCU, P.** (1993): Localization of the alpha-S2-casein gene (CASAS2) to the homoeologous cattle, sheep, and goat chromosomes 4 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 64, 281-285.
- HEDRICK, P.W.** (1999): Perspective: Highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. *Evolution* 53, 313-318.
- HENSELDER, A.** (2004). Vom Aussterben bedrohte Nutztierassen erhalten. *Milch pur.* 3: 22-25.
- HOFFMANN, S.C., STANLEY, E.M., COX, E.D., CRAIGHEAD, N., DIMERCURIO, B.S., KOZIOL, D.E., HARLAN, D.M., KIRK, A.D. and BLAIR, P.J.** (2001): Association of cytokine polymorphic inheritance and in vitro cytokine production in anti-CD3/CD28-stimulated peripheral blood lymphocytes. *Transplantation* 72, 1444-1450.
- HUANG, N., COCKBURN, L.A., AGARWAL, S.A., MARKS, H.L., BURNSIDE, G.,** (1993): Over expression of a truncated growth hormone receptor in the sex-linked dwarf chicken: evidence for a splice mutation. *Mol Endocrinol* 7, 1391-1398.
- IBEAGHA-AWEMU, E.M., JANN, O., WEIMANN, C. and ERHARDT, G.** (2004): Genetic diversity, introgression and relationships among West/Central African cattle breeds. *Gen Sel Evo* 36, 673-690.
- IBV** (2003). Nationales Fachprogramm zur Erhaltung und nachhaltiger Nutzung tiergenetischer Ressourcen in Deutschland. Hrsg.: Informationszentrum für Biologische Vielfalt.
- JANN, O.C., PRINZENBERG, E.M., LUIKART, G., CAROLI, A. and ERHARDT, G.** (2004): High polymorphism in the kappa-casein (CSN3) gene from wild and domestic caprine species revealed by DNA sequencing. *J Dairy Sci* 71, 188-195.
- JEON, J.T., CARLBORG, O., TORNSTEN, A., GIUFFRA, E., AMARGER, V., CHARDON, P., ANDERSSON-EKLUND, L., ANDERSSON, K., HANSSON, I., LUNDSTROM, K. and ANDERSSON, L.** (1999): A paternally expressed QTL affecting skeletal and cardiac muscle mass in pigs maps to the IGF2 locus. *Nat Genet* 21, 157-158.
- JOOST, S., BONIN, M., BRUFORD, M.W., DEPRÉS, L., CONCORD, C., ERHARDT, G. and TABERLET, P.** (2007): A spatial analysis method (SAM) to detect candidate loci for selection: towards a landscape genomics approach to adaptation. *Mol Ecol* 16, 3955-3969.
- JOSHI, M.B., ROUT, P.K., MANDAL, A.K., TYLER-SMITH, C., SINGH, L. and THANGARAJ, K.** (2004): Phylogeography and origin of Indian domestic goats. *Mol Biol Evol* 21, 454-462.
- KAMBADUR, R., SHARMA, M., SMITH, T.P.L. and BASS, J.J.** (1997): Mutations in myostatin (GDF8) in double-musled Belgian blue and piedmontese cattle. *Genome Res* 7, 910-915.
- 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.
- KIERSTEIN, G., HIRBO, J., WAFULA, P., REGE, J.E.O. and HANOTTE, O.** (2002). Diversity of African domestic sheep (*ovis aries*) revealed by mitochondrial D-loop sequence differences. In: Proceedings of the 28th International Conference on Animal Genetics, Göttingen, 65-66.

- KNEITZ, B., HERRMANN, T., YONEHARA, S. and SCHIMPL, A.** (1995): Normal clonal expansion but impaired Fas-mediated cell death and anergy induction in interleukin-2-deficient mice. *Eur J Immunol* 25, 2572-2577.
- KNIPPERS, R.** (2001): Mutationen. DNA-Schäden und DNA Reparatur. In: *Molekulare Genetik*. Gustav Thieme Verlag, Stuttgart.
- KÖHLER, W., PONS, J. and LANGSDORF, A.** (1998): Biometrische Methoden zur Beschreibung genetischer Diversität. In: *Züchterische Nutzung pflanzengenetischer Ressourcen, Ergebnisse und Forschungsbedarf*. Ed. ZADI, Bonn, 93 - 109.
- KRAMER, J., MALEK, M. and LAMONT, S.J.** (2003): Association of twelve candidate gene polymorphisms and response to challenge with *Salmonella enteritidis* in poultry. *Anim Genet* 34, 339-348.
- KRÄUBLICH, H.** (2000): Exploitable genetic variation can be changed under environmental and genetic stress. Consequences for livestock breeding- a review. *J Anim Breed Genet* 117, 275-280.
- LAGOO, A., TSENG, C.K. and SELL, S.** (1990): Interleukin 2 produced by activated B lymphocytes acts as an autocrine proliferation-inducing lymphokine. *Cytokine* 2, 272-279.
- LANDE, R.** (1994): Risk of population extinction from fixation of new deleterious mutations. *Evolution* 48, 1460-1469.
- LEVEZIEL, H., METENIER, L., GUERIN, G., CULLEN, P., PROVOT, C., BERTAUD, M. and MERCIER, J.C.** (1991): Restriction fragment length polymorphism of ovine casein genes: close linkage between the alphaS1-, alphaS2-, beta- and kappa-casein loci. *Anim Genet* 22, 1-10.
- LINDROOS, K., LILJEDAHN, U., RAITIO, M. and SYVANEN, A.C.** (2001): Minisequencing on oligonucleotide microarrays: comparison of immobilisation chemistries. *Nucleic Acids Res* 29, E69-69.
- LODES, A., BUCHENBERGER, J., KRAUSE, I., AUMANN, J. and KLOSTERMEYER, H.** (1996): The influence of genetic variants of milk proteins on the compositional and technological properties of milk 2. Rennet coagulation time and firmness of the rennet curd. *Milchwissenschaften* 51, 543-548.
- LOFTUS, R.T., ERTUGUL, O., HABRA, A.H., EL-BARODY, M.A.A., MACHUGH, D.E., PARK, S.D.E. and BRADLEY, D.G.** (1999): A microsatellite survey of cattle from a centre of origin: the Near East. *Mol Ecol* 8, 2015-2022.
- LUCCIA, A.D., MAURIELLO, R., CHIANESE, L., MOIO, L. and ADDEO, F.** (1990): Kappa-casein polymorphism in caprine milk. *Sci Tecn Latt-Cas* 41, 305-314.
- LÜHKEN, G., HIENDLER, S., PRINZENBERG, E.M. and ERHARDT, G.** (2000): Rapid communication: a single-strand conformation polymorphism in the ovine interleukin-2 (*IL2*) gene. *J Anim Sci* 78, 2754-2755.
- LÜHKEN, G., WEIMANN, C., KRAUS, M., GOLDAMMER, T., WOMACK, J.E. and ERHARDT, G.** (2002): Genetic and physical mapping of the ovine interleukin-2 gene (*IL2*). *Anim Genet* 33, 245-247.
- LUIKART, G., ENGLAND, P.R., TALLMON, D., JORDAN, S. and TABERLET, P.** (2003): The power and promise of population genomics: From genotyping to genome typing. *Nat Rev Genet* 4, 981-994.
- LUIKART, G., GIELLY, L., EXCOFFIER, L., VIGNE, J.D., BOUVET, J. and TABERLET, P.** (2001): Multiple maternal origins and weak phylogeographic structure in domestic goats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 5927-5932.
- MACHUGH, D.E., SHRIVER, M.D., LOFTUS, R.T., CUNNINGHAM, P. and BRADLEY, D.G.** (1997): Microsatellite DNA variation and the evolution, domestication and phy-

- logeography of the taurine and the Zebu cattle (*Bos taurus* and *Bos indicus*). *Genetics* 146, 1071-1086.
- MADDOX, J.F., DAVIES, K.P., CRAWFORD, A.M., HULME, D.J., VAIMAN, D., CRIBIU, E.P., FREKING, B.A., BEH, K.J., COCKETT, N.E., KANG, N., RIFFKIN, C.D., DRINKWATER, R., MOORE, S.S., DODDS, K.G., LUMSDEN, J.M., VAN STIJN, T.C., PHUA, S.H., ADELSON, D.L., BURKIN, H.R., BROOM, J.E., BUITKAMP, J., CAMBRIDGE, L., CUSHWA, W.T., GERARD, E., GALLOWAY, S.M., HARRISON, B., HAWKEN, R.J., HIENDLEDER, S., HENRY, H.M., MEDRANO, J.F., PATERSON, K.A., SCHIBLER, L., STONE, R.T. and VAN HEST, B.** (2001): An enhanced linkage map of the sheep genome comprising more than 1000 loci. *Genome Res* 11, 1275-1289.
- MALKOSKI, M., DASHPER, S.G., O'BRIEN-SIMPSON, N.M., TALBO, G.H., MACRIS, M., CROSS, K.J. and REYNOLDS, E.C.** (2001): Kappacin, a novel antibacterial peptide from bovine milk. *Antimicrob Agents Chemother* 45, 2309-2315.
- MANEL, S., SCHWARTZ, M.K., LUIKART, G. and TABERLET, P.** (2003): Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends in Ecol Evol* 18, 189-197.
- MANNEN, H., NAGATA, Y. and TSUJI, S.** (2001): Mitochondrial DNA reveal that domestic goat (*Capra hircus*) are genetically affected by two subspecies of bezoar (*Capra aegagurus*). *Biochem Genet* 39, 145-154.
- MARLETTA, D., BORDONARO, S., GUASTELLA, A.M. and D'URSO, G.** (2004): Genetic polymorphism at the CSN1S2 locus in two endangered Sicilian goat breeds. *J Anim Breed Genet* 121, 52-56.
- MARTIN, P.** (1993): Polymorphisme génétique des lactoprotéines caprines. *Lait* 73, 511-532.
- MARTIN, P., SZYMANOWSKA, M., ZWIERZCHOWSKI, L. and LEROUX, C.** (2002): The impact of genetic polymorphisms on the protein composition of ruminant milks. *Reprod Nutr Dev* 42, 433-459.
- MASON, I.L.** (1996). *World Dictionary of Livestock Breeds, Types and Varieties.*
- MATESANZ, F., FEDETZ, M., LEYVA, L., DELGADO, C., FERNANDEZ, O. and ALCINA, A.** (2004): Effects of the multiple sclerosis associated-330 promoter polymorphism in *IL2* allelic expression. *J Neuroimmunol* 148, 212-217.
- MAZURIER, S., VAN DE GIESSEN, A., HEUVELMAN, K. and WERNARS, K.** (1992): RAPD analysis of *Campylobacter* isolates: DNA fingerprinting without the need to purify DNA. *Lett Appl Microbiol* 14, 260-262.
- MERCIER, J.C., BRIGNON, G. and RIBADEAU-DUMAS, B.** (1973): Structure primaire de la caseine bovine. Sequence complete. *Eur J Biochem* 35, 222-235.
- MERCIER, J.C., CHOBERT, J.M. and ADDEO, F.** (1976): Comparative study of the amino acid sequences of the caseinomacropetides from seven species. *FEBS LETTERS* 72, 208-214.
- MILLER, R.D. and KWOK, P.Y.** (2001): The birth and death of human single-nucleotide polymorphisms: new experimental evidence and implications for human history and medicine. *Hum Mol Genet* 10, 2195-2198.
- MISSOHOU, A., NGUYEN, T.C., SOW, R. and GUEYE, A.** (1999): Blood polymorphism in West African breeds of sheep. *Trop Anim Health Prod* 31, 175-179.
- MOIOLI, B., PILLA, F. and TRIPALDI, C.** (1998): Detection of milk protein genetic polymorphisms in order to improve dairy traits in sheep and goats: a review. *Small Ruminant Res* 27, 185-195.
- MONTGOMERY, G.W. and SISE, J.A.** (1990): Extraction of DNA from sheep white blood cells. *NZ J Agri Res* 33, 437.

- MORGUN, A., SHULZHENKO, N., RAMPIM, G.F., MEDINA, J.O.P., MACHADO, P.G.P., DINIZ, R.V.Z., ALMEIDA, D.R. and GERBASE-DELIMA, M.** (2003): Interleukin-2 gene polymorphism is associated with renal but not cardiac transplant outcome. *Transplant P* 35, 1344-1345.
- MORIN, P.A., LUIKART, G., WAYNE, R.K. and GROUP, S.W.** (2004): SNPs in ecology, evolution and conservation. *Trends in Ecol Evol* 19, 208-216.
- MULSANT, P., LECERF, F., TABRE, S., SCHIBLER, L., MOYET, P., LAUVELNE, I., PISSELET, C., RIQUET, J., MOUNIAUX, D., CALLEBANT, D., CRIBIU, E.P., THIMOUNIER, J., TEYSSIER, J., BODIN, L., COGURIE, Y., CHILLOW, N. and ELSEN, J.M.** (2000): Mutation in bone morphogenetic protein receptor-IB is associated with an increased ovulation rate in Booroola Merino ewes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 5104-5109.
- MWACHARO, J.M., OTIENO, C.J., OKEYO, A.M. and AMAN, R.A.** (2002): Characterization of indigenous fat-tailed and fat-rumped hair sheep in Kenya: diversity in blood proteins. *Trop Anim Health Prod* 34, 515-524.
- NADERI, S., REZAEI, H.R., TABERLET, P., ZUNDEL, S., RAFAT, S.A., NAGHASH, H.R., ELBARODY, M.A.A., ERTUGRUL, O., POMPANON, F. and CONSORTIUM, T.E.** (2007): Large scale mitochondrial DNA analysis of the domestic goat reveals six haplotype groups with high diversity. *PLoS One* 2, e1012.
- NEELIN, J.M.** (1964): Variants of the kappa-casein revealed by improved starch gel electrophoresis. *J Dairy Sci* 47, 506-509.
- NEI, M.** (1973): Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70, 3321-3323.
- NEI, M.** (1977): F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Ann Hum Genet* 41, 225-233.
- NEZER, C., MOREAU, L., BROUWERS, B., COPPIETERS, W., DETILLEUX, J., HANSET, R., KARIM, L., KVASZ, A., LEROY, P. and GEORGES, M.** (1999): An imprinted QTL with major effect on muscle mass and fat deposition maps to the IGF2 locus in pigs. *Nat Genet* 21, 155-156.
- NG-KWAI-HANG, K.F.** (1997). A review of the relationship between milk protein polymorphism and milk composition/milk production. In: *Milk Protein Polymorphism 2*, Palmerston North, New Zealand, 22-37.
- NG-KWAI-HANG, K.F., HAYES, J.F., MOXLEY, J.E. and MONARDES, H.G.** (1986): Relationship between milk protein polymorphisms and the major milk constituents in Holstein-Friesian cows. *J Dairy Sci* 69, 22-26.
- NICKERSON, D.A., TAYLOR, S.L., WEISS, K.M., CLARK, A.G., HUTCHINSON, R.G., STENGARD, J., SALOMAA, V., VARTAINEN, E., BOERWINKLE, E. and SING, C.F.** (1998): DNA sequence diversity in a 9.7-kb region of the human lipoprotein lipase gene. *Nat Genet* 19, 233-240.
- NOTTER, D.R.** (1999): The importance of genetic diversity in livestock populations of the future. *J Anim Sci* 77, 61-69.
- OH, H.** (1999): The studies on genetic marker of the Korean wild pig (*Sus coreanus*) using RAPD method. *Kor J Ani Sci* 41, 629-636.
- OLDENBROEK, J.K.** (1999): Introduction. In: *Genebanks and the conservation of farm animal genetic resources*. Ed. J. K. Oldenbroek. Institute for Animal Science and Health, Lelystad, Netherlands, 1-9.
- ORDAS, J.G.** (2001): A short note on DNA lactotypes in the Churra and Manchega sheep breeds. *Small Ruminant Res* 41, 71-75.

- ORITA, M.I., H., KANAZAWA H. HAYASHI. K. SEKIYA T.** (1989a): Detection of polymorphisms of the human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 2766-2770.
- ORITA, M.S., Y. SEKYIA T. HAYASHI, K.** (1989b): Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 5, 874-879.
- OVILO, C., CERVERA, M.T., CASTELLANOS, C. and MARTINEZ-ZAPATER, J.M.** (2000): Characterization of Iberian pig genotypes using AFLP markers. *Anim Genet* 31, 117-122.
- PAGE, R.D.M.** (1996): Treeview: an application to display phylogenetic trees on personal computers (<http://iub.bio.indiana.edu/soft/molbio/ibmpc/>). *Computer Applications in Bioscience* 12, 357-358.
- PAGNACCO, G. and CAROLI, A.** (1987): Effect of casein and beta-lactoglobulin genotypes on renneting properties of milks. *J Dairy Res* 54, 479-485.
- PAILHOX, E., VIGIER, B., CHAFFAUX, S., SERVEL, N. and TAOURIT, S.** (2001): A 11,7-kb deletion triggers intersexuality and polledness in goats. *Nat Genet* 29, 453-458.
- PARISET, L., CAPPUCIO, I., AJMONE-MARSAN, P., BRUFORD, M.W., DUNNER, S., CORTES, O., ERHARDT, G., PRINZENBERG, E.-M., GUTSCHER, K., JOOST, S., PINTO-JUMA, G., NIJMAN, I.J., LENSTRA, A., PEREZ, T., VALENTINI, A. and THE ECONOGENE CONSORTIUM** (2006): Characterization of 37 breed-specific single-nucleotide polymorphisms in sheep. *J Heredity* 97, 531-534.
- PÉPIN, L. and NGUYEN, T.C.** (1994): Bloodproteins. *Anim Genet* 25, 333-336.
- PETER, C., BRUFORD, M.W., PEREZ, T., DALAMITRA, S., HEWITT, G., ERHARDT, G. and THE ECONOGENE CONSORTIUM** (2007): Genetic diversity and subdivision of 57 European and Middle-Eastern sheep breeds. *Anim Genet* 38, 37-44.
- PETERS, J., VON DEN DRIESCH, A. and HELMER, D.** (2005): The upper Euphrates-Tigris basin: a cradle of agro-pastoralism? In: *The first steps of animal domestication. New archaeological approaches.* Eds.: J. D. Vigne, J. Peters and D. Helmer. Oxbow Books, Oxford, UK.
- PIRCHNER** (1979). *Populationsgenetik in der Tierzucht.* Paul Parey Verlag Hamburg, Berlin.
- PIRISI, A., PIREDDA, G., PAPOFF, C.M., DI SALVO, R., PINTUS, S., GARRO, G., FERRANTI, P. and CHIANESE, L.** (1999): Effects of sheep alpha s1-casein CC, CD and DD genotypes on milk composition and cheesemaking properties. *J Dairy Res* 66, 409-419.
- PRINGLE, H.** (1998): Neolithic agriculture: reading the signs of ancient animal domestication. *Science* 282, 1448.
- PRINZENBERG, E.-M.** (1998). *Entwicklung von Gendiagnoseverfahren für seltene Milchproteinvarianten beim Rind unter Berücksichtigung des Vorkommens bei vom Aussterben bedrohten Rassen.* Dissertation, Fachverlag Köhler, Giessen.
- PRINZENBERG, E.-M., GUTSCHER, K., CHESSA, S., CAROLI, A. and ERHARDT, G.** (2005): Caprine Kappa-Casein (*CSN3*) Polymorphism: New Developments in Molecular Knowledge. *J Dairy Sci* 88, 1490-1498.
- REGE, J.E.O. and GIBSON, J.P.** (2002). *Animal genetic resources and economic development: issues in relation to economic valuation.* *Ecological Economics*, forthcoming. Stand:
- RENDO, F., UGARTE, E., LIPKIN, E. and ESTONBA, A.** (2003). Detection of QTLs influencing milk production in OAR 6 of the Laxta breed. In: *Proceedings of the international workshop on major genes and QTL in sheep and goat, Toulouse, France, 8-11-dec-2003,*

- RIJNKELS, M.** (2002): Multispecies comparison of the casein gene loci and evolution of casein gene family. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 7, 327-345.
- RIJNKELS, M., KOOIMAN, P.M., DE BOER, H.A. and PIEPER, F.R.** (1997): Organization of the bovine casein gene locus. *Mamm Genome* 8, 148-152.
- RODERO** (1997): *J Anim Breed Genet* 114, 143-161.
- ROOSEN, J., FADLAOUI, A. and BERTAGLIA, M.** (2004): Economic evaluation and biodiversity conservation of animal genetic resources. *J Anim Breed Genet* 122, 217-228.
- RYDER, M.L.** (1983). *Sheep and Man*. G. Duckworth & Co., London, UK.
- SADLACK, B., KUHN, R., SCHORLE, H., RAJEWSKY, K., MULLER, W. and HORAK, I.** (1994): Development and proliferation of lymphocytes in mice deficient for both interleukin-2 and interleukin-4. *Eur J Immunol* 24, 281-284.
- SAITBEKOVA, N., GAILLARD, C., OBEXER-RUFF, G. and DOLF, G.** (1999): Genetic diversity in Swiss goat breeds based on microsatellite analysis. *Anim Genet* 30, 36-41.
- SALAMINI, F., ÖZKAN, H., BRANDOLINI, A., SCHÄFER-PREGL, R. and MARTIN, W.** (2002): Genetics and geography of wild cereal domestication in the near east. *Nat Rev Genet* 3, 429-441.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. and MANIATIS, T.** (1989). *Molecular cloning*, Cold Spring Harbour.
- SANGER, F., NICKLEN, S. and COULSON, A.D.** (1977): DNA sequencing with chain terminating inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5436-5467.
- SCAREL-CAMINAGA, R.M., TREVILATTO, P.C., SOUZA, A.P., BRITO, R.B. and LINE, S.R.P.** (2002): Investigation of an IL2 polymorphism in patients with different levels of chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 29, 587-591.
- SCHIBLER, L., VAIMAN, D., OUSTRY, A., GIRAUD-DELVILLE, C. and CRIBIU, E.P.** (1998): Comparative gene mapping: a fine-scale survey of chromosome rearrangements between ruminants and humans. *Genome Res* 8, 901-915.
- SCHLÖTTERER, C.** (2002): Towards a molecular characterization of adaptation in local populations. *Curr Opin Genet Dev* 12, 683-687.
- SCHLÖTTERER, C.** (2004): The evolution of molecular markers-just a matter of fashion? *Nat Rev Genet* 5, 63-69.
- SCHREIBER, A., SEIBOLD, I., NÖTZOLD, G. and WINK, M.** (1999): Cytochrome b gene haplotypes characterize chromosomal lineages of anoa, the sulawesi dwarf buffalo (*Bovidae: Bubalis sp.*). *J Heredity* 90, 165-176.
- SEIFERT, S. and NÖTZOLD, G.** (1988). *Internationales Anoa-Zuchtbuch*, Leipzig: Zoolog. Garten.
- SIERRA VÁSQUEZ, A., CANUL SOLIS, M., CEN AGUILAR, F., RODRIGUEZ CANUL, R., DELGADO BERMEJO, J.V. and MARTINEZ MARTINEZ, A.** (2003): The Mexican hairless pig: programme of genetic conservation of an endangered breed. *Archivos de Zootecnia* 52, 279-284.
- SREEKUMAR, E., PREMRAJ, A., SARAVANAKUMAR, M. and RASOOL, T.J.** (2002): Buffalo (*Bubalus bubalis* interleukin-2: sequence analysis reveals high nucleotide and amino acid identity with interleukin-2 of cattle and other ruminants. *Eur J Immunogenet* 29, 341-345.
- STAHLBERGER-SAITBEKOVA, N., SCHLÄPFER, J., DOLF, G. and GAILLARD, C.** (2001): Genetic relationships in Swiss sheep breeds based on microsatellite analysis. *J Anim Breed Genet* 118, 379-387.
- STORFER, A.** (1996): Quantitative genetics: a promising approach for the assessment of genetic variation in endangered species. *Trends Ecol Evol* 11, 343-348.

- SULTANA, S., MANNEN, H. and TSUJI, S.** (2003): Mitochondrial DNA diversity of Pakistani goats. *Anim Genet* 34, 417-421.
- SWAISGOOD, H.E.** (1992): Chemistry of caseins. In: *Advanced Dairy Science. Vol. 1 Proteins*, Ed. P. F. Fox. Elsevier Applied Science, London, 63-110.
- SYVANEN, A.C.** (2001): Accessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nat Rev Genet* 2, 930-942.
- TABERLET, P., VALENTINI, A., REZAEI, H.R., NADERI, S., POMPANON, F., NEGRINI, R. and AJMONE-MARSAN, P.** (2007): Are cattle, sheep and goats endangered species? *Mol Ecol* 17, 275-284.
- TADLAOUI OUAFI, A., BABILLIOT, J.-M., LEROUX, C. and MARTIN, P.** (2002): Genetic diversity of the two main Moroccan goat breeds: phylogenetic relationships with the four breeds reared in France. *Small Ruminant Res* 45, 225-233.
- TAJIMA, M., MIYAKE, S., TAKEHANA, K., KOBAYASHI, A., YAMATO, O. and MAEDE, Y.** (1999): Gene defect of dermatan sulfate proteoglycan of cattle affected with variant form of Ehlers-Danlos syndrome. *J Vet Intern Med* 13, 202-205.
- TAUTZ, D. and SCHLÖTTERER, C.** (1994): Simple sequences. *Curr Opin Genet Dev* 4, 832-837.
- THEIN, S.L. and WALLACE, R.B.** (1986): The use of synthetic oligonucleotides as specific hybridization probes in the diagnosis of genetic disorders. In: *Human genetic diseases: a practical approach*. Ed. K. E. Davies. IRL press, Herndon, Virginia, 33-50.
- THEZE, J., ALZARI, P.M. and BERTOGLIO, J.** (1996): Interleukin 2 and its receptors: recent advances and new immunological functions. *Immunol Today* 17, 481-486.
- THREADGILL, D.W. and WOMACK, J.E.** (1990): Genomic analysis of the major bovine milk protein genes. *Nucleic Acids Res* 18, 6935-6942.
- TIENDEREN, P.H.v., HAAN, A.A., LINDEN, C.G.v.d. and VOSMAN, B.** (2002): Biodiversity assessment using markers for ecologically important traits. *Trends Ecol Evol* 17, 577-582.
- VAN LAERE, A., NGUYEN, M., BRAUNSCHWEIG, M., NEZER, C., COLETTE, C., MOREAU, L., ARCHIBALD, A.L., HALEY, C.S., BUYS, N., TALLY, M., ANDERSSON, G., ANDERSSON, L. and GEORGES, M.** (2003): Positional identification of a regulatory mutation in *IGF-2* causing a major QTL effect on muscle growth in the pig. *Nature* 425, 832-836.
- VOS, P., HOGERS, R., BLEEKER, M., REIJANS, M., VAN DE LEE, T., HORNES, M., FRIJTERS, A., POT, J., PELEMAN, J., KUIPER, M. and ET AL.** (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 23, 4407-4414.
- WANG, D.G., FAN, J.B., SIAO, C.J., BERNO, A., YOUNG, P., SAPOLSKY, R., GHANDOUR, G., PERKINS, N., WINCHESTER, E., SPENCER, J., KRUGLYAK, L., STEIN, L., HSIE, L., TOPALOGLOU, T., HUBBELL, E., ROBINSON, E., MITTMANN, M., MORRIS, M.S., SHEN, N., KILBURN, D., RIOUX, J., NUSBAUM, C., ROZEN, S., HUDSON, T.J., LANDER, E.S. and ET AL.** (1998): Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science* 280, 1077-1082.
- WARD, T.J., HONEYCUT, L. and DERR, N.** (1997): Nucleotide sequence evolution at the kappa-casein locus: evidence for positive selection within the family Bovidae. *Genetics* 147, 1863-1872.
- WATTERSON, G.** (1978): The homozygosity test for neutrality. *Genetics* 88, 405-417.
- WEIR, B.S.** (1990). *Genetic data analysis*, Sunderland, MA, USA.
- WEIR, B.S. and COCKERHAM** (1984): Estimating F-statistics for analysis of population structure. *Evolution* 38, 1358-1369.

- WHITE, M.B., CARVALHO, M., DERSE, D., O'BRIEN, S.J. and DEAN, M.** (1992): Detecting single base substitutions as heteroduplex polymorphisms. *Genomics* 12, 301-306.
- WINTER, A., KRAMER, W., WERNER, A., KOLLERS, S., KATA, S., DURSTEWITZ, G., BUTKAMP, J., WOMACK, J.E., THALLER, G. and FRIES, R.** (2002): Association of a lysine-232/alanine polymorphism in a bovine gene encoding acyl-CoA:diacylglyceroltransferase (DGAT1) with variation at a quantitative trait locus for milk fat content. *Proc Natl Acad Sci U S A* 16, 9252-9257.
- WOLLIAM, J.** (2004): Managing populations at risk. In: *Farm animal genetic resources*. Eds.: G. Simm, B. Villanueva and S. Townsend. British Society for Animal Science, Nottingham University Press, Nottingham, UK, 85-106.
- WRIGHT, S.** (1951): The genetical structure of populations. *Ann. Eugen.* 15, 323-354.
- XIA, X. and XIE, Z.** (2001): DAMBE: Software Package for Data Analysis in Molecular Biology and Evolution. *J Heredity* 92, 371-373.
- YAHYAOU, M.H., ANGIOLILLO, A., PILLA, F., SANCHEZ, A. and FOLCH, J.M.** (2003): Characterization and genotyping of the caprine kappa-casein variants. *J Dairy Sci* 86, 2715-2720.
- YAHYAOU, M.H., COLL, A., SANCHEZ, A. and FOLCH, J.M.** (2001): Genetic polymorphism of the caprine kappa casein gene. *J Dairy Res* 68, 209-216.
- YANG, L., ZHAO, S.H., LI, K., PENG, Z.Z. and MONTGOMERY, G.W.** (1999): Determination of genetic relationships among five indigenous Chinese goat breeds with six microsatellite markers. *Anim Genet* 30, 452-455.
- YEH, C.Y. and YANG, R.** (1999). POPGENE-The user-friendly freeware for population genetic analysis. Stand:
- YOUIL, R., KEMPER, B.W. and COTTON, R.G.** (1995): Screening for mutations by enzyme mismatch cleavage with T4 endonuclease V2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 87-91.
- ZEDER, M.A., VIGNE, J.D. and HELMER, D.** (2005): A view from the Zagros: new perspectives on livestock domestication in the fertile crescent. In: *The first steps of animal domestication*. Eds.: J. D. Vigne, J. Peters and D. Helmer. Oxbow Books, 125-146.
- ZELUS, D., ROBINSON-RECHAVI, M., DELACRE, M., AURIAULT, C. and LAUDET, V.** (2000): Fast evolution of interleukin-2 in mammals and positive selection in ruminants. *J Mol Evol* 51, 234-244.
- ZHOU, H. and LAMONT, S.J.** (2003): Associations of six candidate genes with antibody response kinetics in hens. *Poultry Sci* 82, 1118-1126.

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Georg Erhardt, der mir die Möglichkeit gegeben hat an dem EU-Projekt ECONOGENE mitzuwirken, in dessen Rahmen ich meine Dissertation angefertigt habe. Mit extrem viel Geduld und konstruktiver Kritik hat er mich stets unterstützt und immer wieder ermutigt.

Mein besonderer Dank gilt den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Tierzucht und Haustiergenetik, von denen ich mich sehr herzlich aufgenommen gefühlt habe und die mir alles beigebracht haben. Unter ihnen möchte ich mich im speziellen bei Dr. Eva-Maria Prinzenberg und Heike Wagner bedanken, die mich in die feine Kunst der SSCP-Gele eingeführt haben, bei Margarethe Falke, die mich mit meinen abertausenden kleinen Röhrchen nie im Stich gelassen hat und mich des Öfteren auch psychisch aufgerichtet hat (Danke für den Geburtstagskuchen). Mein Dank gilt auch Horst Brand, der mich mit viel Geduld bei den statistischen Auswertungen betreut hat, und allen anderen Doktoranden, die immer für gute Gespräche Zeit aufgebracht haben.

Viele Dank an zahlreiche unerwähnte Kollegen aus den ECONOGENE Partnerinstituten, die nicht nur Proben sondern vielfach auch neue Ideen und gute Tipps beige-steuert haben.

Ich danke auch Dr. Stefania Chessa und Prof Anna Caroli für die tolle Unterstützung bei der Entwicklung der PCR-SSCP Methodik und die gemeinsame Auswertung der Proben.

Ein ganz besonderer Dank gilt den freundlichen Weißen Deutschen Edelziegen Züchtern, die mir ihre kostbare Zeit geschenkt haben und mich Proben ihrer Tiere ziehen ließen, allen voran Herrn Voorhoeve aus Oberderdingen und den Mitarbeitern des Landwirtschaftszentrum Haus Riswick in Kleve.

Vielen Dank meine Freunden Karen, Christina und Abi, die mir -jeder auf seine Art- besonders geholfen haben.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie, hauptsächlich Jörn, Lauri und meinen Eltern, die mich- heute, wie schon immer- bei allem unterstützen und ohne die alles nichts wäre und ohne die diese Arbeit nie fertig geworden wäre.

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig 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 dargelegten 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.