

Aus dem Institut für Tierzucht und Haustiergenetik
der Justus-Liebig-Universität Giessen
Prof. Dr. Dr. G. Erhardt

Feinkartierung am Chromosom 14 des Rindes
und Charakterisierung diverser
Bos taurus und *Bos indicus* Rassen
anhand eines QTL für Milchleistungsmerkmale

Inauguraldissertation zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. agr.)
beim Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökötrophologie und
Umweltmanagement der Justus-Liebig-Universität Giessen

Eingereicht von
Dipl. Ing. Bernhard Kaupe
aus Hedersleben

Giessen 2011

Mit Genehmigung des Fachbereiches Agrarwissenschaften, Ökotoxikologie und
Umweltmanagement der Justus-Liebig-Universität Giessen

Dekanin: Prof. Dr. I.U. Leonhäuser

Prüfungskommission:

Vorsitzende: Prof. Dr. A. Otte
1. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Erhardt
2. Berichterstatter: Prof. Dr. V. Dzapo
Prüfer: Prof. Dr. E. Weigand
Prüfer: Prof. Dr. W. Friedt

Tag der mündlichen Prüfung: 15. April 2011

Diese Arbeit wurde gefördert durch:
H. Wilhelm Schaumann Stiftung, Hamburg
Arbeitsgemeinschaft Deutscher Rinderzüchter, Bonn
Bundesministerium für Bildung und Forschung, Berlin

*Den drei wundervollen Frauen in meinem Leben,
Marianne, Sonja & Sonja*

INHALTSVERZEICHNIS	I
TABELLENVERZEICHNIS	V
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IX
URL VERZEICHNIS	XVI
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	XVIII
PUBLIKATIONSVERZEICHNIS	XXII

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung und Ziele der Arbeit	1
1.1	Einleitende Fragestellung	2
1.2	Ziele der Arbeit	3
2	Literaturübersicht	4
2.1	Genomstruktur und Genomaufbau	4
2.1.1	Genomische Entwicklungsdynamik und Struktur	4
2.1.2	Genfamilien und Pseudogene	14
2.1.3	Molekulare Marker	17
2.1.3.1	Mikrosatelliten	18
2.1.3.2	Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismen	19
2.1.3.3	Single Nucleotide Polymorphismen	20
2.1.3.4	Expressed Sequence Tags	21
2.1.4	Physische Kartierung	22
2.2	Positionale Klonierung und Gesamtgenomsequenz	24
2.2.1	BAC-Bibliotheken	26
2.2.2	BAC Fingerprinting Analyse	30
2.2.3	Sequenzdaten	31
2.3	QTL Analyse	31
2.3.1	Familienstudien	32
2.3.2	Genotypisierung	33
2.3.3	Phänotypisierung	37
	Marker-Merkmal-	
2.3.4	Assoziationen	40
2.3.5	Kandidatengenansatz	41
2.4	<i>Bos taurus</i> Autosom 14	42
2.4.1	Kandidatengene auf <i>BTA14</i>	42
2.4.2	<i>CYP11B1</i> -Gen	43
2.4.3	<i>GML</i> -Gen	46
2.4.4	<i>DGATI</i> -Gen	47

2.5	Haustierzucht unter molekulargenetischen Aspekten	50
2.5.1	Markergestützte Selektion	50
2.5.2	Zuchtwertschätzung und Selektion unter der Berücksichtigung des gesamten Genoms	54
2.5.3	Markergestützte Introgression	55
3	Materialien und Methoden	57
3.1	Materialien	57
3.1.1	Verbrauchsmaterial	57
3.1.2	Chemikalien	57
3.1.3	Reaktionskits	59
3.1.4	Enzyme	59
3.1.5	Nukleotide	60
3.1.6	Puffer	60
3.1.7	Lösungen und Medien	61
3.1.8	Antibiotika	61
3.1.9	Dokumentationsmaterial	61
3.1.10	Geräte	61
3.1.11	Computerprogramme	63
3.1.12	Datenbanken, online	64
3.1.13	DNA	64
3.1.13.1	DNA der Rinderrassen	65
3.1.13.2	ADR-Familienmaterial	65
3.1.13.3	BAC-Banken	67
3.1.13.4	BAC-Klone	67
3.1.13.5	DNA-Standardproben	67
3.1.14	<i>E.coli</i> Stamm DH10B(K12)	70
3.1.15	Vektor pBACe3.6	70
3.2	Methoden	71
3.2.1	Methoden zur Nutzung von genomischer und biotechnologischer Information aus dem World Wide Web	71
3.2.1.1	Datenbanken	72
3.2.1.2	Editieren von Sequenzen zum Primer Design	73
3.2.1.3	Primer Design	73
3.2.2	Molekulargenetische Methoden	74
3.2.2.1	Polymerase Kettenreaktion	74
3.2.2.1.1	Standardisierte PCR- Methode	74
3.2.2.1.2	PCR Optimierung	75
3.2.2.1.3	PCR Variationen	76
3.2.2.1.4	Aufreinigung der PCR-Produkte	78
3.2.2.2	Screening von BAC-Banken	78
3.2.2.2.1	PCR-Pool Screening	78
3.2.2.2.2	Radioaktives Filterscreening	79
3.2.2.3	Präparation von BAC-DNA	82
3.2.2.3.1	Kultur von <i>E.coli</i> (DH10B)	82
3.2.2.3.2	Isolation von BAC-DNA	83
3.2.2.3.3	DNA Quantifizierung mittels Fluoreszenzemission	84

3.2.2.3.4	Aufreinigung von BAC-MIDI Präparation	85
3.2.2.4	BAC-Fingerprint Analyse	85
3.2.2.5	Subklonierung von PCR-Produkten	86
3.2.2.6	DNA-Sequenzierung	86
3.2.2.6.1	Sequenzierreaktion	87
3.2.2.6.2	Aufreinigen der Sequenzierreaktion	89
3.2.2.6.3	ABI-Gelelektrophorese	89
3.2.2.7	Typisierungen der PCR-RFLPs	89
3.2.2.8	Kartierungen der Gene <i>CYP11B1</i> und <i>CYHR1</i>	92
3.2.2.8.1	Physische Kartierungen	92
3.2.2.8.2	Genetische Kartierungen	94
3.2.3	Phänotypen	95
3.2.4	Statistische Methoden	95
3.2.4.1	Regressions-Analyse des gemeinsamen Einflusses von genetischen Effekten der Marker <i>DGATI</i> und <i>CYP11B1</i> auf Milchproduktion, somatische Zellzahl, Fruchtbarkeit und Nutzungsdauer in Deutschen Holstein Rindern	96
3.2.4.2	Regressions-Analyse des gemeinsamen Einflusses von genetischen Effekten der Marker <i>DGATI</i> , <i>CYP11B1</i> , <i>GML</i> ⁺⁴⁰⁵ , <i>GML</i> ⁺⁵⁷³ , <i>KIEL_E8</i> , <i>ILSTS039</i> , <i>CSSM066</i> in additiven Kombinationen auf Milchleistungsmerkmale in Deutschen Holstein Rindern	97
3.2.4.3	Phänotypische Korrelationen zwischen deregressierten Zuchtwerten (DRZW) von fünf Milchproduktionsmerkmalen mit somatischer Zellzahl und Fruchtbarkeitsmerkmalen mit Nutzungsdauer bei Deutschen Holstein Rindern	98
3.2.5	Charakterisierung des <i>DGATI</i> (K232A) Polymorphismus in 42 internationalen Rinderrassen	99
4	Ergebnisse	100
4.1	Molekulargenetische Analyse	100
4.1.1	BAC-Bank Screening und BAC-Contigs	100
4.1.2	Physische Kartierungen des <i>CYP11B1</i> -Gens und eines putativen <i>CYHR1</i> -Paralogs	105
4.1.3	Kandidatengene und Kandidatenloci der QTL-Region	107
4.1.3.1	<i>DGATI</i> -Genotypisierung und Allelfrequenzen	107
4.1.3.2	<i>CYP11B1</i> -Genotypisierung und Allelfrequenzen	111
4.1.3.2.1	Molekulare Analyse des <i>CYP11B1</i> -Gens und eines <i>CYP11B1</i> -Pseudogens	114
4.1.3.2.2	Allelspezifische PCR	117
4.1.3.3	Genotypisierung und Allelfrequenzen des <i>GML</i> -Gens	118
4.1.3.4	Genotypen- und Allelfrequenzen der Mikrosatellitenmarker <i>ILSTS039</i> und <i>CSSM066</i>	123
4.2	Ergebnisse der Datenanalyse	124
4.2.1	Genetische Kartierung der Marker	124
4.2.2	Analyse des Kopplungsungleichgewichts (LD) zwischen Markern	130
4.2.3	Regressionsanalyse des Einflusses genetischer Variation der <i>CYP11B1</i> - und <i>DGATI</i> -Gene auf Leistungs- und Nutzungsmerkmale in Deutschen Holstein Rindern	132
4.2.4	Varianzanalyse und Multiple Regressionsanalyse des Einflusses	

	genetischer Variation der Marker (Typ I+II) <i>KIEL_E8</i> , <i>DGATI</i> , <i>CYP11B1</i> , <i>GML</i> ⁺⁴⁰⁵ , <i>GML</i> ⁺⁵⁷³ , <i>ILSTS039</i> , <i>CSSM066</i> auf Milchleistungsmerkmale in Dt. Holstein Rindern	140
4.2.5	Datenanalyse des <i>DGATI</i> -Polymorphismus in <i>Bos taurus</i> und <i>Bos indicus</i> Rinderrassen	146
5	Diskussion	151
5.1	Auswahl der Kandidatengene und Kandidatenloci	151
5.2	Physische Kartierungen (<i>CYHR1</i> -Paralogon, <i>CYP11B1</i> -Gen)	154
5.3	Allelfrequenzen	155
5.3.1	Frequenzen <i>DGATI</i> in <i>Bos taurus</i> & <i>Bos indicus</i> Rinderrassen	155
5.3.2	Frequenzen <i>DGATI</i> & <i>CYP11B1</i> in ADR-Holstein und ADR-Fleckvieh Familien	159
5.3.3	Frequenzen <i>KIEL_E8</i> , <i>GML</i> , <i>ILSTS039</i> & <i>CSSM066</i> in ADR-Holstein Familien	160
5.4	Kopplung / Kopplungsungleichgewicht	160
5.4.1	Kopplung zwischen Markern	161
5.4.2	Kopplungsungleichgewicht zwischen Markern	162
5.5	Rekombination zwischen Markern	164
5.6	Regressionsanalysen	167
5.6.1	Einfache Regressionsanalyse (Marker <i>CYP11B1</i> und <i>DGATI</i>)	167
5.6.1.1	Substitutionseffekte bei Milchleistungsmerkmalen	168
5.6.1.2	Substitutionseffekte bei Exterieurmerkmalen	169
5.6.1.3	Substitutionseffekte bei Fruchtbarkeitsmerkmalen	170
5.6.1.4	Korrelationen zwischen DRZW für Milchleistungsmerkmale und Fruchtbarkeitsmerkmale	172
5.6.2	Multiple Regressionsanalyse (Marker <i>KIEL_E8</i> , <i>DGATI</i> , <i>CYP11B1</i> , <i>GML</i> ⁺⁴⁰⁵ , <i>GML</i> ⁺⁵⁷³ , <i>ILSTS039</i> , <i>CSSM066</i>)	173
5.6.2.1	Stepwise Regression (Multivariate Analyse durch Multiple Regression)	174
6	Zusammenfassung	180
7	Summary	183
8	Literaturverzeichnis	186

VERZEICHNIS DER TABELLEN IM TEXT

Tabelle	Seite
Tab. 2.1	Pseudogene und Genfragmente im Vergleich (Boichard <i>et al.</i> 1998). 16
Tab. 2.2	Genotyp des <i>E.coli</i> Stammes DH10B (Goller & Mitterbauer 2004)... 27
Tab. 2.3	Übersicht publizierter BAC-Banken von Mensch, Affe und diversen Nutztierarten 29
Tab. 2.4	Vergleich genetischer und physischer Genomgrößen unterschiedlicher Spezies 35
Tab. 2.5	Aminosäuren-Austausche in bovinen <i>CYP11B1</i> Isoenzymen, zusammengestellt aus NCBI Genbank Einträgen. Genbank Acc Nummern sind I: A28415, II: AAA83383, III: BAA0127, IV: P15150, V: JX0071, VI: 1508213A, VII: JX0151, VIII: BAA00268. Die AS Positionen sind nach der Struktur des unreifen Proteins, vom Translationsstart (ATG) aus gezählt 45
Tab. 2.6	<i>DGATI</i> ^K Allelsubstitutionseffekte $\alpha/2$ (definiert wie in Falconer & Mackay 1996) anderer Autoren für Milchleistungsmerkmale in Holstein Rindern 49
Tab. 3.1a	Übersicht der BAC-Klone mit S1 relevanten Identifikationen. JLU-Reg.-Nr. (JLU), Herkunfts-ID (ID), Herkunft (Ort), Kartierungen (FISH, n.k.=nicht kartiert, is.=in silico kartiert), Screening Methode (SM, r=radioaktiver Filter Screen, p=PCR Pool Screen) und den PCR Primersequenzen (Primer) der jeweiligen Screening-Sonde (Sonde) 68
Tab. 3.1b	Übersicht der BAC-Klone mit S1 relevanten Identifikationen. JLU-Reg.-Nr. (JLU), Herkunfts-ID (ID), Herkunft (Ort), Kartierungen (FISH, n.k.=nicht kartiert, is.=in silico kartiert), Screening Methode (SM, r=radioaktiver Filter Screen, p=PCR Pool Screen) und den PCR Primersequenzen (Primer) der jeweiligen Screening-Sonde (Sonde) 69
Tab. 3.2	Protokoll der standardisierten PCR-Methode 74
Tab. 3.3	Cycler-Temperaturgradienten-Protokoll zum Etablieren der PCR- Systeme 76
Tab. 3.4	Long range PCR-Protokoll aus einem in zwei Teile getrennten 50 μ L Ansatz 77
Tab. 3.5	Cycler-Temperatur-Protokoll zur long-range-PCR 78
Tab. 3.6	Unterschiedliche Sequenzier-Annealingtemperaturen nach Primergrößen 87
Tab. 3.7	Sequenzieransatz für PCR Direktsequenzierung 87
Tab. 3.8	Cycler-Temperatur-Protokoll zum Cycle-Sequencing von PCR Produkten 88
Tab. 3.9	Sequenzieransatz für <i>CYP11B1</i> BAC-MIDI und TOPO-MINI Präparation 88

Tab. 3.10	Cycler-Temperatur-Protokoll zum Cycle-Sequencing von MIDI-/MINI-Präparationen	88
Tab. 3.11	Zusammensetzung eines 5% igen PAA-Gels zur Sequenzanalyse auf einem ABI PRISM377 Sequencer	89
Tab. 3.12	Erwartete Fragmentgrößen aus sechs selektiven PCR-Primer-systemen	91
Tab. 4.1	Durch PCR-Pool-Screening und radioaktives Filterscreening identifizierte BAC-Klone der QTL-Region im centromerischen Bereich von <i>BTA14</i> . Zum Screening wurden BAC-Bank BBI-B750 (Zhu et al. 1999) und BAC-Bank TUM-B754 (Buitkamp et al. 2000) des Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH, Berlin (RZPD) genutzt	102
Tab. 4.2	Der Verdau von BAC-MIDI Präparationen mit Restriktionsenzym EcoRI zeigte nach elektrophoretischer Auftrennung auf Agarosegel Fragmente gleicher Größe zwischen den aufgeführten Paaren. Die BAC-Klone sind benannt nach den Genbezeichnungen der PCR-Sonde, mit der sie gefunden wurden. In Klammern tragen sie die JLU-Nummer unter der ihre Glycerolstocks lagern	103
Tab. 4.3	Der Verdau von BAC-MIDI Präparationen mit Restriktionsenzym HindIII zeigte nach elektrophoretischer Auftrennung auf Agarosegel Fragmente gleicher Größe zwischen den aufgeführten Paaren. Die BAC-Klone sind benannt nach der Gen Bezeichnung der PCR-Sonde, mit der sie gescreent wurden. In Klammern tragen sie die JLU-Nummer unter der ihre Glycerolstocks lagern	105
Tab. 4.4	Allelfrequenzen der biallelischen SSCP- und RFLP-Marker (<i>KIEL_E8</i> ¹ , <i>DGATI</i> ^{CfrI} , <i>CYP11B1</i> ^{PstI} , <i>GML</i> ⁺⁴⁰⁵ , <i>GML</i> ⁺⁵⁷³) im ADR-Familienmaterial ohne Großväter und Väter	108
Tab. 4.5	Erwartete Genotypfrequenzen der SSCP- und RFLP-Marker (<i>KIEL_E8</i> [*] , <i>DGATI</i> , <i>CYP11B1</i> , <i>GML</i> ⁺⁴⁰⁵ , <i>GML</i> ⁺⁵⁷³) im ADR-Familienmaterial ohne Großväter und Väter	110
Tab. 4.6	Beobachtete Genotypenfrequenzen der SSCP- und RFLP-Marker (<i>KIEL_E8</i> [*] , <i>DGATI</i> , <i>CYP11B1</i> , <i>GML</i> ⁺⁴⁰⁵ , <i>GML</i> ⁺⁵⁷³) im ADR-Familienmaterial ohne Großväter und Väter	112
Tab. 4.7	Schätzung der Inzuchtkoeffizienten (F_{IS}) und χ^2 -Test auf Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht für SSCP-Marker <i>KIEL_E8</i> , RFLP-Marker <i>DGATI</i> , <i>CYP11B1</i> , <i>GML</i> ⁺⁴⁰⁵ , <i>GML</i> ⁺⁵⁷³ und Mikrosatelliten <i>ILSTS039</i> , <i>CSSM066</i> in allen ADR-Familien	113
Tab. 4.8	Nukleotid Substitutionen zwischen kodierendem <i>CYP11B1</i> -Gen und <i>CYP11B1</i> -Pseudogen in der Promotorregion und im Exon 1	116
Tab. 4.9	Allelfrequenzen der multiallelischen Mikrosatelliten-Marker (<i>ILSTS039</i> ¹ , <i>CSSM066</i> ²) ¹ im ADR-Familienmaterial. Familien ohne Großväter und Väter	120
Tab. 4.10	Genotypfrequenzen (in absolutem & relativem Vorkommen) der multiallelischen Mikrosatellitenmarker (<i>ILSTS039</i> ¹ , <i>CSSM066</i> ²) ¹ im	

	ADR-Familienmaterial Holstein und Fleckvieh. Populationen ohne Großväter und Väter	122
Tab. 4.11	Beobachtete Heterozygotie der Markerloci, Polymorphismus- Informations-Gehalt (PIC) und informative Meiosen für 16 Marker auf <i>BTA14</i> zwischen Deutschen Holstein (DH) und Fleckvieh (FV) Populationen	125
Tab. 4.12	Fisher's Test auf Unabhängigkeit für jedes Marker-Genotyp-Paar über alle Holstein Populationen. Signifikanzen kennzeichnen Kopplungsungleichgewichte. (0 - Hypothese = "keine Kopplung"; geringes χ^2 = Annahme der 0 -Hypothese)	130
Tab. 4.13	a: Diskrete Klassen (Anzahl Genotypen pro Allel) der acht <i>ILSTS039</i> Allele in der ADR Holstein Population. b: χ^2 -Test auf Signifikanz der Kopplung zwischen jedem Allel des Mikrosatelliten-Markers <i>ILSTS039</i> und 5 weiteren Markern in der QTL-Region. χ^2 -Werte bei 8 Freiheitsgraden. Signifikanzen kennzeichnen Kopplungsungleichgewichte. (0 - Hypothese = "keine Kopplung"; geringes χ^2 = Annahme der 0 - Hypothese)	131
Tab. 4.14	Anzahl Söhne (n), Mittelwerte, Standardabweichungen (SD), Minima und Maxima der deregressierten Zuchtwerte (DRZW), Heritabilitäten (h^2) und durchschnittliche Sicherheiten (d. S.) für Milchproduktions-, Fruchtbarkeits-, und Exterieurmerkmale	133
Tab. 4.15	Anzahl der Söhne pro Grandsire und die Verteilung der Valin-Alanin Substitution (V30A) Genotypen im <i>11β-hydroxylase</i> [EC1.14.15.4] kodierenden <i>CYP11B1</i> Gen, sowie der Lysin-Alanin Substitution (K232A) Genotypen in dem für <i>diacylglycerol O-acyltransferase</i> [EC2.3.1.20] kodierenden <i>DGAT1</i> Gen innerhalb jeder Grandsire (Großvater) Familie des Deutschen Holstein Granddaughter-Design	134
Tab. 4.16	Regressionskoeffizienten der Anzahl Lysin Allele (<i>DGAT1</i> ^K) und Valin Allele (<i>CYP11B1</i> ^V), die die Hälfte des Allelsubstitutionseffektes ($\alpha/2$) darstellen, sowie Standardfehler (SE) und Bestimmtheitsmaß (R^2) für Milchproduktions- und Fruchtbarkeitsmerkmale in Deutschen Holstein Rindern; in Einzel- und Gemeinschaftsanalyse geschätzt.	135
Tab. 4.17	Regressionskoeffizienten der Anzahl Lysin Allele (<i>DGAT1</i> ^K) und Valin Allele (<i>CYP11B1</i> ^V), die die Hälfte des Allelsubstitutionseffektes ($\alpha/2$) darstellen, sowie Standardfehler für Exterieurmerkmale in Deutschen Holstein und Fleckvieh Rindern; in Einzel- und Gemeinschaftsanalyse geschätzt	137
Tab. 4.18	Phänotypische Korrelationen zwischen deregressierten Zuchtwerten (DRZW) von fünf Milchproduktionsmerkmalen, somatischer Zellzahl, Fruchtbarkeitsmerkmalen und Nutzungsdauer bei Deutschen Holstein Rindern	138
Tab. 4.19	STEPWISE-Procedure (SAS) Ergebnis der Varianzanalyse (ANOVA) zwischen Markerallelen <i>DGAT1</i> ^K , <i>CYP11B1</i> ^V , <i>GML</i> ⁺⁴⁰⁵ ,	

	<i>GML</i> ⁺⁵⁷³ und fünf Milchleistungsmerkmalen und Somatischer Zellzahl in deutschen Holstein Rindern	139
Tab. 4.20	Überblick der Markerkombinationen zur Auswahl der größtmöglichen Erklärlichkeit (R^2) durch SAS STEPWISE-Procedure Modul	140
Tab. 4.21	STEPWISE-Procedure (SAS) Ergebnis der Varianzanalyse (ANOVA) zwischen Markerallelen <i>DGATI</i> ^K , <i>CYP11BI</i> ^V , <i>GML</i> ⁺⁴⁰⁵ , <i>GML</i> ⁺⁵⁷³ , <i>KIEL_E8</i> ¹ sowie fünf Milchleistungsmerkmalen und Somatischer Zellzahl in deutschen Holstein Rindern. Der partielle R^2 -Wert kennzeichnet den Anteil der Erklärlichkeit an der Gesamtvarianz	141
Tab. 4.22	STEPWISE-Procedure (SAS) Varianzanalyse (ANOVA) mit den Markerallelen <i>DGATI</i> ^K , <i>CYP11B</i> ^V , <i>GML</i> ⁺⁴⁰⁵ , <i>GML</i> ⁺⁵⁷³ , <i>ILSTS039</i> ²¹⁹ , <i>ILSTS039</i> ²²⁵ , <i>CSSM066</i> ¹⁹⁴ , <i>CSSM066</i> ¹⁸⁶ , sowie fünf Milchleistungsmerkmalen und Somatischer Zellzahl in deutschen Holstein Rindern. Der partielle R^2 -Wert kennzeichnet den Anteil der Erklärlichkeit an der Gesamtvarianz	142
Tab. 4.23	Allelsubstitutionskoeffizienten ($\alpha/2$) der STEPWISE Selektion aus Markerkombination 1 (<i>DGATI</i> ^K , <i>CYP11BI</i> ^V , <i>GML</i> ⁺⁴⁰⁵ , <i>GML</i> ⁺⁵⁷³), Markerkombination 2 (<i>DGATI</i> ^K , <i>CYP11BI</i> ^V , <i>GML</i> ⁺⁴⁰⁵ , <i>GML</i> ⁺⁵⁷³ , <i>KIEL_E8</i> ¹), Markerkombination 3 (<i>DGATI</i> ^K , <i>CYP11BI</i> ^V , <i>GML</i> ⁺⁴⁰⁵ , <i>GML</i> ⁺⁵⁷³ , <i>KIEL_E8</i> ¹ , <i>ILSTS039</i> ²¹⁹ , <i>ILSTS039</i> ²²⁵ , <i>CSSM066</i> ¹⁸⁶ , <i>CSSM066</i> ¹⁹⁴) für Milchleistungsmerkmale in Deutschen Holstein Rindern	143
Tab. 4.24	Paarweise berechnete F_{ST} -Werte (Weir & Cockerham 1984) zeigen genetische Differenzierung zwischen Rinderrassen (Nummerierung wie in Tabellen 4.25a, b) gepoolt in drei willkürlich festgelegten Fettgehaltsklassen (Fettgehalte nach Jensen 1995) und einer <i>Bos indicus</i> Rassengruppe.	148
Tab. 4.25a	Allelfrequenzen des <i>DGATI</i> Gens in 38 internationalen Rinderrassen unterschiedlicher Nutzungsrichtung, sowie ihre erwartete und beobachtete Homo- und Heterozygotie und F_{IS} -Werte pro Rasse	147
Tab. 4.25b	Allelfrequenzen des <i>DGATI</i> Gens in 38 internationalen Rinderrassen unterschiedlicher Nutzungsrichtung, sowie ihre erwartete und beobachtete Homo- und Heterozygotie und F_{IS} -Werte pro Rasse	149

VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN IM TEXT

	Seite	
Abb. 2.1	Anordnung homologer Gene im Oxford Grid zwischen Mensch und Maus. Die horizontale Achse ist proportional zur Länge der 22 humanen Autosomen und X und Y unterteilt, die vertikale Achse in gleicher Weise für 19 murine Autosomen sowie X und Y. Jeder Locus, der als homolog zwischen Mensch und Maus bekannt ist wurde im jeweiligen Rechteck eingezeichnet, das seine Position für beide Arten beschreibt (Andersson <i>et al.</i> 1996)	6
Abb. 2.2	Genomgrößen im Vergleich: Der haploide Chromosomensatz (CV) ist in Megabasenpaaren bzw. Gigabasenpaaren angegeben (Gregory 2001b). Der C-Wert der Säugergenome entwickelt sich ohne erkennbaren Zusammenhang zur organisatorischen Komplexität der Organismen	8
Abb. 2.3	Idiogramm eines weiblichen indischen Muntjacs. Homologe chromosomale Bereiche wurden durch Hybridisierung von angefärbten chromosomalen Sonden für Mensch (<i>HSA</i>), Schaf (<i>OAR</i>), Rind (<i>BTA</i>), chinesischer Muntjac (<i>MRE</i>) und Brauner Mazama (<i>MGO</i>) erstellt. Sterne markieren Hybridisierungsbereiche einer centromerischen Sonde von Muntjac und damit Stellen ancestraler Chromosomenfusion (Graves & VandeBerg 1998)	9
Abb. 2.4	Strukturschema eines eukaryotischen Gens und seiner Expressionsprodukte (Schwerin 2000)	12
Abb. 2.5	Darstellung der Gen/Pseudogenverteilung auf Chromosom 8 des Menschen. Insgesamt wurden auf Chromosom <i>HSA8</i> 921 funktionelle Gene in einer durchschnittlichen Dichte von 6,4 Genen pro Mb und ebenso 872 Pseudogene in einer durchschnittlichen Dichte von 6,1 Genen pro Mb lokalisiert. Von Pseudogenen waren 479 prozessiert und 175 nicht prozessiert (nach Torrents <i>et al.</i> 2003, verändert)	17
Abb. 2.6	Darstellung der im Zeitablauf sich ändernden Anwendungshäufigkeit unterschiedlicher molekularer Marker, gemessen an der Frequenz ihrer Publikationen. Die horizontale Achse repräsentiert die Zeit. An jedem Zeitpunkt korrespondiert die vertikale Achse mit der gesamten Anwendung molekularer Marker. Wenn mehr als ein molekularer Marker an einem gegebenen Zeitpunkt verwendet wurde, ist sein relativer Anteil an Wichtigkeit auf der vertikalen Achse aufgetragen (nach Schlötterer 2004, verändert)	19
Abb. 2.7	<i>BTA14</i> mit cytogenetischem Bandenmuster und superpositionierten homologen humanen Kopplungsgruppen des invertierten q-Arms von Chromosom <i>HSA8</i> . Kositioniert ist die RH-Karte von <i>BTA14</i> , die homolog zu humanen Kopplungsgruppen aufgebaut ist (Band <i>et al.</i> 2000, Everts-van-der-Wind <i>et al.</i> 2004)	22
Abb. 2.8	Signale unterschiedlicher Signalstärken einer Gelelektrophorese	

	basierten Sequenzierung (ABI377), die über Farbcodierungen Nukleotiden zugeordnet werden können.	23
Abb. 2.9	Planmäßige Schritte der positionalen Klonierung in der humanen medizinischen Diagnostik (Pray 2003)	25
Abb. 2.10	Karte des pBACe3.6 Vektors (Frengen <i>et al.</i> 1999)	26
Abb. 2.11	BAC Contig aus der centromerischen Region des bovinen Chromosoms 14, entsprechend ausgerichtet an der Karte aus dem telomerischen Ende des humanen Chromosoms 8 (8q24.3, Region 144.902 kb bis 145.618 kb). Klonbezeichnungen entsprechen ihren Filterpositionen. Orthologe Gene zwischen Mensch und Rind sind durch Linien verbunden (Winter <i>et al.</i> 2004)	30
Abb. 2.12	Weiterverfolgung der Vererbung eines Hauptgenotyps (major genotype) mit Auswirkung auf ein quantitatives Merkmal (Q Locus), mit einem eng gekoppelten genetischen Marker (M Locus). Der Bulle ist heterozygot für beide Loci, die Kuh ist homozygot. Die Rekombinationsrate (100% - x%) legt fest, wie oft Q-Allele und M-Allele miteinander verbunden sind (Kinghorn & van der Werf 2000)	33
Abb. 2.13	Graphische Darstellung der Markerverteilung und Markerdichte eines bovinen Whole Genome Scan. Die jeweilige Chromosomenzahl ist auf der horizontalen Achse aufgetragen; die chromosomalen Positionen sind auf der vertikalen Achse in centi Morgan (cM) eingezeichnet. Die Marker auf den Chromosomen sind in kleinen horizontalen Strichen an der Achse des entsprechenden Chromosoms markiert (Schrooten <i>et al.</i> 2000)	34
Abb. 2.14a,b	Genetische Karte von Chromosom 14 des Rindes, (a) MARC 2004 (Ihara <i>et al.</i> 2004), (b) ADR 2000 (Thomsen <i>et al.</i> 2000). Mit der Veröffentlichung der genetischen Karte des US Meat Animal Research Center konnte der durchschnittliche Markerabstand auf der genetischen Karte des Rindes von 2.5 cM (Świtoński 2002) auf 1.0 cM (Ihara <i>et al.</i> 2004) verkürzt werden	36
Abb. 2.15	Heritabilitäten in Deutschen Holstein Rindern für Milchleistungs-, Fruchtbarkeits- und funktionale Merkmale (VIT, Verden, Mai 2004)	37
Abb. 2.16a,b	Beziehungen zwischen geschätzten Zuchtwerten (EBV) und Daughter Yield Deviations (DYD) (a) und geschätzten Zuchtwerten und deregressierten Zuchtwerten (DRPF) (b) für Milchmenge (Thomsen <i>et al.</i> 2001b)	39
Abb. 2.17	Biosynthetischer Entwicklungsweg von Mineralocortikoiden und Glucocortikoiden in der Nebenniere des Rindes. Ausgehend von Cholesterol sind die C21-Hormone bis zum Aldosteron (Mineralocortikoid) und Cortison (Glucocortikoid) blau unterlegt. Das zu jedem Entwicklungsschritt notwendige Enzym ist mit seiner EC-Nummer der IUBMB Enzym Nomenklatur dargestellt. Im Einzelnen sind EC: 1.14.15.6 Cholesterol monooxygenase (C27-side chain cleavage enzyme), EC: 1.1.1.145 3beta-hydroxy-	

	delta5-steroid dehydrogenase, EC: 1.14.99.9 steroid 17alpha-monooxygenase, EC: 1.14.99.10 steroid 21-monooxygenase, EC: 1.14.15.4 steroid 11beta-monooxygenase. Die Grafik wurde erstellt aus Daten der Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes KEGG (URL: 10)	44
Abb. 2.18	Bovines <i>CYP11B1</i> und humanes <i>CYP11B1</i> sind orthologe Gene. Das Diagramm zeigt Positionen des humanen Gens, die 11 β -hydroxylase Mangel verursachen. Sieben Mutationen (T318M, Q338X, Q356X, R374Q, i394, V441G, R448H) treten in homozygoter Form auf, drei Mutationen (Δ C32, K174X, R384Q) in heterozygoter Form (Curnow et al. 1993)	46
Abb. 2.19	Schematische Darstellung der genomischen Organisation des humanen <i>GML</i> Gens. Exone und Introne sind jeweils durch Kästchen und horizontale Linien dargestellt. Schwarze Bereiche sind nicht kodierend, weiße Bereiche symbolisieren den offenen Leserahmen (Kimura et al. 1997a)	47
Abb. 2.20	Schematische Darstellung der genomischen Organisation des bovinen <i>DGATI</i> Gens. Exone und Introne sind jeweils durch Kästchen und Zwischenräume dargestellt, Größen sind in bp angegeben. Die Lysin/Alanin-Substitution in Exon 8 ist eingezeichnet (Winter et al. 2003)	48
Abb. 2.21	Selektionskriterien beim Rind in absteigender Reihenfolge des größten bis geringsten Nutzens von markergestützter Selektion (MAS) nach van Eenennaam (2004)	52
Abb. 2.22	Formale Definition des Zuchtfortschritts (Δ G) nach Meuwissen (2003)	52
Abb. 2.23	Markergestützte Selektion (MAS) kann kurzzeitig die Rate der genetischen Antwort in einem Rahmen von 2% bis 60% in Tierzuchtpopulationen steigern (Kinghorn & van der Werf 2000) ..	53
Abb. 2.24	links: Fleckvieh Kuh aus der Introgressionszucht mit Red Holstein Genetik zur Verbesserung der Milchleistung (BLT, Grub). rechts: Fleckvieh Kuh aus der Introgressionszucht mit genetisch hornlosen Fleckviehbullen (PP) zur Erstellung einer genetisch hornlosen Milchfleckvieh Rasse (BLT, Grub)	56
Abb. 3.1	Das ADR Granddaughter-Design beinhaltet 18 väterliche Halbgeschwisterfamilien der Deutschen Holstein Population (DH), 3 Familien der Deutschen Fleckvieh Population (DFV) und eine Familie Brown Swiss (BS). Die Größe jeder Halbgeschwisterfamilie wird dargestellt durch die Anzahl der Söhne in den umrandeten Feldern. Einige Halbgeschwisterfamilien sind durch gemeinsame Großväter (AA, BB, CC) verwandt, die als Great Grandires dargestellt sind (nach Thomsen et al. 2000 verändert)	66
Abb. 3.2	Genotyp des <i>E.coli</i> Stammes DH10B(K12) (Goller & Mitterbaur 2004)	70
Abb. 3.3	Karte des pBACe3.6 Vektors (BACPAC Recource Center, URL	

	9). Das pUC Link wird bei erfolgreicher Ligation durch DNA-Inserts zwischen den EcoRI Schnittstellen ersetzt. CM(R) kennzeichnet das Chloramphenicol Resistenzgen zur Negativselektion für nicht transformierte Zellen sowie das SacB Gen als Indikator erfolgreicher Ligation. Die T7 und SP6 Promotorsequenzen wurden zum Primerdesign für BAC Endsequenzierungen genutzt.	71
Abb. 3.4	Drei identische PCR-Ansätze mit unterschiedlichen Enhancer-Substanzen im Temperaturgradienten von 63°C (links) bis 56°C (rechts), getrennt durch DNA Größenmarker. PCR-Additive sind DMSO (links), Tween20 (Mitte) und Triton X-100 (rechts)	75
Abb. 3.5	Aufbau eines high-density-Filters der BAC-Bank RZPD_B754. Die Klone einer in 384-well Mikrotiterplatten gelagerten BAC-Bank, werden 2-mal pro Array aufgetragen. Jeder Array besteht aus 5 x 5 = 25 Feldern. Zentral wird ein Orientierungspunkt aus Tinte (■) erzeugt. Alle 24 verbleibenden Felder werden mit BAC-Klonen belegt, wodurch sich 12 mögliche Hybridisierungsmuster (●) für jeden BAC-Klon ergeben. Auf jedem high-density Filter befinden sich 48 x 48 = 2304 Arrays, die je durch einen Orientierungspunkt (■) markiert sind	80
Abb. 3.6	Wachstumskurve von <i>E.coli</i> in LB-Medium am Beispiel des Bakterienstammes DH5αTM mit Plasmid pUC21 (QIAGEN News 4/1998, verändert). Der Zeitabschnitt der logarithmischen Wachstumsphase ist zwischen unterbrochenen Linien auf der x-Achse gekennzeichnet	82
Abb. 4.1	Ein Secondary Screen aus der BAC-Bank RZPD_B754 (PCR-Pool-Screening). Die 8 halbbelegten Reihen einer 96 well Mikrotiterplatte sind auf dem Gel ebenfalls in Reihen (6er Einheiten) aufgetragen. Unterbrochen sind sie jeweils durch eine genomische DNA Kontrolle zum Vergleich der erwarteten Produktgröße. An den Gelrändern sind DNA Größenmarker aufgetragen. In der dritten Reihe (1 Pfeil) sowie in der achten Reihe (2 Pfeile) sind insgesamt 3 Signale auf erwarteter Produkthöhe zu beobachten	101
Abb. 4.2	Autoradiogramm eines BAC-Bank Filter-Screens. Eine <i>KIEL_E8</i> spezifische Sonde wurde an Filter Nr. 10L (Filter Set 004594) der BAC-Bank RZPD_TUM-B754 hybridisiert. Kreise kennzeichnen 2 positive Doppelsignale. (Position oben: 439F2 Position unten: 461H11)	101
Abb. 4.3	Elektropherogramm der mit dem Restriktionsenzym <i>NotI</i> verdauten BAC-MIDI Preparationen zur Überprüfung von Vektorbande und Inserts. Die Vektorbande (pBAC3.6e, Frengen <i>et al.</i> 2000) ist bei 8 kb sichtbar. Größere Fragmente sind BAC-Inserts. Es treten BAC-Inserts mit und ohne zusätzliche <i>NotI</i> -Schnittstellen auf (ein oder mehrere Fragmente). <i>NotI</i> -Schnittstellen haben im Säugergenom eine durchschnittliche Häufigkeit von 3000 (Imoto <i>et al.</i> 1994). Auf den äußeren Spuren des Gels sind DNA-Größenmarker aufgetragen	103

Abb. 4.4	Elektropherogramm eines 0,8%igen Agarosegels mit elektrophoretisch aufgetrennten Restriktionsfragmenten von BAC-MIDI DNA-Präparation verdaut mit Restriktionsenzym <i>HindIII</i> . Pro BAC sind jeweils 3 verdaut Klone aufgetragen. In den außen liegenden Gelbahnen des Fingerprint-Agarosegels sowie zwischen Verdaus wurde DNA-Marker-Mix (SM0331 + SM0231; MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Germany) zur Schätzung der gemeinsamen Fragmentgrößen aufgetragen. Klonbezeichnungen wie in Tabelle 4.1	104
Abb. 4.5a, b	Physische Kartierung der bovinen Gene <i>CYP11B1</i> (Abb. 4.1.5 (a) und <i>CYHR1</i> (Abb. 4.1.5 (b) auf Chromosom <i>BTA14</i> durch Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH). Zur Hybridisierung wurden Metaphasen-Chromosomen eines Simmental Bullen mit einer 14/20 Robertson'schen Translokation an einer Kopie von <i>BTA14</i> und <i>BTA20</i> genutzt, um zweifelsfreie Zuordnung der Hybridisierungssignale zu gewährleisten. Hybridisiert wurde der BAC-Klon RZPD_BBI-B750K2432Q2 für das <i>CYP11B1</i> Gen und BAC-Klon RZPD_BBI-B754J10135Q2 für das <i>CYHR1</i> Gen. Hybridisierungssignale sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Zur besseren Erkennung sind Chromosomenbilder vergrößert auf dem invertierten DAPI-Bild dargestellt. Doppelsignale kennzeichnen Schwesterchromatiden der Metaphase-Chromosomen	106
Abb. 4.6	Elektropherogramm dreier Genotypen des heterozygoten und homozygoten Status beider <i>DGATI</i> -Allele	109
Abb. 4.7	Segregation beider PCR-RFLP Allele (<i>PstI</i>) des Polymorphismus an Position 30 in Exon 1 des bovinen <i>CYP11B1</i> Gens, dargestellt an zwei Halbgeschwister-Familien. Gezeigt ist in der Mitte der Abbildung der verdaut Genotyp des Deutsch Angus Bullen PAMTERA (orange) und an beiden Enden des Gels die Genotypen der beiden mit ihm angepaarten Deutsch Angus Kühe "orange 21" und "orange 27". Dazwischen liegend aufgeführt sind die Genotypen der aus den jeweiligen Anpaarungen resultierenden Kälber der Jahrgänge '98, '99, '01, '02 bzw. '98, '99, '00, '01, '02 zu sehen. Die beiden äußersten Spuren sind mit DNA Größenmarker (pUC Marker 8) belegt	111
Abb. 4.8	Elektropherogramm eines mit <i>DdeI</i> verdauten Mischamplifikates aus kodierendem <i>CYP11B1</i> -Gen und <i>CYP11B1</i> -Pseudogen. Es sind nur zwei Genotypen (AA, AB) zu erkennen	114
Abb. 4.9	Detektion einer 4 Basenpaare großen Deletion (GAGG) in der Promotorregion des bovinen <i>CYP11B1</i> -Pseudogens durch Sequenzierung. Reihe 1 zeigt die Sequenzierung eines Mischamplifikates aus kodierendem <i>CYP11B1</i> -Gen und <i>CYP11B1</i> -Pseudogen. Reihe 2 zeigt die Sequenzierung eines Subklons des bovinen <i>CYP11B1</i> -Pseudogens. Reihe 3 zeigt die Sequenzierung eines Subklons des kodierenden <i>CYP11B1</i> -Gens. Die unterbrochene Linie markiert den Beginn der Doppelsequenz	115
Abb. 4.10	Darstellung eines PCR-RFLPs auf SSCP Gel (DSCN3034). Beide	

- PCRs wurden identisch durchgeführt, jedoch mit unterschiedlichen forward Primern (links 245, rechts 256) die dazu entworfen waren allelspezifisch zwischen kodierendem und pseudo bovinem *CYP11B1* Gen zu differenzieren. Anschließend wurden beide PCR-Produkte ÜN mit dem Restriktionsenzym +405 verdaut und auf SSCP Gel unter identischen Bedingungen (10% PA37, 1% GLE, 650V, 5h, 5°C) aufgetrennt. Die linke Gelhälfte zeigt Genotypen AA, BB, AA, AB, AA, AB (Spuren 2-7) unabhängige Segregation von zwei Allelen. In der rechten Gelhälfte (Spur 8-14) ist keine Segregation zu beobachten. Die dargestellten Bandenkombinationen bestätigen die Typisierung des PCR-RFLPs auf Agarosegel, sowie die Unterschiedlichkeit beider Amplifikate 116
- Abb. 4.11 Entwicklung selektiver PCR-Primer. Die Primersequenzen wurden derart gelegt, das Primer 245, 251, 252, 253 mit ihrem 3'-Ende genau in der Deletion lagen und somit nicht im Pseudogen amplifizieren konnten. Pseudogen-PCR-Primer *255 und *256 enthielten nicht die deletierten Nukleotide und konnten somit nicht im kodierenden Gen amplifizieren..... 117
- Abb. 4.12 Genomische Sequenz des bovinen *GML*-Paralogons (Genbank MGC134423). Die Abbildung zeigt Exon 1 (58bp), Intron 1 (593bp) und Teilsequenz Exon 2 (107bp). Exonische Sequenz ist unterstrichen. „G“ an Nukleotidpositionen +405 (Transition G → A) und +573 (Transversion G → T) kennzeichnen SNPs in Intron 1. Die dargestellte Sequenz wurde unter Genbank Acc. AY950682 beim NCBI hinterlegt 119
- Abb. 4.13 Segregation beider PCR-RFLP Allele (+405) eines SNP in Intron 1 des bovinen *GML*-Gens (Genbank MGC134423), dargestellt an zwei Halbgeschwisterfamilien. Gezeigt ist in der Mitte der Abbildung der verdaut Genotyp des Deutsch Angus Bullen PAMTERA (orange) und an beiden Enden des Gels die Genotypen der beiden mit ihm angepaarten Deutsch Angus Kühe "orange 9" und "orange 1". Dazwischen liegend aufgeführt sind die Genotypen der aus den jeweiligen Anpaarungen resultierenden Kälber der Jahrgänge '98, '99, '00, '01 bzw. '98, '99, '00, '01, '02 zu sehen. Die beiden äußersten Spuren sind mit DNA Größenmarker (pUC Marker 8) belegt 121
- Abb. 4.14 Das schematisierte Holstein-Familienmaterial der Arbeitsgemeinschaft Deutscher Rinderzüchter (ADR) zeigt Verwandtschaftsverhältnisse als Ergebnis einer Auswertung von Pedigree-Informationen mit Hilfe der Pedigree-Datenbank der Holstein-Association USA (URL 50) der in dieser Arbeit untersuchten Halbgeschwisterfamilien. Die Nutzung der kompletten Verwandtschaftsinformation ermöglicht genauere Kartierungsergebnisse. Quadrate (□) kennzeichnen Bullen (Väter/Söhne) und Kreise (○) kennzeichnen Kühe (Mütter/Töchter). Leere und unbeschriftete Quadrate und Kreise kennzeichnen nicht im Familienmaterial enthaltene Tiere, die zur Vollständigkeit der Verwandtschaftsverhältnisse eingezeichnet

- sind. Unmarkierte Linienkreuzungen (+⊥) sind ohne Informationsgehalt, markierte Linienkreuzungen führen zum Vater (◆+⊥) oder zeigen Nachkommen (▼+⊥). AA, BB, CC sind Ur-Großväter (Great Grandsires). AB, AC, AD, AE, AF, BC, BD, BE, CD, CE, CF, CG, CH, CI und CK sind Großväter (Grandsires). Zusätzlich werden DA, EA und FA als unabhängige Großväter (Grandsires) geführt. Die Familiengrößen sind uneinheitlich. Jeder Großvater besitzt die in der Abbildung als Zahlen angegebene Menge von Söhnen (Sons). Wiederum deren weibliche Nachkommen (nicht im Schema enthalten) werden im Familienmaterial als Enkelinnen (Granddaughters) phänotypisch ausgewertet (Weller *et al.* 1990). Die farbliche Gestaltung verdeutlicht reziproke verwandtschaftliche Einflüsse der drei Ur-Großväter AA (blau), BB (rosa) und CC (gelb). 126
- Abb. 4.15a, b Geschlechtsspezifische (männliche) genetische Karte des bovinen Chromosoms 14 (*BTA14* a, b), sowie cytogenetische Karte (*BTA14*). Dargestellt sind die mit CRI-MAP (URL 44) gerechneten genetischen Karten der Holstein Population (a), sowie der Fleckviehpopulation (b) des ADR-Familienmaterials in Kosambi cM. Durch unterschiedliche Rekombinationsfrequenzen zwischen den Rassen unterscheiden sich die Karten in Größe, wie auch die Abstände zwischen den Markern variieren 128
- Abb. 4.15c Physische Karte des proximalen Endes von Chromosom 14 des Rindes, nach NCBI *Bos taurus* Build 4.0 (2009.06.09), verändert. Eingezeichnet sind 18 TypI- und TypII-Marker mit ihren jeweiligen chromosomalen Positionen in Basenpaaren: ◀*KIEL_E8* (257K), ◀*DGATI* (445K), *TSTA3* (909K), *LY6D* (1,2M), ◀*ILSTS039* (1,2M), *CYP11BIP2* (1,2M), *CYP11BIP1* (1,3M), ◀*GML* (1,3M), ◀*CYP11B1* (1,3M), *LY6E* (1,4M), *LY6H* (1,5M), *PTK2* (2,2M), ◀*CSSM066* (4,0M), *TG* (8,04M). ◀ typisierte Marker, ◁ nicht typisierte Marker zur Orientierung in der QTL Region 129
- Abb. 4.16 *DGATI* Allelfrequenzen in 42 internationalen Rinderrassen unterschiedlicher Nutzungsrichtung. (▶ *Bos taurus*, ◀ *Bos indicus*). 145

VERZEICHNIS DER *UNIFORM RESOURCE LOCATORS* (URL) IM TEXT

- URL 1: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- URL 2: <http://www.gmod.org/>
- URL 3: <http://www.genomesize.com/>
- URL 4: <http://www.pseudogene.org/fly>
- URL 5: <http://www.imtech.res.in/raghava/srf/>
- URL 6: <http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html>
- URL 7: <http://www.esp.org>
- URL 8: http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi
- URL 9: <http://bacpac.chori.org/pbase36.htm>
- URL 10: <http://www.genome.ad.jp/kegg/>
- URL 11: <http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html>
- URL 12: <http://www.genebee.msu.su>
- URL 13: <http://www.softberry.com>
- URL 14: <https://www.genome.uci.edu/RevComp/revComp.asp>
- URL 15: <http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>
- URL 16: <http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>
- URL 17: <http://genepop.curtin.edu.au/>
- URL 18: <http://locus.jouy.inra.fr/cgi-bin/lgbc/mapping/common/intro2.pl?BASE=cattle>
- URL 19: <http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/multi-align/multi-align.html>
- URL 20: <http://www.imtech.res.in/raghava/srf/submit.html>
- URL 21: <http://www.cgd.csiro.au/>
- URL 22: <http://www.livestockgenomics.csiro.au/ibiss/>
- URL 23: <http://www.expasy.org/tools/dna.html>
- URL 24: <http://www.tigr.org/tdb/tgi/btgi/searching/reports.html>
- URL 25: <http://cagst.animal.uiuc.edu/COMPASS/index.html>
- URL 26: http://titan.biotec.uiuc.edu/cgi-bin/ESTWebsite/estima_blastui?seqSet=cattle
- URL 27: <http://www2.eou.edu/~jrinehar/genwint/protocol6.htm>
- URL 28: <http://www.genome.ad.jp/kegg/pathway/map/map00100.html>
- URL 29: <http://www.genome.ad.jp/kegg/pathway/map/map00140.html>
- URL 30: <http://www.genome.ad.jp/kegg/pathway/has/HSA00563.html>
- URL 31: <http://rgd.mcw.edu/>
- URL 32: <http://www.ebi.ac.uk/>
- URL 33: <http://www.expasy.org/srs5/>

- URL 34: <http://www.expasy.org/enzyme/>
- URL 35: <http://www.informatics.jax.org/>
- URL 36: http://pre.ensembl.org/Mus_musculus/
- URL 37: <http://www.ensembl.org/>
- URL 38: <http://eshadow.dcode.org/eShadow/index.html>
- URL 39: <http://www.embl.org/>
- URL 40: <http://www.csiro.au/>
- URL 41: <http://www.csiro.au/org/CLI.html>
- URL 42: <http://www.isb-sib.ch/>
- URL 43: <http://www.vit.de/>
- URL 44: <http://compugen.rutgers.edu/multimap/crimap/index.html>
- URL 45: <http://qtl.cap.ed.ac.uk/>
- URL 46: http://www.vetsci.usyd.edu.au/reprogen/QTL_Map/
- URL 47: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>
- URL 48: <http://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/BT/index>
- URL 49: http://www.vetsci.usyd.edu.au/reprogen/QTL_Map/
- URL 50: <http://www.holsteinusa.com/services?action=displayPage&pagename=/extendedPedigree.html>

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN IM TEXT

A	Adenin
A ₂₈₀	Absorption bei 280 nm
Abb	Abbildung
ADP	Adenosin-Diphosphat
AFLP	Amplifizierter Fragment-Längenpolymorphismus
Amp	Ampicilin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-Triphosphat
BAC	Bacterial artificial chromosome
BBI	Babraham Institute, UK
BLAD	Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency
BLAST	basic local alignment search tool
pb	Basenpaar
BSA	Bovines Serum Albumin
<i>BTA</i>	<i>Bos taurus</i>
C	Cytosin
CATS	comparative anchored tagged sequences
cDNA	copy-Desoxyribonucleic Acid
<i>CHI</i>	<i>Capra hircus</i>
cM	centiMorgan
Cm	Chloramphenicol
cm	Zentimeter
cpm	counts per minute
CSAM	contiguous sets of autosomal markers
CSIRO	Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization
<i>CSSM066</i>	CSIRO simple sequence microsatellite 66
CVM	Complex Vertebral Malformations
<i>CYC1</i>	cytochrome c-1
<i>CYP11B1</i>	cytochrome P450, subfamily XI B, polypeptide 1
<i>CYP11B1P</i>	cytochrome P450, subfamily XI B, polypeptide 1, pseudogene
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddH ₂ O	double destilated H ₂ O
<i>DGATI</i>	diacylglycerol O-acyltransferase homolog 1
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonucleic Acid
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DRBV	deregressed breeding value (deregressierter Zuchtwert)
DRZW	deregressierter Zuchtwert
DSB	Deutsches Schwarzbuntes Niederungsrind
d. S.	durchschnittliche Sicherheit
Dt.	Deutsch(es)
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DUMPS	Deficiency in Uridine Monophosphate Synthase

EBV	estimated breeding value (geschätzter Zuchtwert)
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
EST	Expressed sequence tag
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
FY	fat yield (Fettmenge)
g	Gravitation
Gbp	Giga Basenpaare
<i>GML</i>	glycosylphosphatidylinositol anchored molecule like protein
h	Stunde
h ²	Heritabilität
HCl	Hypochlorige Säure
<i>HSA</i>	<i>Homo sapiens</i>
HTG	High Throughput Genomic sequences
IBISS	Interactive Bovine In-Silico SNP Database
IBRP	International Bovine Reference Panel
ILRAD	International Laboratory for Research on Animal Disease
<i>ILSTS039</i>	ILRAD sequence tagged side 39
IUBMB	International Union of Biochemistry and Molecular Biology
JLU	Justus-Liebig-Universität
JPEG	Joint Photographic Expert Group
K	Kalium
KAc	Kaliumacetat
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
KIEL	Christian-Albrechts-Universität Kiel
<i>KIEL_E8</i>	KIEL EST 8
Lakt	Laktation
L	Liter
LB	Luria-Bertani Medium
LE	linkage equilibrium (Kopplungsgleichgewicht)
LD	linkage disequilibrium (Kopplungsungleichgewicht)
LINE	long interspersed nucleotide elements
LOD	logarithm of the odds
M	Mol
MAS	marker assisted selection (Marker gestützte Selektion)
MAI	marker assisted introgression (Marker gestützte Introgression)
mA	Milliampere
Mb	Megabasen
MD	Myophosphorylase Deficiency
MEDLINE	National Library of Medicine's (NLM) bibliographic database
mg	Milligramm
Mg	Magnesium
MH	muscular hypertrophy
min	Minute
mL	Milliliter

mm	Millimeter
mM	Millimol
<i>MMUS</i>	<i>Mus musculus</i>
MY	milk yield (Milchmenge)
mNRR90	maternale non-return-Rate 90
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromol
n	Anzahl
Na	Natrium
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (oxidiert)
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (reduziert)
NaOH	Natriumhydroxyd
NCBI	National Center of Biotechnology Information, USA
NF	nombre fondamental
ng	Nanogramm
NIH	National Institute of Health, USA
Nm	Nanometer
Nt	Nukleotid
o.A.	Ohne Angaben
<i>OAR</i>	<i>Ovis aries</i>
OD ₂₆₀	Optische Dichte bei 260 nm
OD ₂₈₀	Optische Dichte bei 280 nm
P	Wahrscheinlichkeit
P1	Parentale Generation
PAA	Polyacrylamid
PAC	P1 artificial chromosome
PCR	polymerase chain reaction
PFGE	pulsed field gel electrophoresis
pg	billion Basenpaare
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
pmol	Picomol
PMSF	Phenylmethylsulphonylfluorid
PTM	Posttranslatorische Modifikation
<i>PTK2</i>	protein tyrosine kinase 2
QTL	quantitative trait locus
RFLP	Restriktionsfragment Längenpolymorphismus
RNA	ribonucleic acid
RPCI	Roswell Parc Cancer Institute, USA
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
PY	protein yield (Proteinmenge)
revT	reverse Transcriptase
s	Sekunde
SD	standard deviation (Standardabweichung)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

SINE	short interspersed nucleotide elements
SNP	single nucleotide polymorphism
SSCP	single strand conformation polymorphism
ssp.	sub species
STS	Sequence tagged side
T	Thymin
Tab	Tabelle
Taq	Thermophilus aquaticus
TBE	Tris-Borat
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TG	thyroglobulin
TGGE	Temperaturgradienten Gelelektrophorese
TIFF	tagged image file format
TIGR	The Institute for Genomic Research
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-Propanediol
TUM	Technische Universität München
U	unit
ü.N.	über Nacht
UniProt	Universal Protein Resource
URL	Uniform resource locator
USDA	United States Department of Agriculture
UTR	Untranslated region
V	Volt
VNTR	Variable number of tandem repeats
Vol	Volumen
W	Watt
www	world wide web
WEAFER	Progressive bovine myeloencephalopathy
YAC	yeast artificial chromosome

**VERZEICHNIS DER PUBLIKATIONEN, DIE GANZ ODER TEILWEISE AUS
DIESER DISSERTATION HERVORGINGEN:**

Kaupe B, Brandt H, Prinzenberg EM, and Erhardt G

Joint analysis of the influence of *CYP11B1* and *DGATI* genetic variation on milk production, somatic cell score, conformation, reproduction, and productive lifespan in German Holstein cattle.

Journal of Animal Science (2007) 85, 11-21

Kaupe B, Kollers S, Fries R, and Erhardt G

Mapping of *CYP11B* and a putative *CYHR1* paralogous gene to bovine chromosome 14 by FISH.

Animal Genetics (2004) 35, 462-504

Kaupe B, Winter A, Fries R, and Erhardt G

DGATI Polymorphism in *Bos taurus* and *Bos indicus* Cattle Breeds.

Journal of Dairy Research (2004) 71, 182-187

Kühn C, Thaller G, Winter A, Bininda-Emonds ORP, **Kaupe B**, Erhardt G, Bennewitz J, Schwerin M, and Fries R

Evidence for Multiple Alleles at the *DGATI* Locus Better Explains a Quantitative Trait Locus With Major Effect on Milk Fat Content in Cattle.

Genetics (2004) 167, 1873–1881

Bennewitz J, Reinsch N, Paul S, Looft C, **Kaupe B**, Weimann C, Erhardt G, Thaller G, Kühn C, Schwerin M, Thomsen H, Reinhardt F, Reents R, and Kalm E

The *DGATI* K232A Mutation Is Not Solely Responsible for the Milk Production Quantitative Trait Locus on the Bovine Chromosome 14.

Journal of Dairy Science (2004) 87, 431-442

Thaller G, Kramer W, Winter A, **Kaupe B**, Erhardt G, and Fries R

Effects of *DGATI* variants on milk production traits in German cattle breeds

Journal of Animal Science (2003) 81,1911-18

1 Einleitung & Ziele der Arbeit

Die Idee einer QTL-Kartierung kann bis zu Karl Sax (1923) zurückverfolgt werden, der in Bohnen Assoziationen zwischen Samengröße mit Samenschalenmustern und Pigmentierung untersuchte. Der Begriff des Quantitative Trait Locus (QTL) wurde aber erst sehr viel später geprägt. Geldermann (1975) konnte zeigen, dass individuelle Chromosomenabschnitte verantwortlich waren für die Variation in ökonomisch wichtigen Merkmalen. Die erste systematische Suche im Rindengenom nach QTL mit einem Effekt auf Milchproduktion wurde 1995 von Georges und Mitarbeitern durchgeführt.

Ein QTL kann die Variation entweder eines Gens oder einer Gruppe gekoppelter Gene darstellen und somit qualitativer oder quantitativer Natur sein. Der Zweck der Kartierung von QTL in Nutztieren ist die Identifizierung von Genen, die ein qualitatives oder quantitatives Merkmal beeinflussen und letztlich die Nutzung der Variation in diesen Genen mit dem Ziel, überlegene Individuen aus einer Population zu selektieren (Grapes *et al.* 2004). Um chromosomale Regionen mit einer genetischen Variation in ökonomisch wertvollen Leistungsmerkmalen aufzudecken, wurden die ersten Kopplungskarten erarbeitet (Barendse *et al.* 1997, Kappes *et al.* 1997). Obwohl diese Arbeiten erfolgreich die ungefähren chromosomalen Regionen mit QTL Variation beschreiben konnten, waren doch die Kartierungsintervalle noch sehr groß (Zhang *et al.* 1998, Farnir *et al.* 2002).

Genetische Karten mit hoher Dichte sind wesentliche Instrumente für die Identifizierung von Genen, die für mutierende Phänotypen verantwortlich sind, aber auch für die vergleichende und evolutionäre Genomik. Als Marker, die üblicherweise für eine Kopplungsanalyse Verwendung finden, zählen neben phänotypischen Eigenschaften (Sax 1923) heute vor allem genotypische Erkennungsstellen wie Expressed Sequence Tags (ESTs), Randomly Amplified Polymorphic Marker (RAPDs), Amplified Fragment Length Polymorphic Marker (ALFPs) und Mikrosatelliten-Marker (MS). Einer der heute am häufigsten verwendeten Marker ist der Single Nucleotide Polymorphism (SNP). SNP sind stabile genetische Variationen, die im gesamten Genom verteilt zu finden sind. Derartige DNA-Marker kommen sowohl in der Grundlagenforschung als auch bei angewandter Forschung (z. B. bei markergestützter Selektion, bei Vaterschaftstests und Rückverfolgbarkeit bei Lebensmitteln) zur Anwendung.

In Milchrinder Zuchtprogrammen der zurückliegenden Jahre wurden Milchertrag, Milchfett- und Milchproteinprozentage durch die Anwendung quantitativ genetischer Methoden kontinuierlich verbessert. Auf der Basis des von Weller *et al.* (1990)

vorgestellten «Granddaughter Design», wobei in einem Familienmaterial der heterozygote männliche Vorfahre «Grandsire» genannt wird, seine Söhne «Sons» und deren Töchter «Granddaughters», reduzieren sich die Kosten für genomweite QTL Studien beträchtlich. Diese Vorgehensweise zur QTL Kartierung wurde von mehreren internationalen Forschergruppen genutzt (Heyen *et al.* 1999, Zhang *et al.* 1998, Schrooten *et al.* 2000, Thomsen *et al.* 2000). Durch die zentrale Bedeutung der künstlichen Besamung in der Rinderzucht ist der Umfang von Halbgeschwister-Familien aus Elite-Bullen in der Regel sehr groß, und das Kopplungs-Ungleichgewicht zwischen Markern innerhalb einer Halbgeschwister-Familie kann zur QTL-Kartierung genutzt werden. Aber aufgrund von Faktoren wie kleinen QTL, Rekombination zwischen Markern und QTL, und dem Grad von Polymorphismus in Markern, ist die 'Power', einen QTL durch ein Halbgeschwister-Familienmaterial hindurch zu erkennen, jedoch oft sehr begrenzt (Weller *et al.* 1990).

1.1 Einleitende Fragestellung

Im Rahmen des ADR/BMBF- Forschungsprojektes "Genomanalyse Rind" (ADR I) wurden in Deutschen Holstein Rindern genomweit QTL kartiert (Thomsen *et al.* 2000), die ursächlich zur Variation von Milchleistungsmerkmalen beitragen. Alle ermittelten QTL wurden in Abgleichung mit Ergebnissen internationaler Studien in einer Liste zusammengefasst, die im Rahmen des ADR/BMBF- Forschungsprojektes "Genomanalyse Rind" (ADR II) als Grundlage für die Bestätigungsstudie und die Feinkartierung sowie für die Entwicklung von Methoden zur Nutzung in der markergestützten Selektion (MAS) dienen soll. Vorteile der markergestützten Selektion gegenüber den traditionellen Züchtungsmethoden sind generell dann zu erwarten, wenn es sich um Merkmale mit niedriger Heritabilität, geschlechtsgebundener bzw. zeitlich später Ausprägung oder aufwendig zu messende Merkmale handelt (Georges 1999).

Von besonderem Interesse erwies sich ein QTL am centromerischen Ende des Chromosoms *BTA14*, der einen bedeutenden Einfluss auf den Fettgehalt der Milch sowie auf Milchmenge und Zellzahl der Milch ausübt. Dieser QTL war in der internationalen Literatur (Coppieters *et al.* 1998, Ron *et al.* 1998) bereits bestätigt, allerdings zeigte sich in allen Studien, dass sowohl die Genauigkeiten bezüglich der Bestimmung der chromosomalen Lage als auch die der geschätzten QTL-Effekte nicht ausreichten, um solche molekulargenetischen Informationen in Form von Selektionsverfahren, die durch den Einsatz von molekularen Markern gestützt sind, in praktischen Zuchtprogrammen effizient umzusetzen.

Im Laufe der bisherigen internationalen und nationalen Feinkartierungsarbeiten (Coppieters *et al.* 1998, Heyen *et al.* 1999, Riquet *et al.* 1999, Band *et al.* 2000, Looft *et al.* 2001) wurde deutlich, dass das Acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase Gen (*DGATI*), welches an das centromerische Ende von *BTA14* kartiert, ein potentielles Kandidatengen darstellt. Diese Ergebnisse wurden für die Holstein Rasse (Grisart *et al.* 2002) und für Fleckvieh (Winter *et al.* 2002) berichtet. In diesen Rassen kommt es aufgrund einer doppelten Nukleotidmutation (Transition / Transversion) zu einer nicht konservativen Substitution eines Lysins durch ein Alanin (K232A), die einen Haupteffekt auf Milchertrag und Milchzusammensetzung ausübt. Das *DGATI*^K Allel übertrifft in niederländischen Holstein Rindern das *DGATI*^A Allel um +0.34 % in Fett, +0.08 % in Protein, und +10.46 kg in Fett Menge, während Milch- und Proteinmenge reduziert sind (-316 kg, -5.64 kg, entsprechend) (Grisart *et al.* 2002). Vergleichbare Effekte wurden für Deutsche Holstein und Deutsche Fleckvieh berichtet (Thaller *et al.* 2003).

Durch Vergleiche dieser Ergebnisse mit den Ergebnissen des im Rahmen des ADR/BMBF- Forschungsprojektes "Genomanalyse Rind" (ADR I) festgestellten Gesamteffektes des QTL stellt sich jedoch eine Differenz dar (Bennewitz *et al.* 2004). Diese Tatsache deutet darauf hin, dass die gesamte QTL Wirkung am centromerischen Ende des bovinen Chromosoms 14 nicht alleine durch allelische Variation des *DGATI* Gens zu erklären ist und der QTL Effekt nicht alleine auf einer monogenen Mutation beruhen kann.

1.2 Ziele der Arbeit

Das Ziel der geplanten Arbeit ist es, den QTL für Milchleistungsmerkmale im proximalen Bereich von *BTA14* mit Hilfe molekulargenetischer und statistischer Methoden weiter einzugrenzen und für die Selektion nutzbare QTL Varianten zu beschreiben. Für die Feinkartierung sollen zur Erhöhung der Auflösung neben der Deutsche Holstein Population auch Deutsch Angus, sowie Deutsche Fleckvieh Populationen herangezogen werden. Als weiteres Ziel soll die feinkartierte Chromosomenregion systematisch auf weitere mögliche Kandidatengene untersucht und Gensubstitutionseffekte kausaler Genvarianten geschätzt werden.

Der von Grisart *et al.* (2002) und Winter *et al.* (2002) beschriebene QTL auf *BTA14* soll genutzt werden, eine Kollektion internationaler Rinder-DNA, repräsentativ für *Bos taurus* und *Bos indicus* Rinderrassen von 4 Kontinenten (Afrika, Asien, Amerika, Europa) zu charakterisieren.

2 Literaturübersicht

Anhand einer Zusammenstellung ausgewählter Literatur wird ein Überblick über Entwicklung und Methode der Genomanalyse gegeben. Damit wird ebenso der gedankliche Weg nachvollzogen, der zur Erstellung dieser genomanalytischen Arbeit beschritten wurde. Hierbei kann Information über die Struktur und Plastizität des Genoms ebenso wie seine Entwicklung als ein Ausgangspunkt gewertet werden und molekulare Marker als Hilfsmittel und Wegmarkierungen, um in der Komplexität des Genoms eine Orientierung zu gewährleisten. Literatur über positionale Klonierung gibt einen Überblick über die methodische Verfahrensweise der Genomanalyse bis auf molekulare Ebene. Der Abschnitt QTL-Analyse stellt dar, wie Auswertung und Erkenntnisse der Genomanalyse in einen ökonomischen Zusammenhang gebracht werden, ohne den eine sinnvolle Zuchtauslese bei landwirtschaftlichen Nutztieren nicht möglich erscheint. Abschließend soll eine Auswertung von Veröffentlichungen über markergestützte Selektion und markergestützte Introgression Möglichkeiten der Anwendung von Ergebnissen aus der Genomanalyse in der Nutztierzucht aufzeigen.

2.1 Genomstruktur und Genomaufbau

Die Möglichkeit zur Veränderung stellt für Genome eine Möglichkeit zu größerer Anpassung von Individuen und deren Nachkommen in einer sich verändernden Umwelt dar. In einer statischen Umwelt wären Genomveränderungen unnötig, wenn nicht für einen noch höheren Grad von Anpasstheit. Im Umkehrschluss kann die sich ständig ändernde Umwelt der Erdoberfläche im Laufe der planetaren Entwicklung der Erde als Voraussetzung einer biologischen Entwicklung mit immanenter Dynamik interpretiert werden.

2.1.1 Genomische Entwicklungsdynamik und Struktur

Die genomische Entstehungsgeschichte ist durch die Entwicklung molekulargenetischer Techniken in weiten Teilen auf chromosomaler Ebene (Burt *et al.* 2002), auf Gen-Ebene sowie auf molekularer Ebene nachvollziehbar geworden. Die Genomentwicklung vollzog sich multilateral in einer chromosomalen und einer genischen Entwicklungsdynamik (Bush *et al.* 1977). Ebenso charakteristisch scheinen ältere Entwicklungsstufen nicht in niederen Tierarten konserviert zu sein (Pereira 2004) und es kann keine evolutive Linearität festgestellt werden.

Chromosomale Genomentwicklung: Genomische Veränderungen traten im Verlauf der Evolution kontinuierlich auf (Lynch & Conery 2000) und ein Zuwachs in der Komplexität der Genome im Zuge der Entwicklung von Prokaryonten zu mehrzelligen Eukaryonten konnte durch Vergleiche von gesamtgenomischen Sequenzdaten festgestellt werden (Lynch & Conery 2003). Plasmid gebundene Gene in Bakterien sind nicht auf Chromosomen organisiert und legen die Vermutung nahe, dass die Entstehung von Chromosomen im Zellkern Entwicklungsschritte zu komplexeren Lebensformen darstellen. Nach einer Hypothese von Smith & Szathmary (1993) liegt die entscheidende Triebkraft für die Entstehung von Chromosomen in der Garantie, dass durch Genkopplung auch bei zunehmenden Anzahlen von Genen die Weitergabe sämtlicher Gene in den Nachfolgeorganismus sichergestellt werden kann. Durch die Zusammenfassung von Genen in Gengruppen und eine Kopplung in stabile Einheiten eröffnet sich die Möglichkeit des schnellen Umbaus und somit einer höheren Flexibilität des Genoms (White 1978), obwohl Untersuchungen nach einer systematischen Adaptivität chromosomaler Neuordnungen bislang widersprüchlich blieben (Gibson 1984). Die Weitergabe von gekoppelten Gengruppen während der Meiose wurde von Morgan & Cattell (1912) bei Studien von *Drosophila* erkannt. Derartige genetische Kopplung ist eine direkte Folge von physischer Kopplung von zwei oder mehr Loci, innerhalb des gleichen Paares von DNA Molekülen, die einen eigenen Satz von Chromosomen-Homologen innerhalb eines diploiden Genoms darstellen (Silver 1995).

Eine erste Beobachtung über die Existenz von Chromosomen wurde bereits 1871 von W. Flemming erbracht. Boveri und Sutton erkannten 1902 unabhängig von einander, dass Chromosomen paarweise und artspezifisch in konstanten Anzahlen auftreten. Vergleichende Untersuchung von Genomen zwischen den Arten wurde aber ursprünglich aufgrund der enorm großen Variationsbreite zwischen den Karyotypen als unmöglich eingeschätzt. In zurückliegenden Jahren hat sich diese Ansicht jedoch aufgrund der Entdeckung ausgiebiger Konservierung chromosomaler Bereiche zwischen Vertebraten grundlegend geändert (Andersson *et al.* 1996).

Genommutationen, die in heutigen Lebewesen zu numerischen Veränderungen der Chromosomenzahl geführt haben, werden in der Pflanzenzüchtung systematisch genutzt, treten jedoch im Tierreich seltener auf. Experimentell erzeugt, existieren polyploide Mäuselinien (Keighren *et al.* 2003), Fische (Ludwig *et al.* 2001) und Muscheln (He *et al.* 2004). Bei Insekten wurde Polyploidie als Motor der Artenentwicklung beschrieben (Lokki & Saura 1980). Gesamtgenomverdopplung (Ohno 1968, 1970, Eakin & Behringer 2003,

Eichler & Patel 2003, David *et al.* 2003) mit anschließender Selektion bzw. getrennter Evolution der Duplikate wird ebenfalls für Fische und Säugetiere diskutiert und ist für Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae*) nachgewiesen (Casci 2004, Kellis *et al.* 2004). Im Allgemeinen wird Polyploidie in Säugetieren jedoch als unverträglich mit normaler Entwicklung und Funktion des Organismus angesehen. Polyploidie durch spontane Verdopplungen des Säugetiergenoms ereignet sich nach Eakin & Behringer (2003) bei ungefähr 1% der Befruchtungen und wurde auch in höheren Tieren (Gallardo *et al.* 1999) beschrieben. Da Chromosomenzahlen in Organismen größer einer Menge 12 wesentlich häufiger in geraden Anzahlen als ungeraden auftreten (Griffiths *et al.* 2000) kann man dies jedoch als einen grundsätzlichen Hinweis auf einen polyploiden Entwicklungsweg der Genome werten.

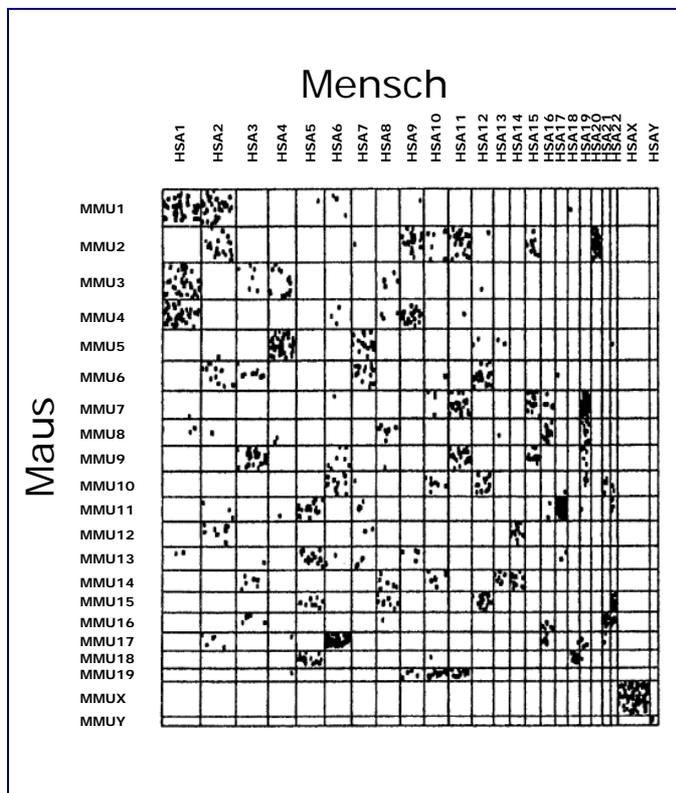


Abbildung 2.1: Anordnung homologer Gene im Oxford Grid zwischen Mensch und Maus. Die horizontale Achse ist proportional zur Länge der 22 humanen Autosome und X und Y unterteilt, die vertikale Achse in gleicher Weise für 19 murine Autosomen sowie X und Y. Jeder Locus, der als homolog zwischen Mensch und Maus bekannt ist wurde im jeweiligen Rechteck eingezeichnet, das seine Position für beide Arten beschreibt (Andersson *et al.* 1996).

Ein weiterer Grund einer Größenzunahme von Genomen während ihrer Entwicklung wird in der Duplikation von DNA Fragmenten infolge von Replikationsfehlern der DNA gesehen. Chromosomenmutationen können auf Fehler während der Meiose zurückgeführt oder durch physikalische und chemische Einflüsse hervorgerufen werden. Veränderungen der Chromosomenzahlen durch Zusammenlagerungs-, Teilungs- und Inversionsereignisse sind sicherlich einer der Gründe der Spezifizierung der Arten (White 1978), neben Umlagerungsereignissen von Teilen innerhalb des Chromosoms (Zouros 1982). Die Rate der chromosomalen Evolution wurde in einen direkten Zusammenhang mit der Artenbildung bei Säugetieren (Bush *et al.* 1977) und höheren Pflanzen (Levin *et al.* 1976)

gebracht. Demzufolge ereignet sich, in Übereinstimmung mit der Theorie von Wright (1931, 1940), anpassungsfähige Evolution und Artenbildung am schnellsten innerhalb solcher Arten, die eine markante Neigung zur Unterarten- und Stammbildung besitzen und in nicht statischer Umwelt leben, wie in diesem Kapitel für die biologische Familie der *Bovidae* beschrieben wird. Durch die Kombination von Kartierungsdaten und Chromosomenfärbungen wurden in den zurückliegenden Jahren komplexe Muster der chromosomalen Evolution in Vertebraten bekannt.

Der Vergleich genetischer Karten unterschiedlicher Säugetierarten lässt vermuten, dass Genome sich durch Umlagerungen genomischer Segmente einschließlich syntenischer Gengruppen (Band *et al.* 2000, Graves & Van de Berg 1998) verändert haben. Ebenso wird der spontanen Duplikation großer chromosomaler Abschnitte eine Hauptrolle bei der Entwicklung eukaryotischer Genome zugesprochen (Simillion *et al.* 2002, Bailey *et al.* 2002, Thomas *et al.* 2003b). Als Bateson *et al.* (1905) zum ersten Mal die Existenz der Genkopplung durch Loci deren Allele nicht unabhängig aufspalteten bemerkten, wurde ihre Bedeutung nicht erkannt (Silver 1995). Durch die neuerliche Verfügbarkeit gesamtgenomischer Sequenzdaten können heute mit zunehmender Genauigkeit die durch Umlagerung entstandenen Bruchstellen zwischen Kopplungsgruppen rekonstruiert werden (Pevzner & Tesler 2003) und ihre Kenntnis ermöglicht teilweise Rekonstruktion ancestraler syntenischer Gruppen in Säugetieren (Mouse Genome Sequencing Consortium 2002), so dass die derzeit zunehmende Datenfülle die theoretische Rekonstruktion alter Genome möglich erscheinen lässt (O'Brian & Stanyon 1999). Funktionale Entwicklung kann in diesem Zusammenhang durch eine neue Zusammenlagerung chromosomaler Segmente nach einer Duplikation oder einem Bruch profitieren (Kozul *et al.* 2004). Ein derartiger Entstehungsweg wird für das Säuger Thyroglobulingen vermutet (Mori *et al.* 1987, Takagi *et al.* 1991). Ebenso ist es möglich, dass eine Umlagerung chromosomaler Segmente zu einer veränderten Expression betroffener Gene und dadurch zu Krankheit führt, wie z.B. beim Burkitt-Lymphom beschrieben (Wright 1997). Hierbei kommt es durch ein Crossing-over Ereignis zu einer Translokation der telomeren Enden zwischen *HSA8* und *HSA14*. Dies verändert das Expressionsmuster des Myc Gens und unterbindet seine normale Funktion der Kontrolle von Zellwachstum und Zellteilung. Bruchstellen im Genom sind jedoch nicht zufällig verteilt und beim Mensch häufiger in kleinen (13-22, Y) als in größeren (1-12, X) Chromosomen festzustellen (Yu *et al.* 1978). Die Rate der chromosomalen Neuordnung hängt in diesem Zusammenhang von der Mutationsrate und der Fixationsrate während der entsprechenden Evolutionsperiode ab (Burt 2002). Da

Rekombination sich bevorzugt zwischen homologen Sequenzabschnitten ereignet, hat die Variation der Frequenz derartiger Abschnitte eine Auswirkung auf die Mutationsraten der Genome. Die vergleichsweise große Stabilität von Vogel-Genomen (Burt *et al.* 1999) wird auf die geringe Frequenz von verstreuten repetitiven Sequenzabschnitten und Pseudogenen im Genom zurückgeführt, die in dieser Klasse weniger als 15% des Genoms ausmachen, gegenüber 50% bei Säugetieren (Burt 2002).

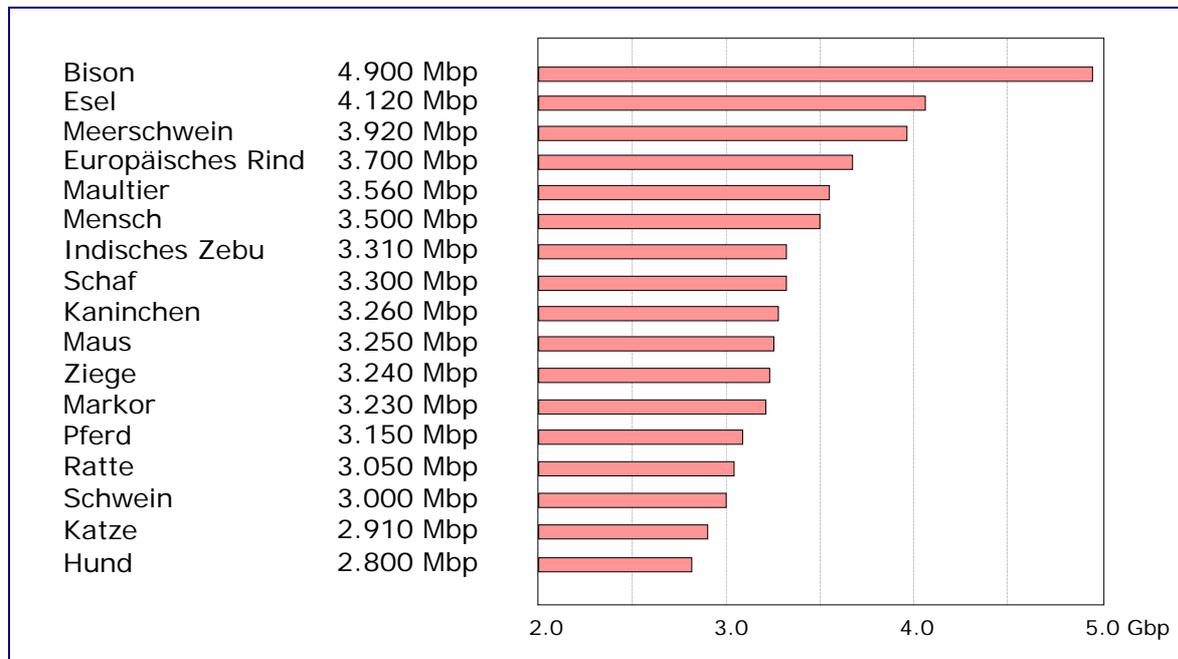


Abbildung 2.2: Genomgrößen im Vergleich: Der haploide Chromosomensatz (CV) ist in Megabasenpaaren bzw. Gigabasenpaaren angegeben (Gregory 2001b). Der C-Wert der Säugergenome entwickelt sich ohne erkennbaren Zusammenhang zur organisatorischen Komplexität der Organismen.

Die physische Größe der Genome verhält sich nicht immer proportional zur Komplexität der Organismen. Extreme Beispiele können vor allem im Pflanzenreich gefunden werden. Dort ist das Weizengenom 200mal größer als das der Modellpflanze Arabidopsis. Im Tierreich sind Unterschiede nicht im gleichen Maße ausgeprägt obwohl markante Unterschiede bestehen. Der DNA Gehalt des haploiden Genoms (C-Wert) ist jedoch für jede lebende Art charakteristisch, repräsentiert aber bei Eukaryonten keine unmittelbare Beziehung zur morphologischen und organischen Komplexität des Organismus, obwohl Bakterien noch solch einen Zusammenhang aufweisen (Lewin 1988). Die Tatsache, dass kein Zusammenhang zwischen Genomgröße und Komplexität sowie vermuteter Anzahl von Genen der untersuchten Organismen besteht (Li und Graur 1991), wird im allgemeinen als C-Wert-Paradoxon bezeichnet (Thomas 1971). Da jedoch bekannt ist, dass die Genomgrößenunterschiede nicht durch eine unterschiedliche Anzahl von

Genen, sondern vor allem durch nicht kodierende DNA verursacht sind, liegt nach Gregory (2001a) kein Paradoxon vor. Deshalb führt er stattdessen den Begriff C-Wert-Rätsel (C-value enigma) ein, da unklar ist, ob von der Genomgröße Funktionen abhängen und/oder welche diese sein könnten.

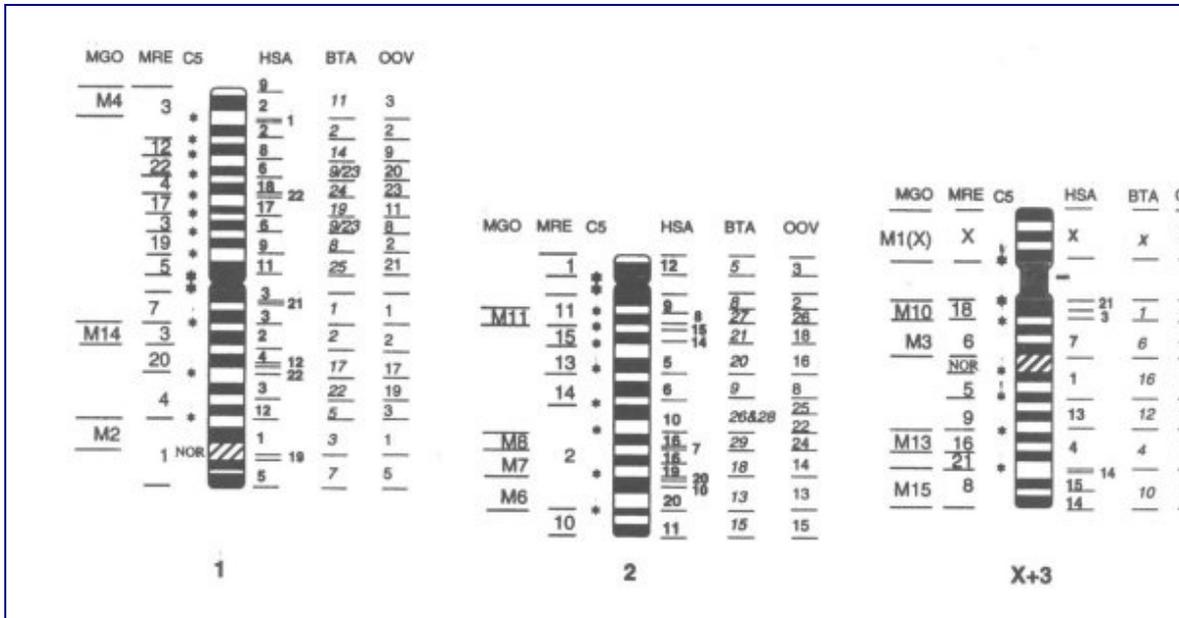


Abbildung 2.3: Ideogramm eines weiblichen indischen Muntjacs. Homologe chromosomale Bereiche wurden durch Hybridisierung von angefärbten chromosomalen Sonden für Mensch (*HSA*), Schaf (*OAR*), Rind (*BTA*), chinesischer Muntjac (*MRE*) und Brauner Mazama (*MGO*) erstellt. Sterne markieren Hybridisierungsbereiche einer centromerischen Sonde von Muntjac und damit Stellen ancestraler Chromosomenfusion (Graves & Van de Berg 1998).

Die haploide Anzahl der Chromosomen in den Lebewesen des Bionoms zeigt eine große Schwankungsbreite und beträgt, z.B. bei der Nematode *Parascaris univalens* 1, bei der Farnart *Ophioglossum reticulatum* aber 720 (Khandelwal 2008). Die geringste Chromosomenanzahl in Säugetieren wurde in indischen Muntjacs (*Muntiac muntiac*) gefunden (Bengtsson 1980, Wurster & Benirschke 1970). Dort besitzt das weibliche Tier 6 und das männliche 7 Chromosomen. Abbildung 2.3 zeigt das Ideogramm eines weiblichen indischen Muntjacs (Graves & Van de Berg 1998). Der chinesische Muntjac (*Muntiac reevesi*), der sich zwar auf der Ebene mitochondrialer DNA unterscheidet (Lan *et al.* 1995) aber nicht phänotypisch verschieden ist, besitzt dagegen einen Chromosomensatz von $2n = 46$ (Bengtsson 1980) und kann dessen ungeachtet mit dem indischen Muntjac lebensfähige Hybriden erzeugen (Wurster & Benirschke 1970, Shi *et al.* 1979).

Auch in der Haustierwerdung sind Chromosomenmutationen von Bedeutung. So beträgt die *Nombre Fondamental* (NF) für Schafe, ebenso wie für andere Mitglieder der Art *Ovis*,

Bos und *Capra* 60, gemeinsam mit der Mehrheit der Mitglieder der Überfamilie *Bovidae* (Wurster & Benirschke 1968, Clutton-Brock 1999). Es bestehen jedoch Ausnahmen, denn die Karyogramme der Art *Ovis* sind uneinheitlich. Vergleichende zytogenetische Studien bei Schafen aber auch bei Rindern und Ziegen haben hohe Niveaus an chromosomalen Polymorphismen vom Typ zentrische Fusion gezeigt (Silveira da Mota & Bicudo da Silva 1989, Burguete *et al.* 1987, Dolf & Hediger 1984, Elminger & Stranzinger 1982, Bruère *et al.* 1976, Gustavsson 1969, Schmitt & Ulbrich 1968, Gustavsson 1966). Es wird allgemein angenommen, dass das Karyogramm von *Capra* das ursprünglichere und phyletisch ältere darstellt, aus dem heraus sich die Karyogramme der übrigen boviden Arten durch chromosomale Translokationen, mit einer stufenweisen Reduktion der Chromosomenzahl einhergehend, entwickelt haben. In dem Maße der Reduktion der Chromosomenzahl steigt das Auftreten metazentrischer Chromosomen, die sich vermutlich durch Translokation aus je zwei akrozentrischen Chromosomen entwickelt haben (Schmitt & Ulbrich 1968). Eine Entwicklungsreihe durch akrozentrische Fusion ist bei Schafen nachzuvollziehen. Nach dieser Theorie ergibt sich durch jeweilige Reduktionsschritte von 2 im Karyotyp die folgende Reihe:

1. Akrozentrische Fusion $2n = 60 \rightarrow 2n = 58$:

Der primitivste *Ovis* Karyotyp ist derjenige, der Urial-Gruppe (*Ovis vignei*) mit $2n = 58$ (Bunch *et al.* 1976). Er ist nach dieser Theorie das Produkt der ersten Stufe der Chromosomenreduktion.

2. Akrozentrische Fusion $2n = 58 \rightarrow 2n = 56$:

Der Argali (*Ovis ammon*) mit $2n = 56$, der in der heutigen Zeit Zentralasien, China und die Mongolei bewohnt, aber früher so weit westwärts wie Südfrankreich vorkam (Gromova 1936; Herre & Kesper 1953) entstand aus den Urialen von Nordiran bis Tadschikistan und Pakistan (Bunch *et al.* 1976).

3. Akrozentrische Fusion $2n = 56 \rightarrow 2n = 54$:

Aus den Argalis wiederum entstanden die orientalischen Mufflons (*Ovis orientalis*) mit $2n = 54$ und Neuwelt-Bighorns (*Ovis canadensis*) mit $2n = 54$ (Bunch *et al.* 1976).

4. Akrozentrische Fusion $2n = 54 \rightarrow 2n = 52$:

Die Weiterentwicklung des Karyotyps der Gattung *Ovis* scheint noch nicht abgeschlossen zu sein. Im sibirischen Schneeschaf (*Ovis nivicola*) ist die Anzahl der Chromosomen auf $2n = 52$ reduziert. In allen Hausschafen, die homozygot für t_1 , t_2 und t_3

zentrische Fusionen sind, ist die Anzahl der Chromosomen ebenfalls auf $2n = 52$ reduziert. Obgleich diese letzteren Fusionen im Vergleich zu *Ovis nivicola* wahrscheinlich rezenten Ursprungs sind, folgen sie doch der Hypothese von Wurster und Benirschke (1968), dass zentrische Fusionen nahezu ausschließlich zur karyotypischen Evolution der Gruppe der *Bovidae* Arten genutzt wurden. Es ist denkbar, dass die Abnahme der $2n$ Chromosomen in der Gattung *Ovis* sich auch weiterhin fortsetzen wird, denn es ist heute experimentell möglich Schaflinien mit nur $2n = 44$ Chromosomen zu erzeugen (Franklin 1997).

Chromosomale Variation und Artenbildung wurde oft im allopatrischen Modell mit geographischen Barrieren in Verbindung gebracht, demzufolge die Bildung neuer Arten auftritt, wenn genetische Veränderungen in geographisch isolierten Populationen akkumulieren (Mayr 1970). In der Literatur finden sich Hinweise auf eine Koinzidenz mit geographischen Barrieren (Mascarello & Hsu 1976), für ein Fehlen geographischer Barrieren (Nadler *et al.* 1971), sowie für das Fehlen chromosomaler Unterschiede trotz geographischer Isolation (Nadler *et al.* 1975). Nach Patton & Sherwood (1983) existiert jedoch kein Zusammenhang von Artenbildung und Veränderung chromosomaler Struktur.

Genomentwicklung auf Genebene: Die Existenz mutagener Veränderungen im Genom wurde bereits recht früh vermutet und zum ersten Mal von Hugo de Vries (1899) beschrieben. Er schlug vor, dass Einheiten, welche er in Anlehnung an Darwin (1868) Pangene nannte, Träger der erblichen Merkmale seien. Durch umfangreiche Veränderungen dieser Gene, die er als Mutationen bezeichnete, vermutete er die Entstehung neuer Arten ohne Zwischenformen. Später formulierten Beadle & Tatum (1941) ein Gen als eine Sequenz in der genomischen DNA, die für ein Protein kodiert (Ein-Gen-Ein-Enzym-Hypothese).

Genmutationen vollziehen sich zufällig, zu jeder Zeit und in jeder Zelle eines Organismus. Da aber nur Mutationen in Stammzellen an die nächste Generation weitergegeben werden, können auch nur diese evolutiv wirksam sein. Punktmutationen sind ein Hauptgrund genetischer Variation und Evolution. Die Punkt-Mutations-Rate in Exons und nicht kodierenden Regionen (Introns, intergenische Bereiche und Pseudogene) wurde generell als gleich groß angesehen. Vergleichende Sequenzanalysen von bedeutungsgleichen Substitutionen bei Mensch und Schimpanse zeigen jedoch eine 30-60% höhere Mutationsrate in Exonen als in nichtkodierender DNA (Subramanian & Kumar 2003). Bei Maus und Mensch finden sich 75-80% der Gene in der GC-reichsten Hälfte des Genoms (Waterstone *et al.* 2002). Da aber kodierende Bereiche sich wesentlich

schneller evolutionär verändern als nichtkodierende, schließen Subramanian & Kumar (2003) auf einen Einfluss des GC-Gehaltes der Sequenz auf die Mutationsrate, denn hier besteht eine signifikante Korrelation. Degenerative Genmutationen, die durch Basenaustausche, Insertionen oder Deletionen verursacht werden können, treten im Genom in einer weitaus größeren Rate als vorteilhafte Mutationen auf (Lynch & Conery 2003).

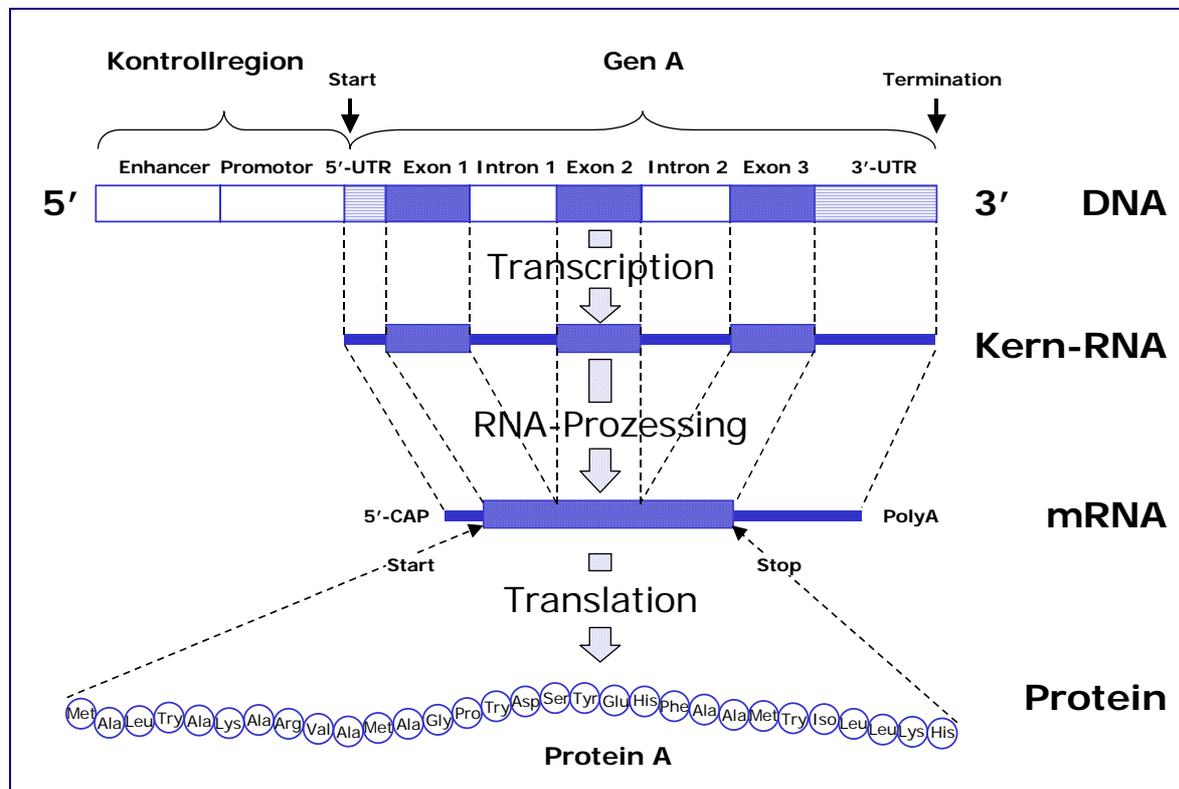


Abbildung 2.4: Strukturschema eines eukaryotischen Gens und seiner Expressionsprodukte (Schwerin 2000).

Haldane (1935) schlug vor, dass die männliche Mutationsrate beim Menschen größer ist als die weibliche, da männliche Keimzellen mehr Zellteilungszyklen pro Generation durchlaufen und dadurch mehr DNA-Replikation erfahren als weibliche. Mit zunehmender Sequenzdatenfülle in heutiger Zeit ist es möglich die Rate (α) der Anzahl Punktmutationen väterlichen Ursprungs gegenüber mütterlichen Ursprungs direkt zu errechnen (Li *et al.* 2002) und damit indirekte Näherungen zu ersetzen. Durch unterschiedliche Generationslängen zwischen den Arten und unterschiedlich große Geschlechtsdifferenzen in der Anzahl der Keimzellzyklen zwischen den Arten (Makova & Li 2002) muss auch α sich zwischen den Arten unterscheiden und auf diese Weise zu unterschiedlichen Evolutionsraten führen. Neue Untersuchungen unterstützen die Hypothese einer durch erhöhte männliche Mutationsrate forcierten Evolution aufgrund von DNA-Replikationsfehlern (Shimmin *et al.* 1993, Chang & Li 1995, Ellegren & Fridolfsson 1997,

Pecon Slattery & O'Brien 1998, Carmichael *et al.* 2000, Lawson & Hewitt 2002). Zusätzlich unterstützt wird diese Hypothese durch eine höhere Methylierungsrate in Sperma-DNA als in Oocyten-DNA (Monk 1995), die Mutationen sowie Rekombinationen im besonderen Maße zuträglich ist (Li *et al.* 2002).

Bei proteinkodierenden Genen (Ein-Gen-Ein-Enzym-Hypothese) werden durch Insertionen und Deletionen das Leseraster, die Translation verändert, sofern nicht ein DNA-Fragment (Aminosäure) inseriert bzw. deletiert wird, das 3 oder ein ganzzahliges Vielfaches von 3 Basenpaaren enthält (Leserasterverschiebung, frame-shift-Mutation, Rastermutation). Genmutationen können neutral sein, etwa wenn ein Nukleotid im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes verändert wird (stille Mutation) oder eine Aminosäure durch eine funktionell ähnliche ersetzt wird. Punktmutationen können auch durch echte Rückmutationen (Wiederherstellung des ursprünglich Zustands im betreffenden Genort) wieder rückgängig gemacht werden (genotypisch und phänotypisch). Ihre phänotypische Wirkung kann aber auch durch kompensierende Mutationen (Mutationen an einem anderen Ort im Genom), wie Restaurierung und Suppression, unterdrückt werden. Fehlsinn-Mutationen (missense mutation), die einen Aminosäureaustausch bewirken, können die Funktion bzw. Aktivität des Genprodukts zerstören (Null-Mutation), abschwächen (hypomorphe Mutation) oder verstärken (hypermorphe Mutation). Diese Veränderungen können z.B. auch durch Mutationen in regulativen Genabschnitten, welche die Expression (Genexpression) beeinflussen, hervorgerufen werden.

Die Theorie der Genbalance (Bridges 1925) stellt eine Betrachtungsweise der Evolution der Genome dar. Sie beschreibt jeden Organismus als ein ausbalanciertes System von Genen und Genwechselwirkungen bzw. Expressionsraten. Jede Abweichung von dieser Genbalance führt zu Ausfallerscheinungen wie z.B. Down Syndrom (Trisomie 21), Patau Syndrom (Trisomie 13), Edwards Syndrom (Trisomie 18), Klinefelter Syndrom (XXY), Turner Syndrom (XO). Die Menge des produzierten Transkripts verhält sich normaler Weise proportional zur Anzahl der Genkopien einer Zelle. Bei autosomalen Aneuploidien führt dies jedoch zu einer genetischen Imbalance zwischen der Menge Transkript des betroffenen Chromosoms und anderen Chromosomen und infolge dessen zu biochemischen Problemen in der Zelle. Geschlechtschromosomen zeigen in der Regel Anpassungseffekte, um genetische Imbalancen zu minimieren, die wahrscheinlich auf dem Hintergrund der Homo(XX)- und Hetero(XY)Geschlechtlichkeit beruhen (Baker & Belote 1983).

Hintergrund der Genbalance-Theorie ist auch die Tatsache, dass jedes Genom eines jeden Organismus das Ergebnis einer durch die Umwelt stattfindenden Selektion verkörpert. Jeder Organismus wird mit seinem Genom in eine konkrete Umwelt hinein geboren, bietet also der Umwelt seine Gene zur Auslese an. Erweist sich das Genom als umweltstabil, kann es auch entsprechend reproduziert werden. Ist das Genom labil, weil abnorme Chromosomensätze oder abnorme Chromosomenarchitekturen aufgetreten sind oder auch Veränderung der Gendosis durch Genduplikationen und Aneuploidien sich ereignet haben, wird es von der Umwelt nur dann akzeptiert, wenn die Veränderung vorteilhaft ist, d.h. zu einer größeren Reproduktionsrate oder einer größeren Fitness führt.

2.1.2 Genfamilien und Pseudogene

Multigene Familien: Gene können als Einzelcopy-Gene oder als Mitglieder von Genfamilien, die aus Einzelgenen durch Genverdopplung entstanden sind, im Genom vorkommen. Die Komplexität der Säugergenome wird auch auf die Verdopplung einzelner Gene (Bailey *et al.* 2002) im Laufe der Entstehungsgeschichte zurückgeführt. Phylogenetische Untersuchungen zeigen, dass heute existierende Multigenfamilien derartige Genduplikate beherbergen, die vor der Existenz von Wirbeltieren, aber auch solche die während der frühen Wirbeltierentstehung und solche die innerhalb Säugerlinien vor der Verbreitung von Plazentatieren entstanden, sowie auch solche, die sich erst nach der Verbreitung von Plazentaarten bildeten (Gu *et al.* 2002). Funktionale Genverdopplungen scheinen nicht zufällig verteilt zu sein (Bailey *et al.* 2002). Gene, die mit Immunität und Krankheitsabwehr (Defensine, Interferone, Serinproteasen, Cytokine), mit Zellmembran-oberflächen Interaktionen (Galectine, HLA, Lipocaline, carcinoembryonische Antigene), chemischer Entgiftung (Cytochrom P450) und Wachstum und Entwicklung (Somatotropine, chorionische Gonadotropine, schwangerschaftsspezifische Glycoproteine) assoziiert sind wurden jedoch in besonderem Maße angehäuft. Dabei ist die Möglichkeit additiver Genwirkung nicht auszuschließen, da es zur Segregation unterschiedlicher Anzahlen von Genduplikaten in Populationen kommen kann (Higgs *et al.* 1990).

Klassische Genfamilien: Mitglieder klassischer Genfamilien zeigen einen hohen Grad an Sequenzhomologie über den kodierenden Bereich und oft über das gesamte Gen. Beispiele schließen die einzelnen rRNA Genfamilien und die einzelnen Histon Genfamilien ein.

Gen Superfamilien: Im Gegensatz dazu zeigen Gene aus Superfamilien lediglich schwache Übereinstimmung, kodieren aber für Produkte mit ähnlichen funktionellen Eigenschaften. Beispiele stellen die Immunglobulin Superfamilie (*Ig*, *HLA*, *TCR*, T4 und T8 Gene) dar und unter zahlreichen weiteren auch die *Cytochrom P-450 Oxygenase* Superfamilie (Nelson & Strobel 1987) sowie die *Ly6*-Gene Superfamilie (Stroncek *et al.* 2004).

Geclusterte Genfamilien: Diese Familien beinhalten ein oder mehrere Gencluster, die an spezifischen subchromosomalen Positionen zu finden sind. Ein Beispiel stellt die Hämoglobin Genfamilie dar, wo der alpha-globin Gencluster auf *HSA16p* und der beta-globin Gencluster auf *HSA11p* liegt. Weitere Gencluster verkörpern die Milchkeisene Gene *HSA4/BTA6* (Grosclaude *et al.* 1979) sowie die *CYP2* Gene auf *HSA19* (Hoffmann *et al.* 2001). Innerhalb von Genclustern können Stellungseffekte von Genen entscheidend deren Expressionsraten beeinflussen (Hurst *et al.* 2004).

Verstreute Genfamilien: Mitglieder von verstreuten Genfamilien sind über das gesamte Genom verteilt und es existiert keine offensichtliche physische Beziehung zwischen den Familienmitgliedern.

Pseudogene: Pseudogene stellen Genartefakte dar, die kein funktionales Protein produzieren können. Sie werden als 'molekulare Fossilien' angesehen, da sie sich als wertvolle Quellen für evolutionäre und komparative genomische Untersuchungen qualifiziert haben. Ebenso führen Mechanismen, durch die Genfamilien entstehen zur Formierung von nichtfunktionalen Kopien von Genen. Derartige Pseudogene sind Sequenzen genomischer DNA mit solch hoher Übereinstimmung zu normalen Genen, dass sie als nicht funktionelle Kopien oder 'nahe Verwandte' derer angesehen werden können. Es existieren zwei allgemein akzeptierte Vorstellungen über Entstehungsprozesse von Pseudogenen:

Duplikation: Veränderungen der DNA Sequenz eines Gens wie Mutationen, Insertionen, Deletionen oder Veränderung des Leserahmens können während der Zellteilung und Genduplikation durch fehlerhafte Anlagerung entstehen. Derartige Veränderungen führen auf der Ebene der Transkription und/oder Translation zu einem Verlust der Genfunktion, da die Sequenz nicht mehr zur Produktion eines funktionalen Proteins führt. Genkopien, die auf diese Weise verändert sind werden 'nicht prozessiert' oder 'duplizierte' Pseudogene genannt (Lewis 2004).

Retrotransposition: Retrotransposition ist die reverse Transkription eines mRNA Transkripts mit anschließender Reintegration einer cDNA in das Genom. Diese Genkopien werden als prozessierte Pseudogene bezeichnet. Derartige Pseudogene können, da sie nicht unter Selektionsdruck stehen, im Laufe der Evolution zusätzliche zufällige Veränderungen akkumulieren und werden als Zeugen ehemals stark exprimierter Gene angesehen (Lewis 2004). Diese Pseudogenvariante kann auch als Nebenprodukt der LINE-1 Retrotransposition auftreten (Esnault *et al.* 2000). Retrotransposons sind gewöhnliche Bestandteile aller eukaryontischen Genome, denen Initiation zur Weiterentwicklung des Genoms zugeschrieben wird. LINE-1 Elemente stellen eine Klasse derartiger Sequenzen dar, die möglicherweise auch bei Doppelstrangbruch-Reparatur eine Rolle spielen (Eikbush 2002).

Tabelle 2.1.: Pseudogene und Genfragmente im Vergleich (Boichard *et al.* 1998).

	Exprimiert	Typ Genfamilie	Art der Sequenz	Art und Weise der Entstehung
Nicht prozessierte (konventionelle) Pseudogene	Nein	geclustert	Exons und Introns	Genduplikation
Exprimierte, aber nicht prozessierte Pseudogene ¹	Ja	geclustert	Exons und Introns	Genduplikation
Prozessierte Pseudogene	Nein	eingestreut	Exons	cDNA Integration
Exprimierte und prozessierte Pseudogene	Ja	eingestreut	Exons	cDNA Integration ²
Verstümmelte Gene und Genfragmente	Nein	geclustert	Exons und Introns	Ungleiches crossing over oder ungleicher sister chromatid Austausch (SCE)

¹ Diese Pseudogene stellen ein Zwischenstadium zwischen Genduplikation und Funktionsverlust und Expressionsfähigkeit dar.

² Diese Pseudogene resultieren aus zufälliger Integration in der Nähe eines Promotors.

Ein wichtiger Punkt bei der Kommentierung von Säugergenomen ist die Differenzierung zwischen proteinkodierenden Genen und Pseudogenen. Tabelle 2.1 gibt einen Überblick über mögliche Entstehungsvarianten von Pseudogenen nach Boichard *et al.* (1998). Vergleichende Analyse zwischen humanem und murinem Genom zeigt, dass 70% der Pseudogene auf retrotranspositionalen Ursprung zurückgehen (prozessiert) und 30% durch fragmentarische Duplikation entstanden (nicht prozessiert) sind. Obwohl die

Verbreitung beider Pseudogenarten mit chromosomaler Größe korreliert ist, scheinen nicht prozessierte Pseudogene in Regionen mit hoher Gendichte gehäuft vorzukommen. Vom humanen Genom wird vermutet, dass die Anzahl Pseudogene die Menge an kodierenden Genen übersteigt, wie auch Abbildung 2.5 verdeutlicht (Torrents *et al.* 2003).

Die Mehrzahl bakterieller Genome besitzt nur wenige Pseudogene (Lawrence *et al.* 2001) und bei der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*) wurden bislang ca. 100 nachgewiesen (Harrison *et al.* 2003). Auch das Vogel-Genom ist bekannt für seinen geringen Anteil (15% des Genoms) an repetitiven Sequenzen und Pseudogenen (Burt *et al.* 2002).

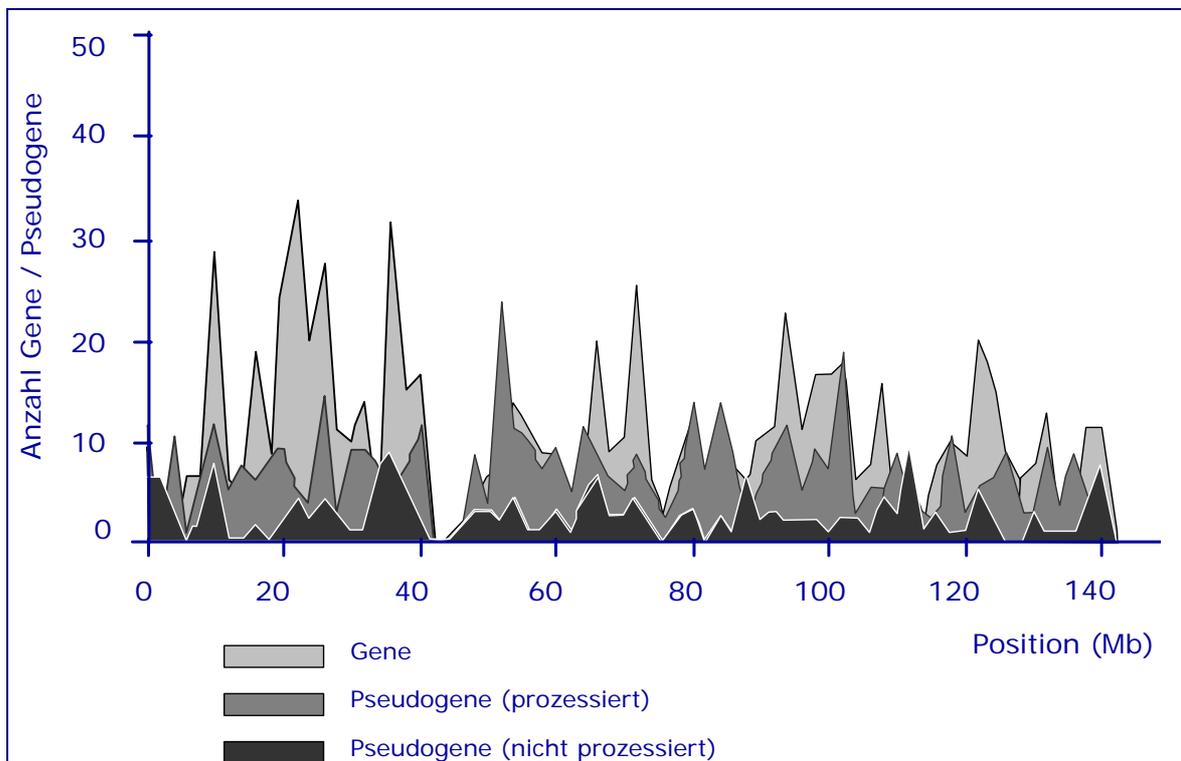


Abbildung 2.5: Darstellung der Gen/Pseudogenverteilung auf Chromosom 8 des Menschen (*HSA8*). Insgesamt wurden auf Chromosom *HSA8* 921 funktionelle Gene in einer durchschnittlichen Dichte von 6,4 Genen pro Mb und ebenso 872 Pseudogene in einer durchschnittlichen Dichte von 6,1 Genen pro Mb lokalisiert. Von Pseudogenen waren 479 prozessiert und 175 nicht prozessiert (nach Torrents *et al.* 2003, verändert).

2.1.3 Molekulare Marker

Molekulare Marker eignen sich zu genetischer Kartierung (Dib *et al.* 1996, Dietrich *et al.* 1996) und Verwandtschaftsanalysen von familiären Strukturen (Queller *et al.* 1993, Schlötterer & Pemberton 1998) bis hin zu Verwandtschaftsanalysen zwischen Tierstämmen (Goldstein *et al.* 1995, Smith *et al.* 1997). Die Anwendungen liegen sowohl im Bereich der reinen Forschung als auch im Bereich angewandter Fragestellungen wie

Artenschutz, Kriminalistik, Verhaltensforschung, Tier- und Pflanzenzüchtung (Goldstein & Schlötterer 1999).

Traditionelle Klassifizierung definiert Typ I Marker als polymorphe Gene und Typ II Marker als hochpolymorphe, nicht kodierende DNA-Abschnitte. DNA-Sequenzierung ermöglicht es, Polymorphie bis auf Nukleotidebene zu definieren, sodass auch Einzel-Nukleotid-Austausche (SNP) nutzbare Marker darstellen. Vorteile und Anwendungsmöglichkeiten molekularer Marker in der Tierzucht ergeben sich durch die Möglichkeit der Erkennung von Genotypen vor der Zuchtbenutzung und der Leistungsprüfung durch Kopplungsanalysen von Marker und Selektionsmerkmal.

2.1.3.1 Mikrosatelliten

Repetitive DNA Sequenzen im Genom können in isoliert verstreute repetitive Sequenzen (SINE) oder tandem-wiederholte Sequenzen (LINE) differenziert werden. Mikrosatelliten oder «simple sequence repeats» (SSR) oder auch «short tandem repeats» (STR) stellen derartige Tandemwiederholungen von 1 bis 6 Basenpaarmotiven dar (Tautz & Schlötterer 1994), die in allen prokaryontischen und eukaryontischen Genomen auftreten. Sie kommen in kodierenden und nicht kodierenden genomischen Bereichen vor und sind gewöhnlich durch einen hohen Grad an Längenpolymorphie gekennzeichnet (Zane *et al.* 2002). Das humane Genom beherbergt mindestens 50000 Mikrosatelliten Loci (Halliburton 2004). Die Ursache dieser Art von Polymorphismus ist noch immer ungeklärt und wird in der Literatur als durch «slippage events» während der DNA Replikation verursacht beschrieben (Tautz *et al.* 1986, Schlötterer & Tautz 1992), vorzugsweise in solchen Sequenzregionen, wo DNA-Nadelstrukturen ausgebildet werden können. Dabei scheint die Veränderung eines Mikrosatelliten in der Mehrzahl der Fälle durch Abnahme oder Zunahme einzelner Wiederholungseinheiten zu erfolgen (Ellegren *et al.* 1997) obwohl auch darüber hinaus weitere Veränderungen möglich sind (Amos *et al.* 1996, Primmer *et al.* 1996). Derartige Längenvariation stellt eine Quelle von Polymorphismen zwischen engverwandten Individuen dar und wird aus diesem Grund in der Tierzucht gerne zu evolutionsgenetischen- und Diversitätsstudien, sowie zur Charakterisierung von Rassen und Verwandtschaftsstrukturen genutzt (MacHugh *et al.* 1994, 1997, 1999, Moazami-Goudarzi *et al.* 1997, Arranz *et al.* 2001, Beja-Pereira *et al.* 2003, Wiener *et al.* 2004, Baumung *et al.* 2006). Mikrosatellitensequenzen können durch PCR und mit Hilfe flankierender Primer amplifiziert und DNA-Längenpolymorphismen auf Agarose- bzw. Polyacrylamidgelen dargestellt werden (Litt & Luty 1989, Weber & May 1989).

Beim Schwein wird die Anzahl der Mikrosatelliten-VNTR, bei einer Genomgröße von ~ 3.000 Mb (Rohrer *et al.* 2004), auf 65.000-100.000 geschätzt (Wintero *et al.* 1992). Abhängig von der Anzahl der nutzbaren Mikrosatelliten können bei dieser Spezies alleine mit diesen Markern dichte Kopplungskarten erstellt werden.

2.1.3.2 Restriktions Fragmentlängen Polymorphismen (RFLP)

Die erste Generation von DNA-Markern waren Restriktions Fragmentlängen Polymorphismen (RFLP). Grodzicker *et al.* konnten 1974 zeigen, dass Restriktionsfragment Bandenmuster genutzt werden können, um genetische Unterschiede darzustellen. Jedoch mussten zu dieser Zeit Typisierungen über Southern Blots mit radioaktiv markierten Proben dargestellt werden. Dessen ungeachtet wurde die erste humane genetische Karte des Menschen auf diese Weise konstruiert (Botstein *et al.* 1980).

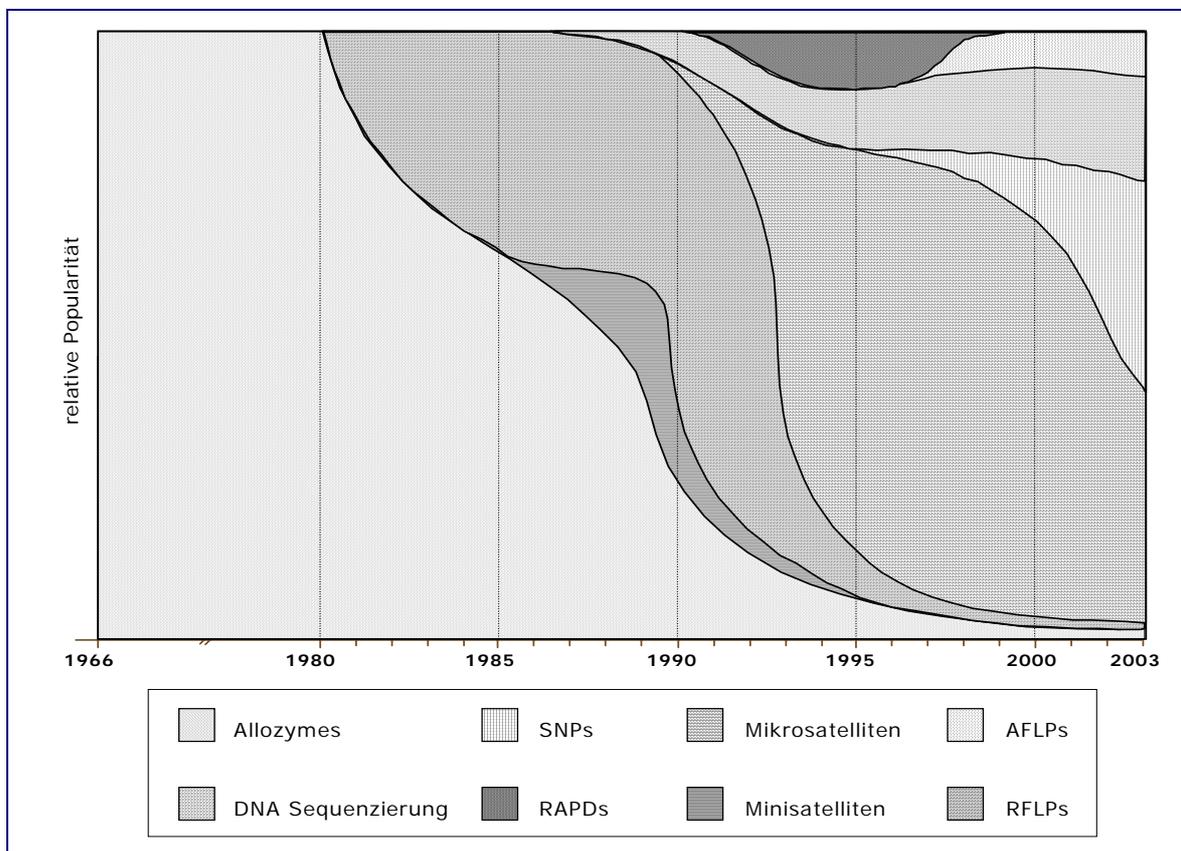


Abbildung 2.6: Darstellung der im Zeitablauf sich ändernden Anwendungshäufigkeit unterschiedlicher molekularer Marker, gemessen an der Frequenz ihrer Publikationen. Die horizontale Achse repräsentiert die Zeit. An jedem Zeitpunkt korrespondiert die vertikale Achse mit der gesamten Anwendung molekularer Marker. Wenn mehr als ein molekularer Marker an einem gegebenen Zeitpunkt verwendet wurde, ist sein relativer Anteil an Wichtigkeit auf der vertikalen Achse aufgetragen (nach Schlötterer 2004, verändert).

Der Vorteil der RFLP-Technik liegt heute in der vereinfachten Anwendung durch Auswahl der möglichen Restriktionsenzyme per Datenbank und Sequenzabgleich (z.B.

REBASE, URL: 6), dem Mikrotiterplattenformat der Verdauung der PCR-Produkte und der Typisierung durch Auftrennung auf Agarosegelen, ebenfalls im Mikrotiterraster. Die Informativität von RFLP liegt in der Kodominanz beider Allele und in dem Erkennen von Polymorphie an definierten Loci. Wird kodierende Sequenz auf diese Weise untersucht, können anschließend Gene kartiert werden. Durch RFLP-Kartierung und molekulare Klonierung konnten spezieübergreifende komparative Karten erstellt werden und in der Genomanalyse der wichtigsten Nutzpflanzen stellen sie die Grundlage der genetischen Kartierung dar (Kowalski *et al.* 1994, Van Deynze *et al.* 1998, Brubaker *et al.* 1999, Livingstone *et al.* 1999).

Ein grundsätzlicher Nachteil dieser Technik liegt jedoch in ihrer begrenzten Informativität verglichen mit z.B. Mikrosatellitenmarkern. RFLP besitzen lediglich zwei Allele: Die Enzym-Erkennungsstelle ist vorhanden oder nicht; die maximale Heterozygotie beträgt 0.5. Vor allem zwischen verwandten Individuen kann dieser Nachteil wesentlich werden. So können Familienmaterialien eng gezüchteter Linien wie bei Holstein Rindern oder innerhalb der bekannten Schweinerassen, oft nur mit erheblichem Sequenzieraufwand über PCR-RFLP typisiert und charakterisiert werden. Durch die neuerliche Sequenzierung kompletter Genome sowie durch die Verfügbarkeit in großer Anzahl, gewinnen jedoch Einzel-Nukleotid-Austausche (SNP) wieder an Bedeutung (Eck *et al.* 2009, Allen *et al.* 2010).

2.1.3.3 Single Nucleotide Polymorphism (SNP)

Im menschlichen Genom wurden bislang 1,42 Mill. SNP gefunden (Sachidanandam *et al.* 2001), d.h. 1 SNP pro 500-1000 bp (Lander *et al.* 2001, Daly & Day 2001). Durch die Sequenzierung kompletter Genome ergeben sich neue Vergleichsmöglichkeiten zwischen Spezies. Der Abgleich gesamtgenomischer Sequenz zeigte, dass Mäuse (Waterstone *et al.* 2002) und Ratten (Gibbs *et al.* 2004) eine annähernd doppelt so hohe Nukleotidsubstitutionsrate wie der Mensch (Lander *et al.* 2001) besitzen.

Es existieren öffentliche Datenbanken humaner SNP (URL 1), die aus Ergebnissen genomweiter Screens zusammengestellt wurden, sowie boviner *in silico* SNP (URL 22), die eine Ableitung aus Alignments veröffentlichter boviner EST und mRNA Sequenzen darstellen. Aufgrund von Substitutions- (Transitionen, Transversionen), Deletions- und Insertionsereignissen, erzeugen SNP-Polymorphismen die Möglichkeit zur Differenzierung an einzelnen Nukleotidpositionen und sind als bi-allelische Marker charakterisiert. Mit nur zwei Allelen (in seltenen Fällen bis drei Allelen), sind SNP Marker in der Regel weniger

informativ als Mikrosatelliten Marker. Genetische Karten für Kopplungsstudien auf der Basis von SNP benötigen deshalb wenigstens die dreifache Menge an Markern verglichen mit Mikrosatelliten Karten bei gleicher Auflösung (Kruglyak 1999). Die zurzeit rapide zunehmende Verfügbarkeit gesamtgenomischer Sequenzen eröffnet jedoch eine intensive Nutzungsmöglichkeit von SNP. Dies geht einher mit Neuentwicklungen wie z.B. Microarrays, die stark erhöhten Durchsatz ermöglichen, so dass die geringere Informativität des einzelnen SNP durch die Datenmenge mehr als ausgeglichen werden kann (Butcher *et al.* 2005, Duijvesteijn *et al.* 2010, Verbyla *et al.* 2010).

Assoziationsstudien zwischen QTL und Kandidatengen wurden in den vergangenen Jahren vorwiegend für einzelne Allele durchgeführt. SNP befinden sich aber häufig in einem Kopplungsungleichgewicht und sind deshalb aus statistischer Sicht nicht unabhängig voneinander (Belmont & Gibbs 2004). Bei der Erforschung quantitativer Merkmale, die heute im Mittelpunkt vieler Untersuchungen stehen, ist es jedoch wahrscheinlich, dass nicht nur ein einzelner SNP eine deutliche Veränderung der Eigenschaft bewirkt, sondern dass mehrere SNP in verschiedenen Genen und in Wechselwirkung mit der Umwelt die Ausprägung der Eigenschaft bewirken und dies im Besonderen für Merkmale mit niedrigen Heritabilitäten. Der Einfluss des einzelnen SNP ist daher oft quantitativ gering und wird erst in Wechselwirkung mit bestimmten anderen SNP und spezifischen Umweltbedingungen deutlich. Davon ausgehend scheint die Untersuchung von spezifischen Kombinationen von Polymorphismen über größere chromosomale Entfernungen in Form von SNP-Haplotypen eine attraktive Nutzungsmöglichkeit genomischer Variation in der Tierzucht darzustellen (Hayes *et al.* 2007, Marques *et al.* 2008).

2.1.3.4 Expressed Sequence Tag (EST)

EST sind kurze, 200 - 500 bp große, im Genom einmalig vorkommende DNA Sequenzen, deren genomische Position bekannt ist. EST sind STS-Marker, die aus cDNA abgeleitet sind. Vor der Zeit von gesamtgenomischer Sequenz wurde durch die Produktion von EST Markern genfragmentarische Sequenz generiert. Diese ermöglichte, durch differentielle Beprobung gewebespezifische Expressionsmuster zu erstellen.

Ausgehend von cDNA Sequenz kann genomische Sequenzierung vorgenommen werden, die je nach Sequenzierrichtung unterschiedliche Arten von EST Fragmenten generiert. Sequenzierungen der 'upstream' Region führen zu 5' EST, die in der Regel eine proteinkodierende Genregion darstellen. Diese Regionen neigen dazu innerhalb Spezies

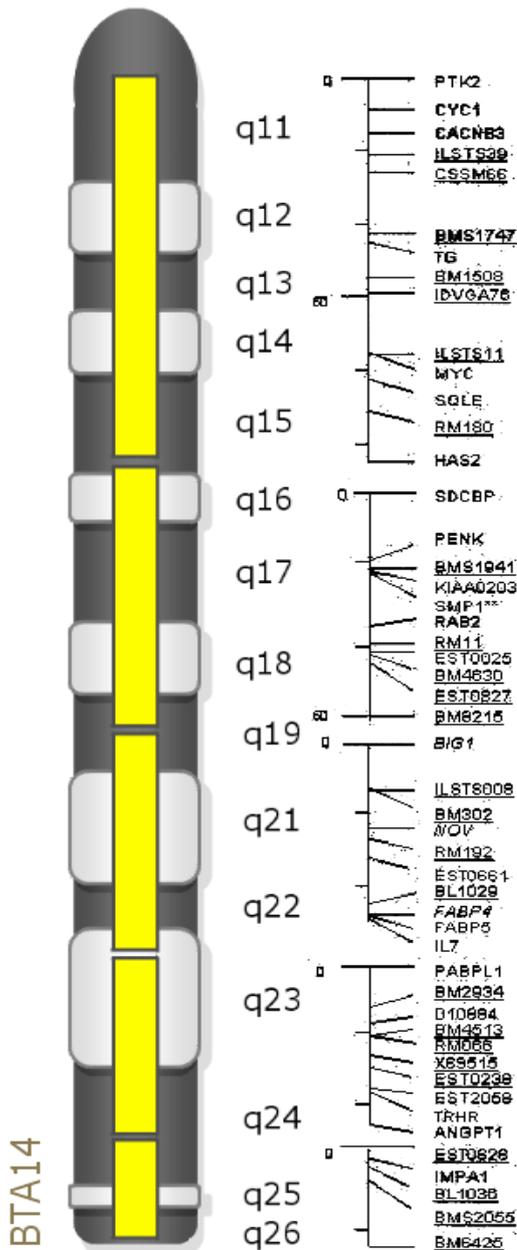


Abbildung 2.7: BTA14 mit cytogenetischem Bandenmuster und superpositionierten homologen humanen Kopplungsgruppen des invertierten q-Arms von Chromosom HSA8. Kopositioniert ist die RH-Karte von BTA14, die homolog zu humanen Kopplungsgruppen aufgebaut ist (Band *et al.* 2000, Everts-van der-Wind *et al.* 2004).

konserviert zu sein und verändern sich nicht sehr innerhalb Genfamilien. Sequenzierung der 'downstream' Region von cDNA-Molekülen generiert 3' EST. EST aus dem 3'-Ende eines Transkripts beinhalten in der Regel die nicht translatierte Sequenzregion (UTR) und können Variation zeigen.

Neben SNP stützt sich die aussagekräftigste Kartierungstechnik auf Marker, die kurze wieder erkennbare und einmalige Sequenzfragmente darstellen (STS). Aufgrund ihrer Einzigartigkeit stellen EST eine häufig genutzte STS Variante dar und liefern darüber hinaus Informationen über exprimierte Gene (Everts-van der Wind *et al.* 2004).

2.1.4 Physische Kartierung

Physische Karten zeigen die wahre Position von Genen auf dem Chromosom. Die Maßeinheit ist das Basenpaar (bp) oder die cytogenetische Bandenregion auf dem jeweiligen Chromosomenarm.

Die physikalische Kartierung dient der Positionierung eines Genlocus auf dem Chromosom und

gibt die Entfernung zu anderen Genen auf demselben Chromosom in absoluten Distanzen an. Die genaueste Methode der physischen Kartierung ist die DNA-Sequenzierung, mit der die Abstände zwischen Genen auf Chromosomen in Basenpaaren definiert werden können.

Weitere Methoden zur Erstellung einer physischen Karte sind z.B. Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) und Radiation-Hybrid-Kartierung (RH-mapping).

Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung: Die zytogenetische Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (Solinas-Toldo *et al.* 1993) bedient sich der Darstellung von DNA-Sonden von 500 bp bis mehreren kb, auf Metaphasen-Chromosomen. Die Zellen werden in der Metaphase auf einem Objektträger fixiert und denaturiert. Die doppelsträngige DNA wird dadurch in Einzelstrang DNA überführt. Die DNA-Sonde, mit der die Hybridisierung erfolgt, ist durch den Einbau modifizierter Nukleotide markiert. Danach erfolgt eine Auswaschung der überschüssigen Sondenmoleküle und Inkubation in einer Lösung, die ein fluoreszenzmarkiertes Affinitätsmolekül enthält. Dieses Molekül bindet dabei an das Reporter-molekül der markierten Sonde. Positive Signale an Metaphasen-Chromosomen können als fluoreszierende Signale erkannt werden. Sie entsprechen der Sonde, die an beide Schwesterchromatiden gebunden hat.

Sequenzierung: Durch DNA-Sequenzierung werden einzelne Nukleotide dargestellt und somit verkörpert diese Technik die bestauflöseste physische Kartierungsweise in der QTL-Analyse. Zur Entschlüsselung kausaler Mutationen und jeglicher Sequenzvariation verkörpert sie heute die Technik der Wahl.

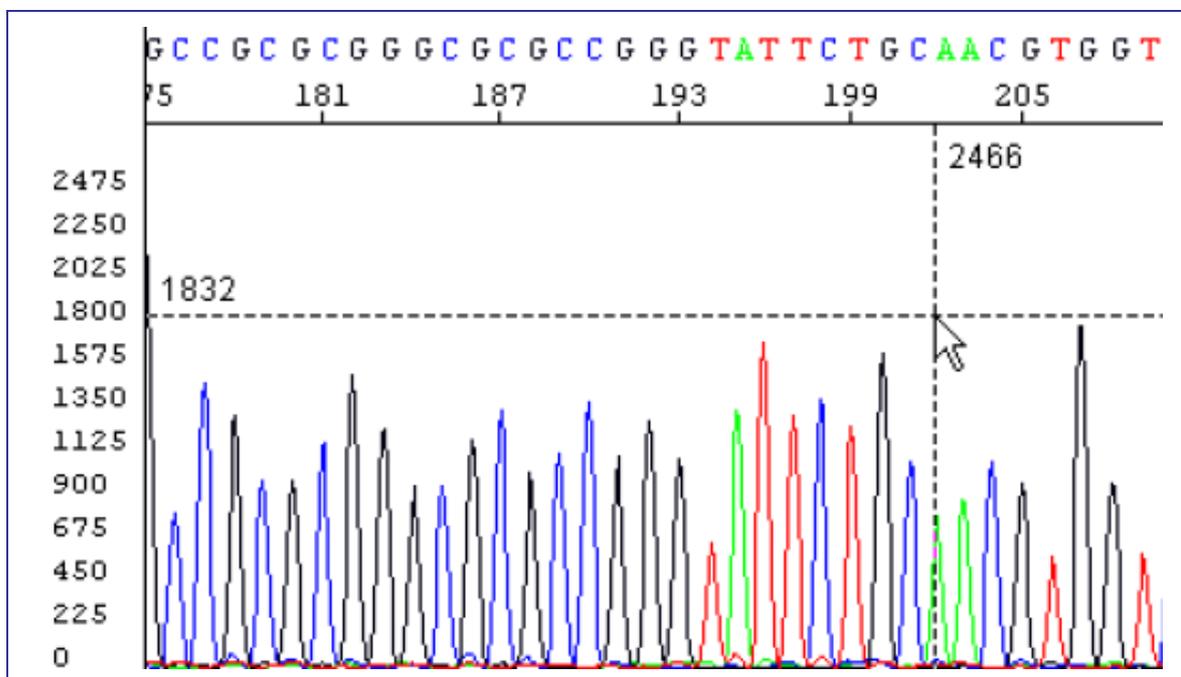


Abbildung 2.8: Signale unterschiedlicher Signalstärken einer Gelelektrophorese basierten Sequenzierung (ABI377), die über Farbcodierungen Nukleotiden zugeordnet werden können. Identifizierbar sind Nukleotide zwischen Position 175 und 209 dieser Sequenzierung. Mit dem Fadenkreuz werden vertikale Signalintensität (1832) und horizontale Position (2466) des Sequenzierlaufes gekennzeichnet.

Radiation Hybrid Kartierung: Die Radiation Hybrid (RH) Kartierung (Cox *et al.* 1990) stellt eine Methode dar, bei der durch Bestrahlung von z.B. humanen oder bovinen Zellen mit Röntgen- bzw. γ -Strahlung das zu kartierende Genom fragmentiert wird. Die Fragmentgröße hängt dabei von der Strahlendosis ab und bestimmt die Auflösungsintensität des RH-Panels. Zurzeit sind drei bovine RH-Panel international verfügbar: Der Womack-5000 rad Panel mit 90 RH-Klonen (Womack *et al.* 1997), der Womack-12000 rad Panel mit 180 Klonen (Rexroad *et al.* 2000) und der TM112-3000 rad Panel mit 94 RH-Klonen (Williams *et al.* 2002). Die bestrahlten Zellen werden anschließend mit Hamsterzellen fusioniert. Die neuentstandenen Hybridzellen tragen neben dem Wirtsgenom Fragmente des zu untersuchenden Genoms. RH-Kartierung basiert auf der Überlegung, dass auf einem Chromosom nahe zusammen liegende Marker mit größerer Wahrscheinlichkeit entweder in einer Zelllinie anzutreffen oder nicht vorhanden sein werden, als Marker die weiter voneinander entfernt liegen. Mit Hilfe einer Multi-Point Analyse mit Likelihood Ratios von wenigstens 1000:1 ist es anschließend möglich die Kosegregationsfrequenz von Markern festzustellen, woraus ihre wahrscheinliche Anordnung auf dem Chromosom abgeleitet werden kann.

Vor der Zeit der Gesamtgenomsequenzierung stellte die Radiation Hybrid (RH) Kartierung eine intensiv genutzte Kartierungsmethode dar und Karten von Mensch (Olivier *et al.* 2001), Maus (van Etten *et al.* 1999), Ratte (Scheetz *et al.* 2001), Schwein (Hawken *et al.* 1999), Rind (Band *et al.* 2000), Pferd (Chowdary *et al.* 2002), Katze (Murphy *et al.* 1999), Hund (Mellersh *et al.* 2000) existieren in sehr hoher Auflösung. Eine besondere Bedeutung dieser Technik liegt in der Tatsache, dass alle auf PCR basierenden Marker kartiert werden können, ungeachtet ihres polymorphen Status. Auf diese Weise können hochpolymorphe Mikrosatelliten ebenso wie nichtpolymorphe EST-Marker zur Kartierung genutzt werden (Wallace *et al.* 2002).

2.2 Positionale Klonierung und Gesamtgenomsequenz

Gene nach ihrer kartierten Position zu klonieren (Positionale Klonierung) stellt eine Methode dar, Gene von denen nur ein mutanter Phänotyp (Krankheitsbild) bekannt ist zu isolieren. Diese Methode kommt in der genetischen Forschung bei Pflanze, Tier und Mensch, sowie in der genetischen Diagnostik zum Einsatz und setzt sich aus unterschiedlichen Teilschritten zusammen. Das umfassende Standardwerk der grundlegenden Labormethoden (Molecular Cloning) wurde 1989 von Sambrook, Fritsch & Maniatis veröffentlicht. Erste positionelle Klonierung in Phagen und Bakterien wurde aber

bereits 1972-73 durchgeführt (Jackson *et al.* 1972, Cohen *et al.* 1973) und ein erster bedeutender Erfolg in der humanen Diagnostik wurde mit der Klonierung des Gens für Cystische Fibrose (Kerem *et al.* 1989) erzielt. Bis heute verkörpert positionale Klonierung die Grundlage der Genomanalyse.

Eine positionale Klonierung kann beschrieben werden, beginnend mit der genetischen Kartierung eines Gens, relativ zu flankierenden Genen oder Markern. Im Anschluss müssen aus BAC-Bibliotheken Klone isoliert werden, die durch Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) physisch kartiert werden können. Das Rekonstituieren der genomischen Region durch Anordnung der BAC-Klone in der richtigen Reihenfolge ergibt einen Contig, der das zu klonierende Gen enthält. Zur Isolierung des entsprechenden BAC-Klons muss der Contig nach Loci untersucht werden, die sich in enger genetischer Kopplung mit dem gesuchten Gen befinden. Der zutreffende BAC-Klon wird fragmentiert und durch Hybridisierung einer genspezifischen Sonde das entsprechende Fragment isoliert. Durch Sequenzierung dieser chromosomalen Einheit erfolgt die Detektion des gesuchten Gens. Mit Hilfe dieser Ursequenz kann schließlich, mit Hilfe gezielt gelegter Primer und PCR-Amplifikation die Suche nach möglicher allelischer Variation beginnen.

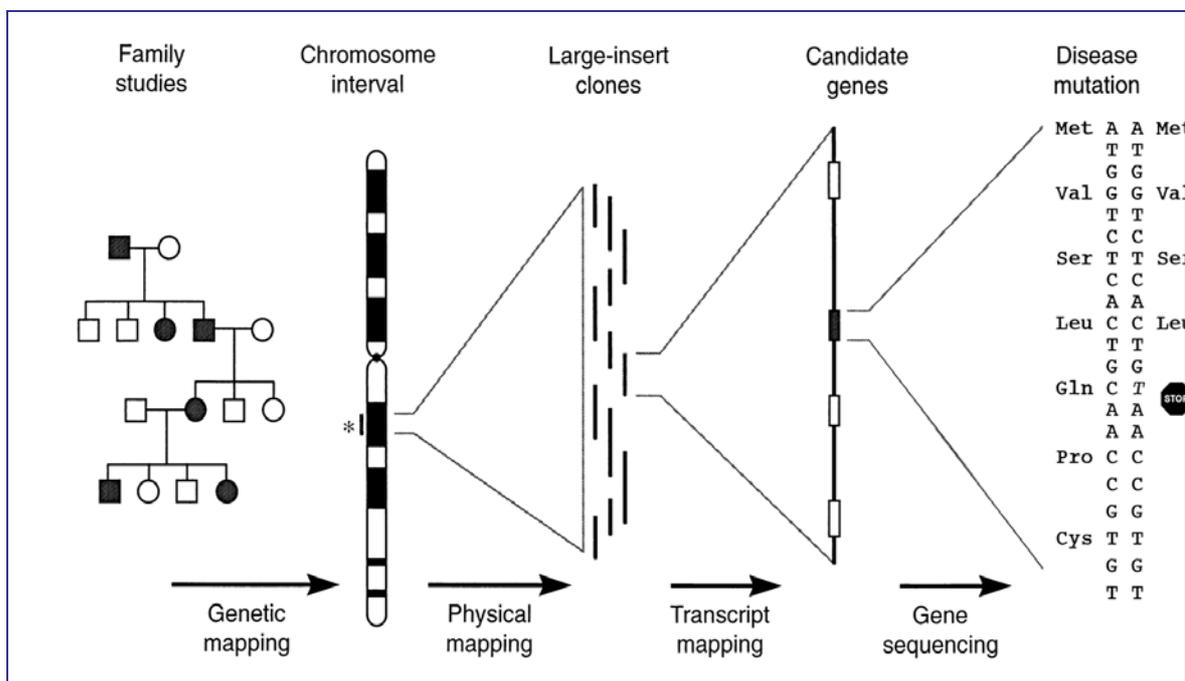


Abbildung 2.9: Planmäßige Schritte der positionalen Klonierung in der humanen medizinischen Diagnostik (Pray 2003).

Markerkarten sollten möglichst viele und gleichmäßig über das Genom verteilte hochpolymorphe Markerloci beinhalten. Auf diese Weise können unbekannte Gene bei einem Nachweis der Kosegregation mit einem oder mehreren chromosomal bereits

lokalisierten Markern einer Chromosomenregion zugeordnet werden. Diese Region kann anschließend mittels zusätzlicher Marker weiter eingengt werden um die genaue Position des Gens zu erhalten.

2.2.1 BAC- Bibliotheken

BAC Bibliotheken stellen Kollektionen von DNA Klonen dar, die ein gesamtes Genom eines Organismus mindestens einmal, oft aber 3 bis 10 Mal in Form von in Plasmide inklinierten Fragmenten umfassen. Zur Erstellung der klontragenden Bakterien werden Vektoren eingesetzt, die das Einbringen und die Stabilität der Fremd-DNA im Wirtsorganismus, sowie ihre Replikation ermöglichen. Von einer solchen Bibliothek können individuelle Klone mit Hilfe spezifischer DNA Sonden selektiert werden, um das Genom partiell zu rekonstruieren.

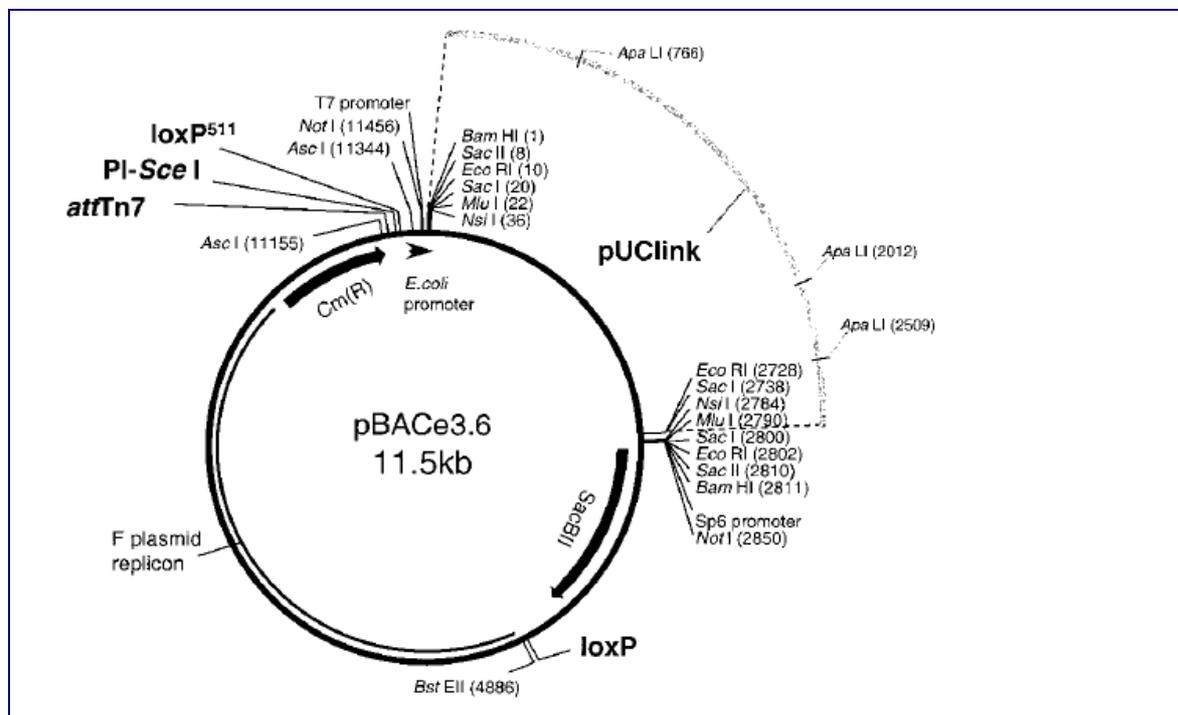


Abbildung 2.10: Karte des pBACe3.6 Vektors (Frengen *et al.* 1999)

F-Faktoren sind Episomen der *E.coli* Zelle, die durch Konjugation entweder als eigenständige Plasmide oder aber durch Rekombination integriert in das Bakterienchromosom weitergegeben werden. Aus integrierten Bakterienchromosomen, zusammenhängend mit benachbarten replikatorischen und regulatorischen *E.coli* Genen (z.B. *oriS*, *repE*, *parA*, *parB*) durch erneute Rekombination wieder ausgeschnittene F-Faktoren, bilden die Grundlage für F⁺-Klonierungsvektoren, die bis zu 300 kb Fremd-DNA aufnehmen können. Die unidirektionalen selbstreplizierenden Gene sind *oriS* und *repE*,

während dem *parA* und *parB* die Anzahl der Kopien auf 1 oder 2 pro *E.coli* Genom beschränkt halten.

Die Möglichkeit DNA-Fragmente klonieren zu können ist eine der Voraussetzungen zur physischen Kartierung und positionalen Klonierung von Genen. Erste Klonierungen in größerem Umfang und die Erstellung von Klon-Banken wurden mit Cosmiden als Vektor durchgeführt (Meyerowitz *et al.* 1980). Cosmide sind Hybriden zwischen dem Lambda (λ) Phagen und einem Plasmid. Ihre DNA kann in der Zelle repliziert werden wie die eines Plasmids oder verpackt werden wie die eines Phagen. Cosmide können jedoch größere DNA-Mengen als Phagen, bis ca. 45 kb DNA Insertgröße tragen. Aus der Kombination von Cosmiden mit dem *E.coli* Fruchtbarkeitsfaktor F (Hayes 1952, Lederberg & Tatum 1953) entstanden Fosmide (Kim *et al.* 1992).

Tabelle 2.2: Genotyp des *E.coli* Stammes DH10B (Goller & Mitterbauer 2004)

Marker	Anmerkung
F^-	Stamm enthält kein Episom, keine Konjugation möglich
<i>mcrA</i>	Mutation verhindert die <i>mcrA</i> -Reaktion methylierter DNA
$\Delta(\text{mrr-hsdRMS-mcrBC})$	Deletion eines ganzen Genclusters von 6 Restriktionsenzymen (<i>mrr-hsdR-hsdM-hsdSmrcB-mrcC</i>)
$\Phi 80\text{dlacZ}\Delta\text{M15}$	Stamm trägt den defekten Lambda-Prophagen $\Phi 80$, dieser trägt das <i>dlacZ</i> Δ M15-Allel, <i>dlacZ</i> Δ M15 codiert das ω -Fragment der β -Galactosidase
ΔlacX74	Deletion des kompletten <i>lac</i> Operons
<i>endA1</i>	Mutation der unspezifischen Endonuclease I (ermöglicht stabilere DNA-Präparationen)
<i>recA1</i>	Mutation verhindert homologe Rekombination
<i>deoR</i>	Mutation in einem Repressor des <i>deoCABD</i> Operons \Rightarrow konstitutive Expression (Aufnahme großer Plasmide möglich)
$\Delta(\text{ara, leu})7697$	Deletion eines Genclusters (von <i>ara</i> bis <i>leu</i> Operon)
<i>araD139</i>	Mutation der L-ribulose 5-phosphat 4-epimerase \Rightarrow L-Arabinose kann nicht metabolisiert werden
<i>galU</i>	Mutation der UDP-Glucose Pyrophosphorylase \Rightarrow Galaktose kann nicht metabolisiert werden
<i>galK</i>	Mutation der Galaktokinase \Rightarrow Galaktose kann nicht metabolisiert werden
<i>nupG</i>	Mutation eines Nucleoside-Transporters
<i>rpsL</i>	Mutation im Protein S12 der 30S Untereinheit \Rightarrow Streptomycin-Resistenz

BAC stellen Konstrukte auf der Grundlage eines F'-Plasmid dar (Shizuya *et al.* 1992). F-Plasmide werden aufgrund des Origin of Replication (ORI) in nur geringster Anzahl in *E.coli* Zellen unterhalten (low copy number; 1 bis 2 Kopien pro Zelle) und reduzieren auf diese Weise die Möglichkeit der Rekombination zwischen DNA-Inserts unterschiedlicher Plasmide.

Die BAC-Banken des Rindergenoms von Zhu *et al.* (1999) und Buitkamp *et al.* (2000) basieren beide auf dem *pBACe3.6* Vektor (Frengen *et al.* 1999). Dieser Vektor stellt eine Weiterentwicklung des zur Herstellung der ersten humanen BAC-Bank (Shizuya *et al.* 1992) eingesetzten Vektors *pBAC108L* dar (Frengen *et al.* 2000). Für einen positiven Selektionsmechanismus wurde hier das *sacB* Gen eingebaut, dessen Produkt Levansucrase Saccharose aus dem Anzuchtmedium in Levan umsetzt (Pierce *et al.* 1992). Dieser Stoff ist toxisch für die *E.coli* Zelle. Um den Zelltod zu verhindern trägt der unligierte Vektor ein 2.7 kb großes *pUC*-Link zur Trennung des *sacB* Gens von seinem Promotor, wodurch eine Exprimierung verhindert wird. Das *pUC*-Link wird flankiert von jeweils sechs Erkennungsstellen für Restriktionsenzyme (*NotI*, *BamHI*, *SacII*, *EcoRI*, *SacI*, *MluI*). Bei erfolgreicher Ligation des Vektors wird das *pUC*-Link durch Fremd-DNA ersetzt, sodass auch weiterhin keine Exprimierung des *sacB*-Gens erfolgt. Schlägt die Ligation fehl, führt die Vereinigung des *sacB*-Promotors mit dem *sacB*-Gen nach erfolgreicher Transformation zur Exprimierung und dadurch zum Tod der Zelle. Um zu verhindern, dass untransformierte *E.coli* Zellen weiterverarbeitet werden, wird dem Anzuchtmedium das Antibiotikum Chloramphenicol in einer Konzentration von 20-170 µg/ml zugesetzt. Chloramphenicol bindet an die 50S Untereinheit der bakteriellen Ribosomen (70S), verhindert die Ausbildung von Peptidbrücken und greift so in die bakterielle Proteinsynthese ein. Transformierte Zellen bleiben davon unberührt, da der *pBACe3.6* Vektor zusätzlich das Chloramphenicol-Resistenzgen [*CM(R)*] trägt. Das Resistenzgen kodiert eine Acetyltransferase, die das Antibiotikum acetyliert und inaktiviert.

Der Mikroorganismus *E.coli* gehört zu den gram negativen Bakterien. Er wird bei der Konstruktion von BAC-Klonen in Form eines K12-Sicherheitsstammes (Blattner *et al.* 1997) als Empfängerorganismus für ligierte Vektoren eingesetzt. Der Wildtyp-Stamm von *E.coli* K12 wurde vom Stuhl eines convaleszierenden Diphtheriepatienten 1922 in der Stanford University, Palo Alto, California, USA isoliert und 1925 als typischer *E.coli* Stamm unter der Nummer K12 in die Stammsammlung des Department of Bacteriology an der Stanford University aufgenommen. Subkulturen und Derivate dieses Stammes wurden zum ersten Mal 1944 beschrieben (Gray & Tatum 1944). Seit dieser Zeit wurde dieser

Stamm intensiv genutzt und mutagenisiert. Kein durch dieses Bakterium ausgelöster Krankheitsfall wurde jemals beschrieben. Ebenso konnte gezeigt werden, dass dieser Stamm nicht fähig ist den menschlichen Darm zu besiedeln (Smith 1975). Darüber hinaus fehlen dem K12 Stamm aufgrund einer genetischen Mutation das O-Antigen, sowie alle bei *E.coli* bekannten virulenten Gene (Muhldorfer & Hacker 1994). Aus diesem Grund wird der K12 Stamm als der Prototyp eines sicheren und apathogenen Bakterienstamms angesehen (Kuhnert *et al.* 1995, 1997).

Tabelle 2.3: Übersicht publizierter BAC-Banken (Mensch, Affe, Nutztierarten)

Autoren	Spezies	Vektor	Genom- abdeckung	Anzahl Klone	Ø Insert- länge
Shizuya <i>et al.</i> 1992	Mensch	<i>pBAC108L</i>	-	-	100 kb
Wang <i>et al.</i> 1994	Mensch	-	5-6x	-	63 kb
Cai <i>et al.</i> 1995	Rind	<i>pBeloBAC11</i>	3x	104040	130 kb
Kim <i>et al.</i> 1996	Mensch	<i>pBeloBAC11</i>	4x	96000	140 kb
Asakawa <i>et al.</i> 1997	Mensch	<i>pBAC-Lac</i>	3x	96000	110 kb
Zimmer & Verrinder 1997	Huhn	<i>pBeloBAC11</i>	0,8x	4416	390 kb
Schibler <i>et al.</i> 1998	Ziege	<i>pBeloBAC11</i>	3x	61440	153 kb
Godard <i>et al.</i> 1998	Pferd	<i>pBeloBAC11</i>	1.5x	40000	110 kb
Gill <i>et al.</i> 1999	Schaf	<i>pBeloBAC11</i>	2x	59904	103 kb
Vaiman <i>et al.</i> 1999	Schaf	<i>pBeloBAC11</i>	3x	90000	123 kb
Rogel-Gaillard 1999	Schwein	<i>pBeloBAC11</i>	5x	107520	135 kb
Zhu <i>et al.</i> 1999	Rind	<i>pBACe3.6</i>	5x	157240	105 kb
Li <i>et al.</i> 1999	Hund	<i>pBACe3.6</i>	8,1x	166000	155 kb
Suzuki <i>et al.</i> 2000	Schwein	<i>pBAC-Lac</i>	4,4x	103488	133 kb
Warren <i>et al.</i> 2000	Rind	<i>pBACe3.6</i>	10x	216439	164 kb
Buitkamp <i>et al.</i> 2000	Rind	<i>pBACe3.6</i>	3x	82944	112 kb
Crooijmans <i>et al.</i> 2000	Huhn	<i>pECBAC1</i>	5,5x	49920	134 kb
Eggen <i>et al.</i> 2001	Rind	<i>pBeloBAC11</i>	4x	105984	120 kb
Osoegawa <i>et al.</i> 2001	Mensch	<i>pBACe3.6</i>	30x	546000	178 kb
Rogel-Gaillard <i>et al.</i> 2001	Kaninchen	<i>pBeloBAC11</i>	3x	84480	105 kb
Fahrenkrug <i>et al.</i> 2001	Schwein	<i>pTARBAC2</i>	11,3x	185496	165 kb
Jeon <i>et al.</i> 2003	Schwein	<i>pBACe3.6</i>	7x	165000	125 kb
Liu <i>et al.</i> 2003	Huhn	<i>pBeloBAC11</i>	13,3x	138240	118 kb
Qian <i>et al.</i> 2004	Affe	<i>pBACe3.6</i>	11x	193152	185 kb
Xu <i>et al.</i> 2004	Affe	<i>pBACe3.6</i>	6x	136320	148 kb

Der K12-Sicherheitsstamm *DH10B* ist der *E.coli* Empfängerorganismus beider BAC-Banken, die in der vorliegenden Arbeit zum Einsatz kamen. *E.coli DH10B* ist ein generell gern genutzter Empfängerorganismus, da er zusätzlich eine U3 Bakteriophagenresistenz durch eine *gal*-Mutation aufweist und deshalb BAC-Banken gegenüber Phageninvasionen resistent sind. Tabelle 2.2 beschreibt den Genotyp dieses Bakteriums. Gene in

unverändertem Zustand (Wildtypallele) werden bei der Beschreibung des Genotyps nicht explizit angeführt.

2.2.2 BAC Fingerprinting Analyse

BAC-Klone repräsentieren chromosomale Fragmente eines zu untersuchenden Genoms. Gelingt es diese Fragmente wieder in ihre ursprüngliche Position zueinander anzuordnen kann man Chromosomen teilweise oder ganz rekonstruieren. Mit den Klon-Endsequenzen als STS-Marker können hochinformativ physische BAC-Karten generiert werden. Diese Vorgehensweise wurde als Grundlage der Sequenzierung der Genome des Menschen, der Maus, der Ratte (Lander *et al.* 2001, Venter *et al.* 2001, Waterstone *et al.* 2002, Gibbs *et al.* 2004) und des Rindes (Bovine Genome Sequencing and Analysis Consortium 2009) angewandt.

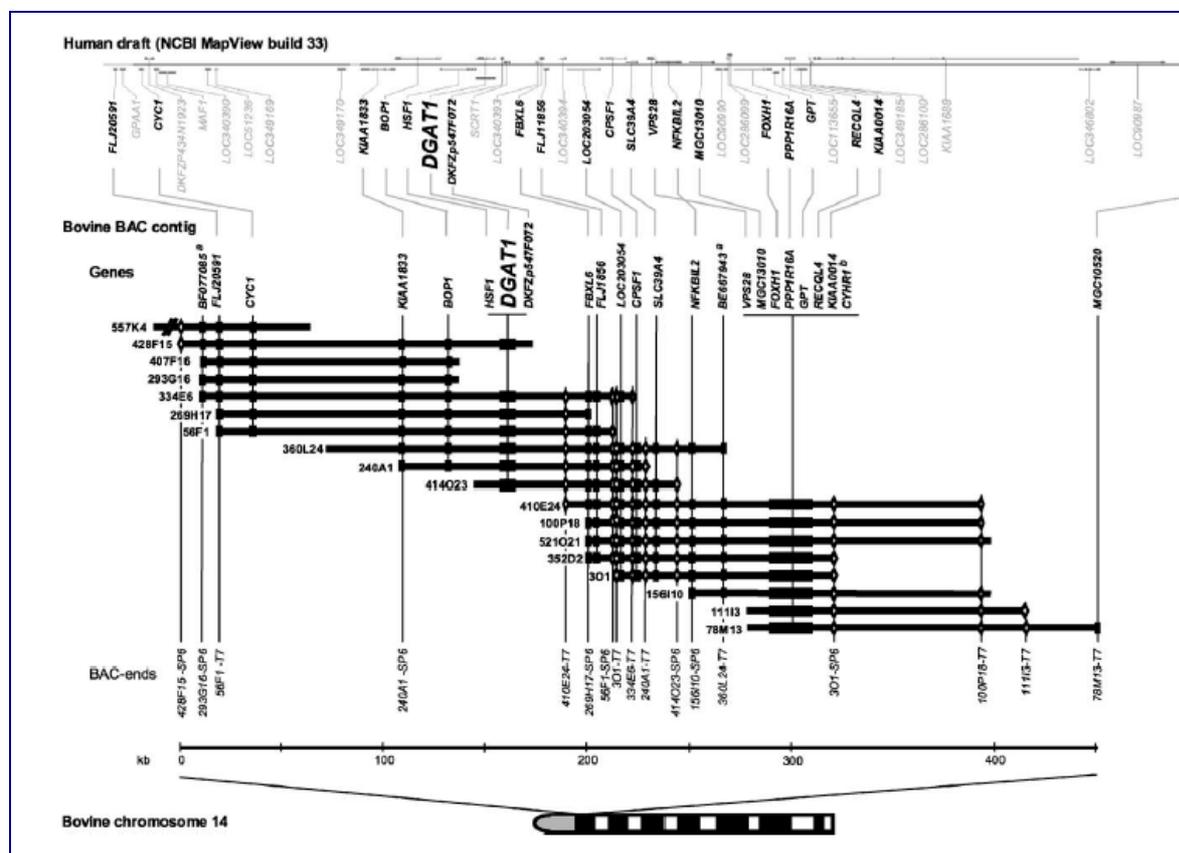


Abbildung 2.11: BAC Contig aus der centromerischen Region des bovines Chromosoms 14, entsprechend ausgerichtet an der Karte aus dem telomerischen Ende des humanen Chromosoms 8 (8q24.3, Region 144.902 kb bis 145.618 kb). Klonbezeichnungen entsprechen ihren Filterpositionen. Orthologe Gene zwischen Mensch und Rind sind durch Linien verbunden (Winter *et al.* 2004).

BAC-Klone werden dazu mit geeigneten Enzymen verdaut. Verdauungsprodukte werden anschließend auf Agarosegelen elektrophoretisch getrennt und die relative Mobilität der Restriktionsfragmente wird gemessen. Klone mit einer großen Anzahl Fragmente gleicher

Mobilität, plus oder minus einer konstanten „Toleranz“, werden daraufhin als benachbarte Klone mit überlappenden Bereichen behandelt (Marra *et al.* 1997).

Für die positionale Klonierung erbringt diese Technik die konkrete genomische Umgebung des gesuchten Gens. Laborbasierte Feinkartierungstechniken benötigen DNA-Konzentrationen, die mit genomischer DNA nicht erreicht werden, jedoch durch Vervielfältigung von BAC tragenden *E.coli* Zellklonen, ihrer anschließenden Lyse und DNA-Extraktion erreichbar sind. Für die weitere Eingrenzung und Linkage-Disequilibrium Analysen bilden Typisierungen mit STS-Marker der Contig Region die weitere Grundlage.

2.2.3 Sequenzdaten

Auf der Grundlage von automatisierter DNA-Sequenzanalyse mit Fluoreszenz Detektion (Smith *et al.* 1986) wurden 2004 drei vollständige Säugergenome (Mensch, Maus, Ratte) sequenziert und veröffentlicht (Lander *et al.* 2001, Venter *et al.* 2001, Waterston *et al.* 2002, Gibbs *et al.* 2004). Huhn und Rind lagen zum Ende des Jahres 2004 in einer 'Draft' Sequenz eines Bankiva Huhns und einer Hereford Kuh mit 6,6-facher bzw. 3,3-facher Genomabdeckung vor. Diese 'Draft' Sequenzen setzten sich aus komplett sequenzierten BAC-Klonen zusammen, die in der Genbank (Benson 1999) nachgeschlagen werden können. Für das Rind wurden weitere Rassen (Holstein, Angus, Jersey, Limousin, norwegisches Rotvieh und Brahman) angekündigt (NIH News: www.nih.gov/news/pr/oct2004/nhgri-06.htm). Im Oktober 2007 veröffentlichte das 'Bovine Genome Sequencing Project', geführt von 'Baylor College of Medicine' humanem Genomsequenzierungscenter die vierte Version des bovinen 'genome assembly' (BT-Build 4.0) in der Form einer 7,15-fältigen gemischten Zusammenstellung, die 'whole genome shotgun' Sequenzen (WGS) mit BAC Sequenzen kombiniert.

Vor der Sequenzierung von kompletten Genomen konnte durch Sequenzierung von mRNAs eine Fülle von EST-Sequenzen generiert werden, die bei der Genomanalyse zum Auffinden von cDNAs noch nicht kartierter Gene einen unersetzlichen Beitrag leisten. Durch das Ansequenzieren und kartieren von BAC-Enden konnten zunehmend dichtere genetische Karten erstellt werden (Schibler 2004), so auch von Haustierarten, die in der Prioritätenliste der Gesamtgenomsequenzierung abgeschlagen zurückliegen.

2.3 QTL-Analyse

QTL-Analysen werden durchgeführt, um nach einer Assoziation zwischen dem quantitativen Merkmal (Phänotyp) und der Segregation der Markerallele (Genotyp) in

einer Population zu suchen. Dabei stellen Quantitative Merkmale (QTL) solche dar, die mehr im Grad als in der Art variieren (Gelderman 1975).

Eine QTL-Analyse besteht im Wesentlichen aus drei Hauptkomponenten: Der Kartierung der Marker (Genotypisieren), der Erfassung der Leistungsmerkmale (Phänotypisieren) und der Assoziationsstudie zwischen dem Merkmal und den Markern, der QTL-Kartierung (Liu 1998). Die signifikante Assoziation zwischen der Weitervererbung eines bestimmten Markerallels und eines gemessenen quantitativen Merkmals gibt Gewissheit, dass ein QTL mit diesem Marker gekoppelt ist (Haley 1999). Die grundlegende Kartierungsauflösung von QTL-Kartierungsstudien ist aber begrenzt durch die Anzahl der Meiosen (Darvasi *et al.* 1993). Je polymorpher sich ein Marker verhält, desto höher ist jedoch die Chance informative Meiosen zu beobachten, bei denen die Weitergabe der Markerallele an die Nachkommen verfolgt werden kann (Fries 1993).

2.3.1 Familienstudien

Durch die Praxis der Selektion von Vatertieren in der Tierzucht, in Kombination mit künstlicher Besamung ist es möglich mit relativ geringem Aufwand Familienmaterialien aus paternalen Halbgeschwistern zusammenzustellen. Zu diesem Zweck kann DNA aus Spermaproben extrahiert und zweifelsfrei den betreffenden Tieren zugeordnet werden. Verlässliches Familienmaterial ermöglicht die Beobachtung der Weitergabe eines jeden Gens von einer Generation zur nächsten und dabei ebenso der Segregation von genetischen Markern in Kopplung mit einem Allel.

Die Arbeitsgemeinschaft Deutscher Rinderzüchter (ADR), Bonn in Zusammenarbeit mit Tierzuchtinstituten deutscher Universitäten hat ein Familienmaterial männlicher Halbgeschwister in Form eines Granddaughter-Designs (Weller *et al.* 1990) zusammengestellt (Thomsen *et al.* 2000). Auf der Basis dieses Familienmaterials werden der heterozygote männliche Vorfahre «Grandsire», seine Söhne «Sons» und deren Töchter «Granddaughters» genannt.

Das ADR-Granddaughter Design gründet sich in der ersten Generation auf drei Großväter (Grandsires), jeweils benannt mit AA, BB, CC der Geburtsjahrgänge 1973 und 1974. In der zweiten Generation umfasst die A-Gruppe 5 Väter (Sires), die B-Gruppe 3 Väter und die C-Gruppe 7 Väter der Geburtsjahrgänge 1979 bis 1985. Die Familien dieser Väter besitzen eine durchschnittliche Größe von 55 Söhnen (Sons), innerhalb der Grenzen von 19 bis 276 Söhnen der Geburtsjahrgänge 1986 bis 1993.

2.3.2 Genotypisierung

In Kopplungsstudien wird im Unterschied zur Assoziationsstudie keine Beziehung zwischen Allel und Merkmal, sondern zwischen zwei Loci hergestellt. Ein derartiger Zusammenhang charakterisiert Rekombination und Segregation von DNA Markern und Phänotypen bei einer relativ kleinen Anzahl von Meiosen in Familienmaterialien oder Kreuzungen.

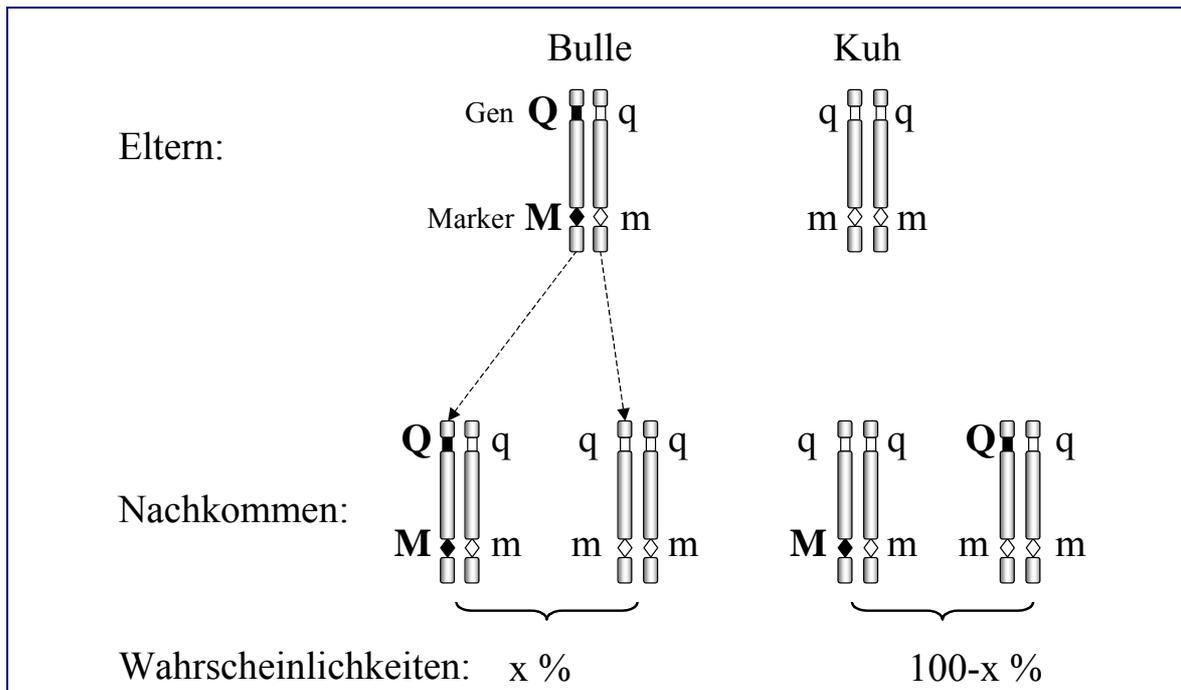


Abbildung 2.12: Weiterverfolgung der Vererbung eines Hauptgenotyps (major genotype) mit Auswirkung auf ein quantitatives Merkmal (Q Locus), mit einem eng gekoppelten genetischen Marker (M Locus). Der Bulle ist heterozygot für beide Loci, die Kuh ist homozygot. Die Rekombinationsrate ($100\% - x\%$) legt fest, wie oft Q-Allel und M-Allel miteinander verbunden sind (Kinghorn & van der Werf 2000).

Genetische Karten sind 'organisatorische Karten' und zeigen die Anordnung von Loci entlang eines Chromosoms und ihre relative Distanz zueinander. Diesem Ordnungsschema zugrunde liegt die Annahme, dass bei zufällig verteilter Rekombinationshäufigkeit während der Meiose Gene, die näher zusammen liegen weniger häufig rekombinieren und häufiger gemeinsam vererbt werden, als weiter von einander entfernte. Während der Meiose kann es durch Aneinanderlagern homologer Chromosomen zu einem Crossing-over kommen. Das Austauschen der angelagerten Abschnitte zwischen den Chromosomen führt dann zur Rekombination. Die Abstände zwischen den Genen bzw. genetischen Markern werden aufgrund der beobachteten Rekombinationshäufigkeiten zwischen zwei oder mehreren Genorten bei der Vererbung von Haplotypen innerhalb von Familien bestimmt. Die genetische Distanz errechnet sich aus der physischen Distanz multipliziert

mit der Rekombinationsrate und wird in centiMorgan (cM) angegeben. Die Entfernung zwischen Genen, die in 100 Meiosen einmal rekombinieren (1%ige Rekombinationsfrequenz) beträgt 1 cM. Diese Kartierungs-Funktion wurde von A. Sturtevant (1911) aufgestellt und basiert auf der Annahme von Gleichheit zwischen Rekombinationsfrequenz und Kartenentfernung. Eine solche Beziehung ist zutreffend für eng gekoppelte Loci, Rekombinationsfrequenzen verhalten sich jedoch nicht strikt additiv über größere chromosomale Entfernung (Weller 2001). Da es entlang eines Chromosoms grundsätzlich zu Rekombinationsereignissen zwischen jedem Markerpaar kommen kann, wären bei einer Markeranordnung von A, B und C der erste (A) und der letzte (C) Marker theoretisch nicht rekombiniert, was jedoch nicht zutrifft. Dieses Phänomen versuchten Haldane (1919) und Kosambi (1944) mit verbesserten Kartierungs-Funktionen zu berücksichtigen. Ein Nachteil der Kosambi Kartierungs-Funktion besteht jedoch darin, dass anders als bei Sturtevant und Haldane Kartierungsdistanzen zwischen Markern nicht mehr additiv sind (Weller 2001). Die genetische Karte des Rindergenoms beträgt ca. 3353 cM Haldane oder 2731 cM Kosambi (Boichard *et al.* 2003).

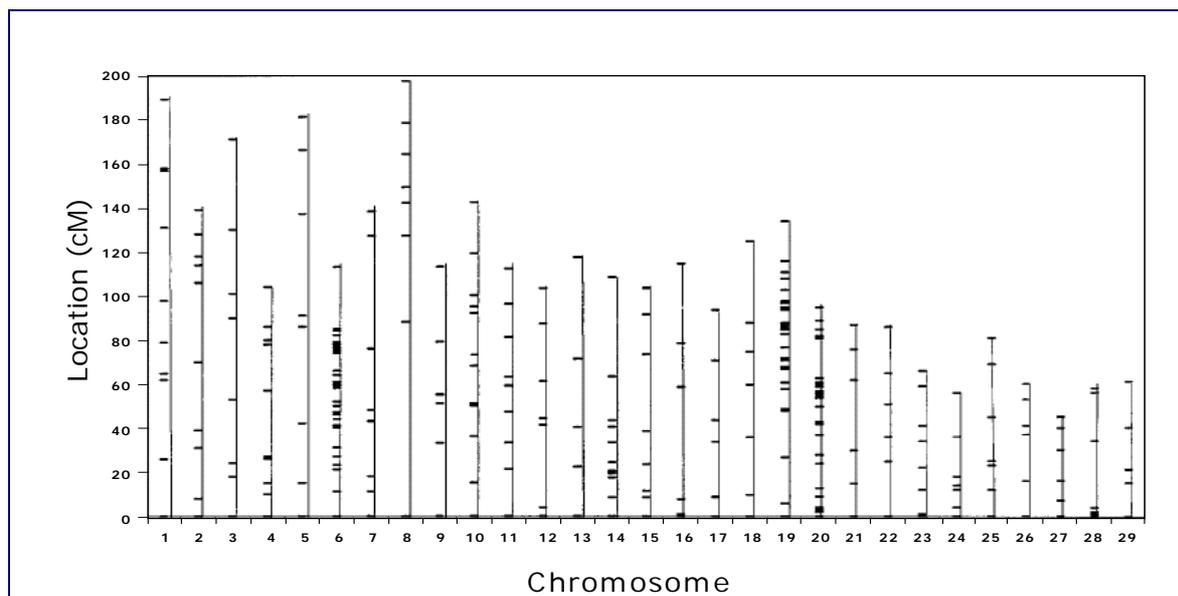


Abbildung 2.13: Graphische Darstellung der Markerverteilung und Markerdichte eines bovinen 'Whole Genome Scan'. Die jeweilige Chromosomenzahl ist auf der horizontalen Achse aufgetragen; die chromosomalen Positionen sind auf der vertikalen Achse in centiMorgan (cM) eingezeichnet. Die Marker auf den Chromosomen sind in kleinen horizontalen Strichen an der Achse des entsprechenden Chromosoms markiert (Schrooten *et al.* 2000).

Mit Kartierungsfunktionen kann die Rekombinationsfrequenz (θ) in genetische Distanz umgerechnet werden. Bei freier Rekombination zwischen zwei Genorten beträgt die Rekombinationsfrequenz $\theta = 0,5$. Je geringer der Abstand zwischen den Genloci auf einem

Chromosom, desto häufiger werden sie gekoppelt vererbt, dabei ist $0 \leq \theta < 0,5$. Bei der Kopplungsanalyse wird θ am genotypisierten Familienmaterial geschätzt und getestet, wie groß die Wahrscheinlichkeit der Kopplung ist. Dabei wird ein LOD-Score (logarithm of the odds): $Z(\theta) = \log_{10} \frac{L(\theta)}{L(0,5)}$ als kritischer Wert bestimmt. Der LOD-Score ist ein Maß, um beim Test die Nullhypothese mit freier Rekombination, also keine Kopplung, zu verwerfen. Beträgt der LOD-Score für die maximierte Likelihood function ≥ 3 , so betrachtet man die Genorte als gekoppelt. Bei einem Wert gleich oder kleiner -2 kann man die Kopplung ausschließen. Zur Durchführung von Kopplungsanalysen steht das Computerprogramm CRI-MAP (Lander & Green 1987) zur Verfügung.

Tabelle 2.4: Vergleich genetischer und physischer Genomgrößen unterschiedlicher Spezies.

Spezies	cM	Mb
Mensch (<i>Homo sapiens</i>)	3700 (Broman <i>et al.</i> 1998)	3400 (Lander <i>et al.</i> 2001)
Maus (<i>Mus musculus</i>)	1400 (MGD 1998)	3454 (Waterston <i>et al.</i> 2002)
Ratte (<i>Rattus norvegicus</i>)	1738 (Bihoreau <i>et al.</i> 2001)	2720 (Gibbs <i>et al.</i> 2004)
Rind (<i>Bos taurus</i>)	3155 (Thomsen <i>et al.</i> 2000)	3652 (Genbank 141.0)
Rind	3160 (Ihara <i>et al.</i> 2004)	3750 (Weller <i>et al.</i> 1997)
Schaf (<i>Ovis aries</i>)	3470 (Pagnacco & Carta 2004)	3300 (Gregory 2001b)
Ziege (<i>Capra hircus</i>)	3100 (Schibler <i>et al.</i> 1998)	3240 (Gregory 2001b)
Schwein (<i>Sus scrofa</i>)	1900 (PigMap, ArkDB)	3000 (Rohrer <i>et al.</i> 2004)
Hund (<i>Canis familiaris</i>)	2600 (Switonsky <i>et al.</i> 2004)	2400 (Kirkness <i>et al.</i> 2003)
Huhn (<i>Gallus gallus</i>)	3800 (Groenen <i>et al.</i> 2000)	1200 (McPherson <i>et al.</i> 2002)
	4000 (Schmid <i>et al.</i> 2000)	1000

Rekombinationshäufigkeiten sind nicht zwischen Genomen übertragbar. Unterschiede existieren zwischen Arten und treten auch zwischen Rassen (Thomsen *et al.* 2001a, Weimann *et al.* 2003), Individuen (Park *et al.* 1995, Simianer *et al.* 1997), Geschlechtern (Broman *et al.* 1998), sowie zwischen Chromosomen (Schmid *et al.* 2000) auf. Dabei charakterisiert das Verhältnis von genetischer zu physischer Genomgröße eine durchschnittliche theoretische Beziehung zwischen Rekombinationsrate und Distanz in Basenpaaren.

Im Genom des Huhnes existieren jedoch große Unterschiede im Verhältnis der physischen zur genetischen Distanz zwischen den Chromosomen. Makrochromosomen werden in der Literatur mit ca. 396 kb/cM (Smith & Burt 1998, Smith *et al.* 2000) und Mikrochromosomen mit 150-250 kb/cM (Schmid *et al.* 2000) angegeben.

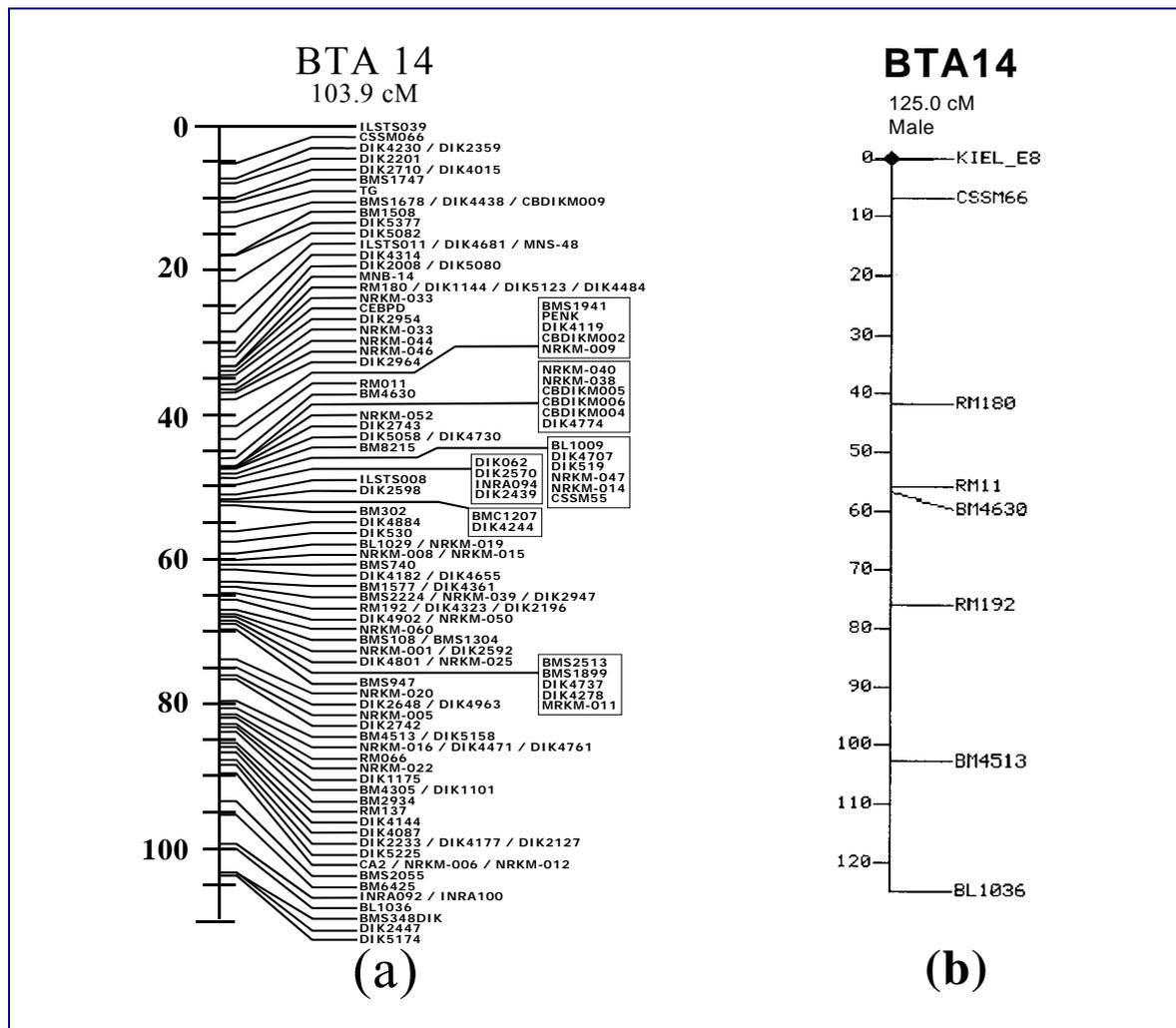


Abbildung 2.14 a, b: Genetische Karte von Chromosom 14 des Rindes, (a) MARC 2004 (Ihara *et al.* 2004), (b) ADR 2000 (Thomsen *et al.* 2000). Mit der Veröffentlichung der genetischen Karte des US Meat Animal Research Center konnte der durchschnittliche Markerabstand auf der genetischen Karte des Rindes von 2,5 cM (Świtoński 2002) auf 1,0 cM (Ihara *et al.* 2004) verkürzt werden.

Die ersten Kopplungskarten bei Nutztieren, die mit Hilfe von DNA Markern erstellt wurden entstanden zwischen 1994 und 1995 für Rinder (Barendse *et al.* 1994, Bishop *et al.* 1994), Schweine (Archibald *et al.* 1994, Ellegren *et al.* 1994, Rohrer *et al.* 1994) und Schafe (Crawford *et al.* 1995). Genetische Karten des Rindes nahmen in den folgenden Jahren kontinuierlich an Markerdichte zu und Kopplungskarten der zweiten Generation wurden für Rinder (Barendse *et al.* 1997, Kappes *et al.* 1997), Schweine (Rohrer *et al.* 1996) und Schafe (de Gortari *et al.* 1998) veröffentlicht. Der erste genomweite Scan zur Auffindung von QTL beim Milchrind wurde 1995 von Georges *et al.* durchgeführt. Mit 147 Markern wurden 1645 cM des Rindergenoms kartiert. Barendse *et al.* (1997) nutzte 746 Marker und Kappes *et al.* (1997) publizierten eine dichtere Version aus 1250 Markern für das gesamte Genom. Diese Karte mit einer genetischen Größe von 2990 cM diente

lange Zeit als Standardreferenz für das Rindengenom mit einem durchschnittlichen Markerintervall von 3,0 cM. Derartige Markerabstände ermöglichten es, durch QTL-Analysen vererbaren Phänotypen spezifische Chromosomenabschnitte zuzuweisen, eine Feinkartierung war mit dieser Auflösung jedoch nicht möglich. Ihara *et al.* (2004) publizierten die zurzeit aktuellste genetische Karte des Rinder-Genoms mit einem durchschnittlichen Markerintervall von 1,4 cM. Dabei sind nun über die Hälfte des Genoms mit Intervallen von 2,0 cM oder kleiner abgedeckt.

2.3.3 Phänotypisierung (Erfassung der Leistungsmerkmale)

Nur Merkmale mit feststellbarer Heritabilität (h^2) können chromosomalen Bereichen zugeordnet werden. Merkmale mit niedrigem h^2 wie Fruchtbarkeit, Krankheitsresistenz, Vitalität bis Wesensmerkmale, über Merkmale mit mittlerem h^2 wie die Mehrzahl der Leistungsmerkmale bis zu Merkmalen mit hohem h^2 wie z.B. Exterieurmerkmale können wie in Abbildung 2.15 dargestellt unter Berücksichtigung ihrer Heritabilitäten in der Zuchtwertschätzung (ZWS) berücksichtigt werden.

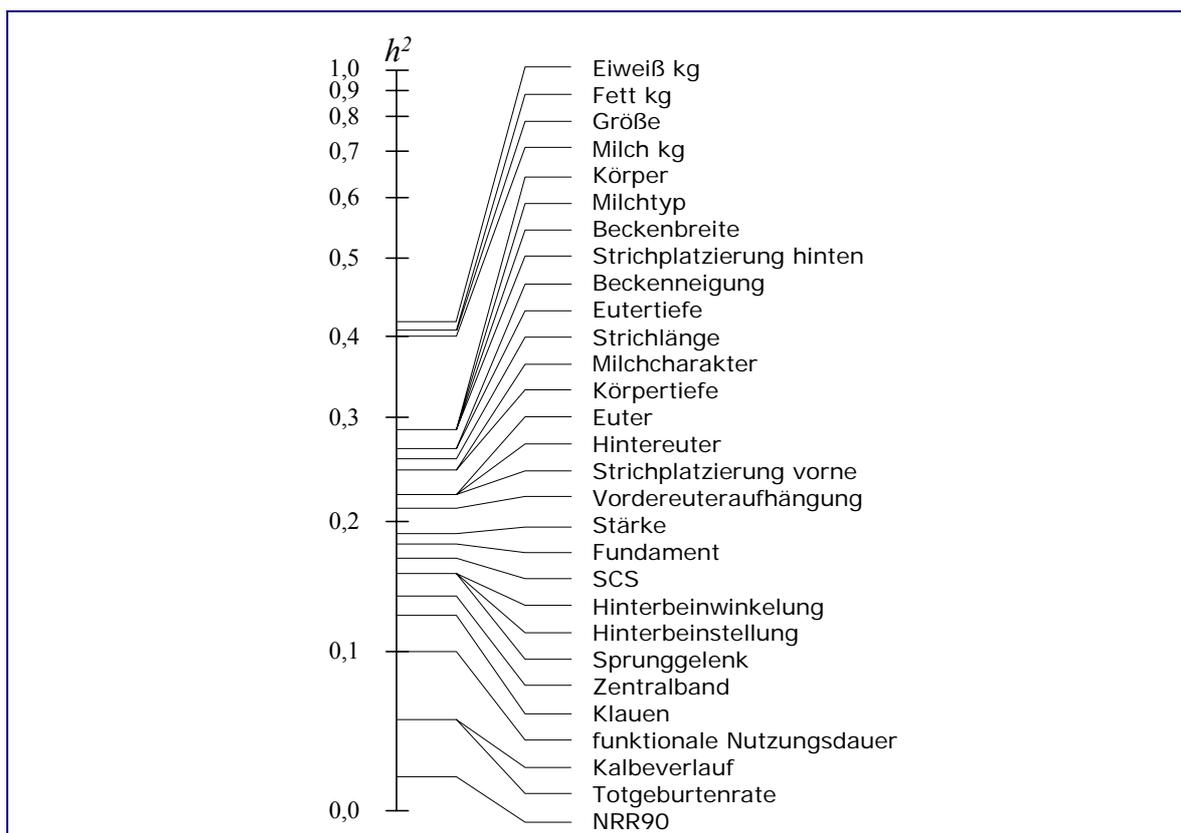


Abbildung 2.15: Heritabilitäten in Deutschen Holstein Rindern für Milchleistungs-, Fruchtbarkeits- und funktionale Merkmale (VIT, Verden, Mai 2004).

Seit 1996 bzw. 1998 erfolgte die ZWS für Zellzahl und Leistungsmerkmale im VIT (Vereinigte Informationssysteme Tierhaltung, 27283 Verden) mit einem Mehrlaktations-

Fixed-Regression-Tiermodell, das die Ergebnisse der einzelnen Kontrollen als Informationsmerkmale berücksichtigt.

Im Mai 2003 wurde das bis dahin verwendete Fixed-Regression-Modell durch ein Random-Regression-Modell (RRM) ersetzt. Das Fixed-Regression-Modell betrachtete die Kontrolltagsleistungen innerhalb einer Laktation als wiederholte Beobachtungen des genetisch gleichen Merkmals ($rg = 1,0$) und schätzte daher nur eine über die gesamte Laktation gleiche, durchschnittliche Tagesabweichung. Im RRM werden dagegen genetische Korrelationen ($0,50 < rg < 1,0$) zwischen den Leistungen unterschiedlicher Kontrolltage innerhalb einer Laktation unterstellt. Dadurch wird für jeden Kontrolltag eine differenzierte Leistungsabweichung bzw. individuelle Laktationskurve geschätzt, deren Aufsummierung über 305 Tage den Laktationszuchtwert ergibt, d.h. die Kontrolltagsleistungen innerhalb einer Laktation werden als genetisch unterschiedlich determinierte Merkmale betrachtet. Das RRM bietet insbesondere Vorteile bei der Schätzung aufgrund noch unvollständiger Leistungsinformationen, da es über eine individuelle Laktationskurve die tatsächliche genetische Leistungsabweichung im weiteren Laktationsverlauf realistischer vorausschätzt (VIT 2005).

Die Zuchtwertschätzung erfolgt nach dem BLUP Verfahren (best linear unbiased prediction) unter Verwendung eines Tiermodells. Bei einem Tiermodell werden die Zuchtwerte aller Tiere unter Berücksichtigung der vorhandenen Verwandtschaftsbeziehungen geschätzt. Die simultane Schätzung der umweltbedingten und der genetischen Effekte führt zu einer gegenseitigen Korrektur.

Daughter Yield Deviation (DYD): In Milchrind Populationen gehört zu den allgemein benutzten Beschreibungen für den Phänotyp auch die Daughter Yield Deviation (VanRaden & Wiggans 1991, Georges *et al.* 1995, Spelman *et al.* 1996, Ashwell *et al.* 1998). DYD eines Bullen beschreiben die durchschnittliche Töchterleistung, korrigiert um fixe und nichtgenetische Effekte der Töchter und genetische Effekte ihrer Mütter (Liu 2004). Da DYD nicht auf die Zuchtwerte des Bullen regressiert sind, stellen sie die unabhängigsten und genauesten Messungen der phänotypischen Leistung der Töchter eines Bullen dar (VanRaden & Wiggans 1991). Dank dieser Eigenschaft werden DYD in der Genomanalyse bei QTL-Kartierung (Szyda *et al.* 2002), aber auch bei der Auswertung nationaler genetischer Trends (Boichard *et al.* 1995), bei genetischen Two-step-Mehrmerkmals-Studien (Ducrocq *et al.* 2001), sowie beim internationalen Vergleich von Besamungsbullen (Ducrocq *et al.* 2003, Gengler 2002, Schaeffer 2001, Weigel *et al.* 2001)

genutzt. Für die Anwendung von Wiederholbarkeits-Tiermodellen auf Laktationsleistungen zeigten VanRadden und Wiggans (1991) die Berechnung von DYD.

De-regressed proofs (DRPF): DRPF stellen in der QTL-Analyse ein Äquivalent zu DYD dar (van der Beek 1997, Thomsen *et al.* 2001b). Da DRPF jedoch im Gegensatz zu DYD den gesamten Zuchtwert eines Bullen repräsentieren, müssen Standardabweichungen auch doppelt so groß sein als letztere.

Bei de-regressierten Zuchtwerten erfolgt die De-regression auf der Basis der effektiven Töchterzahl, der Heritabilität des Merkmals und der additiven genetischen Verwandtschaftsmatrix.

$$DRBV = \frac{1}{reliability} \cdot EBV$$

Hierbei stellt die Sicherheit (reliability) das Maß der Genauigkeit dar auf einer Skala von 0 bis 100 und basiert auf der Menge verfügbarer Information über die Anzahl der Töchter, Anzahl der Aufzeichnungen, Anzahl Herden, Anzahl Verwandter, Anzahl von Zeitgenossen, und Länge der Laktationen von Töchtern.

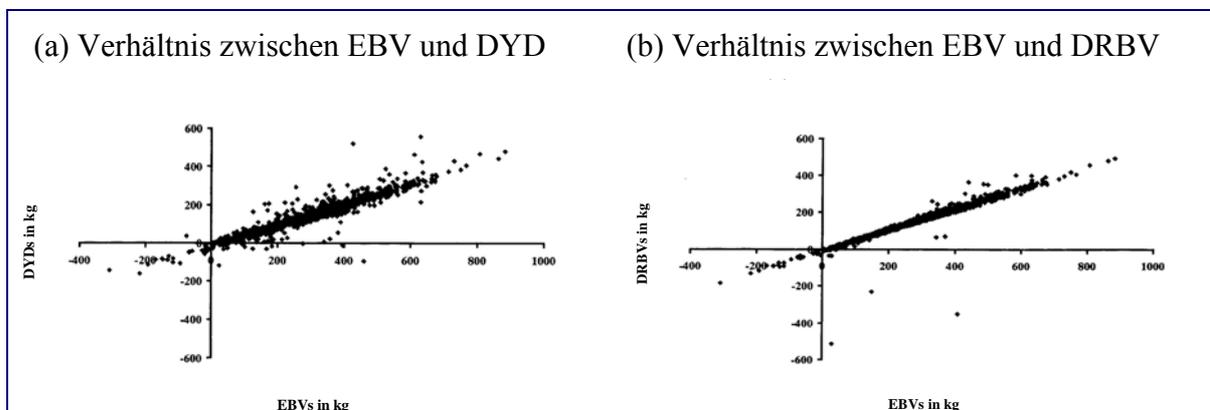


Abbildung 2.16 a, b: Beziehungen zwischen (a) geschätzten Zuchtwerten (EBV) und Daughter Yield Deviations (DYD) sowie Beziehungen zwischen (b) geschätzten Zuchtwerten und de-regressierten Zuchtwerten (DRBV) für Milchmenge (nach Thomsen *et al.* 2001b).

Thomsen *et al.* (2001b) untersuchten die Vergleichbarkeit von Daughter Yield Deviations (DYD) und de-regressierten Zuchtwerten (DRBV). Im Zuge eines Whole-Genom-Scans beim Rind für MY, FY, PY, wurden zum Zwecke des Vergleichs und der Feststellung eventueller Unterschiede als unabhängige Variablen Zuchtwerte (EBV), DYD und DRBV verwendet. Die De-regression wurde auf der Basis der effektiven Töchterzahl, der Heritabilität des Merkmals und der additiven genetischen Verwandtschaftsmatrix durchgeführt. Alle Ergebnisse wurden im Hinblick auf die Anzahl der entdeckten QTL

verglichen. Es zeigte sich dabei kein wesentlicher Unterschied bei der Verwendung von DYD und DRBV, wie in Abb. 2.16 gezeigt.

2.3.4 Marker-Merkmal-Assoziationen

Kopplungsungleichgewicht Analyse (Linkage Disequilibrium Analysis), Assoziationsstudien (LD-Mapping): Kopplungsgleichgewicht (LE) und sein Gegenteil Kopplungsungleichgewicht (LD) sind Bezeichnungen mit denen die Möglichkeit der gemeinschaftlichen Vererbung von Allelen unterschiedlicher Loci beschrieben werden kann. Allele, die in einer zufälligen Beziehung miteinander stehen werden als 'im Kopplungsgleichgewicht' bezeichnet, denn die Möglichkeit, ein Allel an einem Locus zu finden verhält sich unabhängig von der Möglichkeit ein anderes Allel an einem anderen Locus zu finden. Dabei beruht ursächlich das Kopplungsgleichgewicht (linkage equilibrium) auf der Entkopplung beider Allele infolge von Rekombination und der Annahme der Gleichverteilungen von Rekombinationshäufigkeit über das Genom. Bleibt eine Allelkonstellation an zwei Loci durch nicht vorhandene Rekombination gekoppelt und wird aufgrund dessen ständig gemeinsam vererbt, so stehen beide Loci im Kopplungsungleichgewicht (linkage disequilibrium). Tendenziell reduziert Rekombination Kopplungsungleichgewicht, zwischen eng gekoppelten Loci jedoch langsamer als zwischen weiter entfernten. So bleibt zwischen Loci mit einem Abstand von 1 cM nach 50 Generationen noch mehr als 50% des ursprünglichen Kopplungsungleichgewichtes erhalten (Falconer & Mackay 1996). Bei Kopplungsungleichgewichts-Kartierung (LD-Mapping) bzw. Assoziationsstudien werden in der Regel Marker-Phänotyp-Beziehungen in großen Populationen unverwandter Individuen gesucht. Derartige Beziehungen können Einblick in die Entwicklung einer chromosomalen Region oder ein gesamtes Genom geben (Kruglyak 1999) und können ebenso genutzt werden, Gene oder QTL zu kartieren (Nsengimana *et al.* 2004a). Ein Kopplungsungleichgewicht kommt nicht nur aufgrund physischer Kopplung von Loci zustande, sondern kann ebenso durch Drift, Selektion, Kreuzung oder durch den nachhaltigen Einfluss eines Gründertieres in einer Population verursacht werden. Da die Effekte von Kreuzungen und Selektion in landwirtschaftlichen Nutztieren weit verbreitet sind kann davon ausgegangen werden, dass LD auch zwischen weiter entfernten Loci besteht (Haley 1999). Genomweite LD-Studien in Nutztieren fanden Kopplungsungleichgewichte über weite Entfernung (>30 cM) in Schafen (McRae *et al.* 2002) und Milchrindern (Farnir *et al.* 2000).

Kopplungsstudien (Linkage Mapping): Das wichtigste Werkzeug, um kontinuierliche Variation in die ihr zu Grunde liegenden Faktoren zu zerlegen, ist die genetische Kopplungskarte. Da DNA mit Hilfe von Genkarten beschrieben werden kann, können auch genetische Faktoren, die kontinuierliche Variation beeinflussen auf genetischen Karten lokalisiert werden (Barendse & Fries 1999). In Kopplungsstudien wird im Gegensatz zu den Assoziationsstudien keine Beziehung zwischen zwei Allelen, sondern zwischen Loci hergestellt. LD wird gemessen durch die Abweichung der Haplotypenhäufigkeiten vom Produkt der Allelhäufigkeiten. LD = 0 bedeutet Gleichgewicht.

2.3.5 Kandidatengenansatz

QTL Kartierung durch Genomscans mit Hilfe unabhängiger molekularer Marker hat sich als effektiv erwiesen. Derartige Projekte sind jedoch recht kostenträchtig und zeitintensiv. Die Kartierungsauflösung ist dabei abhängig von der Markerdichte und nur selten kann von einer QTL-Kartierung direkt auf das kausale Gen geschlossen werden. Genomscans von Hybridpopulationen besitzen nur indirekte Relevanz zu Produktionsherden. Dieser Hintergrund führte zur Entwicklung des Kandidatengen Ansatzes.

Aufgrund der Natur komplexer Merkmale ist es ungewöhnlich, dass bei einem primären Genomscan nach genetischer Kopplung der Minimalintervall eines QTL auf weniger als 10-30 cM begrenzt ist (Glazier *et al.* 2002). Ein genetischer Intervall dieser Größe korrespondiert beim Menschen jedoch mit 9-27 Mb DNA oder durchschnittlich 75 bis 220 Genen (Pennisi 2003) und beim Rind mit 12-35 Mb oder durchschnittlich 95-280 Genen (Thomsen *et al.* 2000, Genbank release 141.0), was zu viele Kandidaten darstellt, um eine Evaluierung eines jeden einzelnen Gens vorzunehmen. Für einen Kandidatengenansatz ist aus diesem Grunde eine feinere Auflösung bis zu 1 cM notwendig. Das entspräche bei der Spezies Rind bei einer genetischen Kartenlänge von ca. 3000 cM, einer physischen Genomgröße von $3,75 \times 10^9$ bp bzw. ca. 30.000 Genen, einer durchschnittlichen Anzahl von 10 Genen oder einer physischen Intervallgröße von $1,25 \times 10^6$ bp (Weller, ohne Datum) pro cM. Im Zusammenhang mit der Genomanalyse werden darüber hinaus zwei Kategorien von Kandidatengen unterschieden: die funktionellen Kandidatengene und positionelle Kandidatengene. Positionelle Kandidatengene sind solche, die physisch im Bereich kartierter QTL-Regionen lokalisiert sind, während funktionelle Kandidatengene derartige Gene verkörpern, deren Genprodukte signifikant an der Merkmalsausprägung beteiligt sind (Schwerin 2000).

Ein Vorteil des Kandidatengen Ansatzes besteht in der Möglichkeit die gefundene Assoziation direkt in der Zuchtpopulation zu nutzen und in der Identifikation des Genes, welches die kausale Mutation trägt. Im Unterschied zu genomweiter QTL-Kartierung, die oft nur Kopplung innerhalb Familien aufzeigt, kann bei einer kausalen Mutation direkt auf den Nukleotid Polymorphismus hin getestet werden. Die aufgrund der großen Anzahl von Kandidaten potentiell geringe Rate eine Kandidatengen Assoziation zu finden, kann durch die sehr enge Kopplung von Polymorphismen in einem Gen ausgeglichen werden (Rothschild & Soller 1997). So sind oft Nukleotid Polymorphismen wie SNP oder RFLP, wenn auch nicht als kausale Mutation, höchst effektiv über Populationen hinweg als Marker nutzbar. Zum Kandidatengenansatz beim Rind eignen sich im besonderen Maße auf Grund der hohen Konservierung von Genomregionen zwischen Spezies Erkenntnisse aus der homologen Kartierung anderer Mammalia. Kartierung bei Mensch und Maus kann durch ihre sehr viel größere Dichte helfen Kandidatengene für Nutztier-QTL zu finden. Veranschaulicht wird dies durch die Geschichte der Kartierung des MH-Locus beim Rind auf das centromerische Ende von *BTA2* (Charlier *et al.* 1995). Casas *et al.* (1998) konnten die Kartierung anschließend weiter auf eine Region von 4 cM eingrenzen. McPherron *et al.* (1997) zeigten, dass eine Deletion im Myostatin Gen der Maus (GDF-8) zu einer extremen zellulären Hyperplasie ähnlich der Doppellenderbemuskelung beim Rind führt. Die Sequenz des Myostatin Gens der Maus konnte daraufhin erfolgreich genutzt werden die ursächlichen Mutationen im Myostatin Gen des Rindes zu finden und dieses auf *BTA2*q11-q12 zu kartieren (Grobet *et al.* 1997, Smith *et al.* 1997).

2.4 *Bos taurus* Autosom 14 (*BTA14*)

Obwohl QTL für Milchleistungsparameter bereits auf allen 29 Autosomen des Rindengenoms beschrieben wurden, fokussiert doch die Mehrzahl der Literaturbeiträge über bekannte Milchleistungs-QTL auf drei Chromosomen (URL 46). Unter diesen weist *BTA14*, gemeinsam mit *BTA6* und *BTA20*, die QTL mit den genomweit größten Effekten für Milchleistung auf. Insgesamt wurden über 40 Untersuchungen publiziert mit Berichten von 126 QTL, die über das gesamte Chromosom *BTA14* verteilt sind (Wibowo *et al.* 2008).

2.4.1 Kandidatengene auf *BTA14*

Ein Kandidatengenansatz kann in hohem Maße von komparativer Genetik profitieren. Durch die vergleichende Genomanalyse kann von dichteren humanen und murinen Genkarten Nutzen gezogen werden und bei der Segregation bestimmter Gen-Marker-

Kombinationen können beim Menschen oder der Maus bereits sequenzierte Gene in Markernähe beim Nutztier untersucht werden. Im selben Maße bieten Mausmodelle, die in der humanen Forschung als transgene oder knock-out Mausmodelle erstellt werden Möglichkeiten, analoge Sachverhalte beim Nutztier zu analysieren (Darvasi 1998). In der Literatur lassen sich Quellen für Mausmodelle mit Analysen von Laktation (Smith *et al.* 2000), Körpergewicht (Brockmann & Bevova 2002, Diament *et al.* 2004, Stylianou *et al.* 2004), Wachstum (Wolf *et al.* 2002), Verhalten (Miner *et al.* 1993, Turri *et al.* 2001, Reif & Lesch 2003), Krankheitsresistenz (Caron *et al.* 2002) und Parasitenresistenz (Iraqi *et al.* 2003) finden.

2.4.2 CYP11B1-Gen

Genetische Untersuchungen an *CYP*-Gen (P450) Unterfamilien waren bislang limitiert durch typische Schwierigkeiten, die sich ergeben, wenn Gene einen Teil einer Gruppe mit extrem ähnlichen Loci darstellen. Aus diesem Grund wurde die überwiegende Mehrzahl der P450 Gene bislang über cDNA Sequenzierungen beschrieben (Hoffman *et al.* 2001). Einzelne genomische Sequenzen dieser sehr ähnlichen Genfamilie konnten nur durch Subklonierungstechniken erzielt werden. Neuerlich verfügbar werdende Ganzgenom-Sequenzen stellen eine lang erwartete Hilfe für diesen Sachverhalt dar.

Die Biosynthese von Steroidhormonen in der Nebennierenrinde benötigt vier unterschiedliche Cytochrom-Gene (Mathew *et al.* 1990). Davon sind *CYP11A* und *CYP11B* Enzyme diejenigen, die in der inneren mitochondrialen Membran, sowie *CYP21* und *CYP17A* Enzyme solche, die in der Membran des Endoplasmatischen-Reticulums lokalisiert sind (Omura *et al.* 1993). *CYP11B1* katalysiert bei Rind, Schaf und Schwein mit seinem Genprodukt 11 β -Hydroxylase [EC:1.14.15.4] das Ende des biosynthetischen Entwicklungsweges der Steroide von Cholesterol zu Mineralocortikoiden und Glucocortikoiden in der Nebennierenrinde (NNR). Bei Rind, Schaf und Schwein katalysiert somit ein Enzym unterschiedliche Steroidhormone (Ogishima *et al.* 1989). Demgegenüber kam es im Laufe der Entwicklung in anderen Arten, so auch bei Mensch und Nagetieren zu einer funktionalen Genverdopplung und einer anschließenden Funktionsdifferenzierung zwischen den entstandenen Zwillingsgenen (Bureik *et al.* 2002).

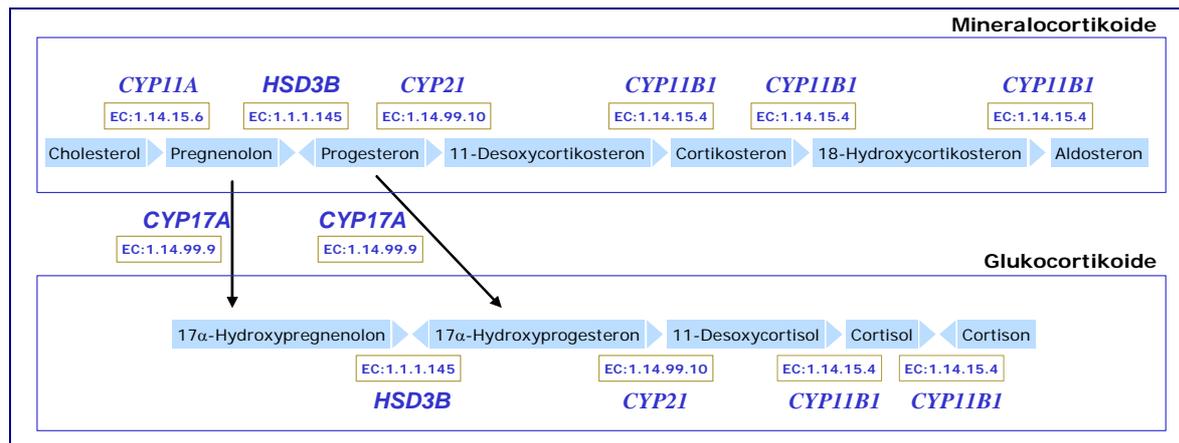


Abbildung 2.17: Biosynthetischer Entwicklungsweg von Mineralocorticoiden und Glucocorticoiden in der Nebenniere des Rindes. Ausgehend von Cholesterin sind die C21-Hormone bis zum Aldosteron (Mineralocorticoid) und Cortison (Glucocorticoid) blau unterlegt. Das zu jedem Entwicklungsschritt notwendige Enzym ist mit seiner EC-Nummer der IUBMB Enzym Nomenklatur dargestellt. Im Einzelnen sind EC: 1.14.15.6 Cholesterin monooxygenase (C27-side chain cleavage enzyme), EC: 1.1.1.145 3beta-hydroxy-delta5-steroid dehydrogenase, EC: 1.14.99.9 steroid 17alpha-monooxygenase, EC: 1.14.99.10 steroid 21-monooxygenase, EC: 1.14.15.4 steroid 11beta-monooxygenase. Die Grafik wurde erstellt aus Daten der Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes KEGG (URL: 10).

Beim Menschen entwickelte sich das *CYP11B* Gen in zwei (Kawamoto *et al.* 1992, Muller 1998) und bei Nagetieren in drei (Mellon *et al.* 1995, Bülow *et al.* 1996) unterscheidbare Isoformen (*CYP11B1*, *CYP11B2*, *CYP11B3*) mit funktionaler Differenzierung. Bei Schwein, Schaf und Rind blieb die funktionale Einheit im *CYP11B* Gen erhalten (Bülow *et al.* 1996, Muller 1998), obwohl Duplikationen auch in diesen Spezies sich ereignet haben müssen, da *CYP11B* Pseudogene in allen Säugetieren zu finden sind (Bülow *et al.* 1996, Muller 1998). *CYP11B1* übernimmt beim Rind im Unterschied zum Mensch zusätzliche Funktion durch Katalyse von sowohl Aldosteron als auch Cortisol, da es hier zu keiner funktionalen Genverdopplung (*CYP11B1* und *CYP11B2* bei Mensch und Nagetieren) gekommen ist (Ogishima *et al.* 1989). Broad *et al.* (1995) schlossen durch homologe Kartierung vom Schaf (OAR 9), dass das bovine Gen auf *BTA* 14 lokalisiert sein muss und Schibler *et al.* (1998) kartierten dieses Gen auf Chromosom 14 in der Ziege. Kaupe *et al.* (2004b) kartierten *CYP11B* beim Rind auf *BTA* 14q12 durch Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH). Da die homologen Gene des bovine *CYP11B* beim Menschen (*CYP11B1*, *CYP11B2*) auf *HSA* 8q21-23 kartieren (Wagner *et al.* 1991, Taymans *et al.* 1998), kann dieses Gen als ein positionelles Kandidatengen für den Milchleistungs-QTL auf Chromosom 14 beim Rind angesprochen werden. Da dieses Gen über den Weg des Kohlenwasserstoff- und Aminosäure-

metabolismus in den Energiehaushalt involviert ist (Wierda *et al.* 1987, Friedman *et al.* 1993, Shpigel *et al.* 1996), kann es ebenso als ein funktionelles Kandidatengen für Milchproduktion angesehen werden.

Durch Proteinaufreinigung konnten drei unterschiedliche Formen *CYP11B* (*P45011β*) in der Nebennierenrinde des Rindes identifiziert werden: Isoenzym 1 mit den Genbank Zugangsnummern A28415, AAA83383, BAA00127 (Ogishima *et al.* 1983, Chua *et al.* 1987, Morohashi *et al.* 1987), Isoenzym 2 mit den Genbank Zugangsnummern P15150, JX0071, 1508213A (Morohashi *et al.* 1987, Kirita *et al.* 1988, Chua *et al.* 1987, Hashimoto *et al.* 1989) und Isoenzym 3 mit den Genbank Zugangsnummern JX0151, BAA00268 (Kirita *et al.* 1988, Kirita *et al.* 1990).

Tabelle 2.5: Aminosäure-Austausche in bovinen *CYP11B* Isoenzymen, zusammengestellt nach NCBI Genbank Einträgen. Genbank Acc Nummern sind I: A28415, II: AAA83383, III: BAA0127, IV: P15150, V: JX0071, VI: 1508213A, VII: JX0151, VIII: BAA00268. Die AS Positionen sind nach der Struktur des unreifen Proteins, vom Translationsstart (ATG) aus gezählt.

Aminosäuren- position im Protein	Aminosäuren							
	<i>CYP11B</i> - Isoenzym-1			<i>CYP11B</i> - Isoenzym-2			<i>CYP11B</i> - Isoenzym-3	
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
30	A	A	A	A	A	A	V	V
60	G	G	S	S	S	S	G	G
102	O	O	O	O	O	E	O	O
106	H	H	H	H	H	H	R	R
132	L	L	L	L	L	-	L	L
179	N	N	N	N	N	D	N	N
187	D	D	G	D	D	D	D	D
188	I	I	H	I	I	I	I	I
189	A	A	R	A	A	A	A	A
190	P	P	A	P	P	P	P	P
191	R	R	O	S	S	S	S	S
192	L	L	L	V	V	V	V	V
335	E	E	E	E	E	O	E	E
337	O	O	O	O	T	T	T	O
477	E	E	E	E	E	O	E	E
502	I	I	I	I	Y	Y	I	I

Im Einzelnen ist beim Rind die 11β-hydroxylase (*CYP11B*) das Enzym, welches beide, die 11β- und 18-Hydroxylierung der Corticosteroide katalysiert (Ogishima *et al.* 1989, Muller 1998) und auf diese Weise Cortisol- und Aldosteronsynthese ermöglicht. Das Wirkspektrum von Cortisol ist sehr weitläufig. Die Sekretion von Cortisol in der Nebennierenrinde ist für die Induktion von mehreren gluconeogenetischen Enzymen notwendig, die es Tieren ermöglichen Stress zu überleben (Engelbrecht & Swart 2000). Steroidhormone sind physiologische Regulatoren, und Cortisol gemeinsam mit anderen

gehört zu den Haupthormonen der Lipogenese und Lipolyse, die die Konzentration von Fettsäuren in Plasma und Geweben kontrollieren (Bhathena 2000). Durch Einflussnahme auf anabolisches Potential kann Cortisol Wachstum verlangsamen, wenn es in erhöhter Menge in der Zelle produziert wird (Weiler *et al.* 1998). Cortisol wurde erfolgreich verabreicht, um Milchdrüsendifferenzierung in Mäusen aufrecht zu erhalten (Casey *et al.* 2000).

Mineralocorticoide sind essenzielle Steroidhormone bei Säugetieren, die Natrium- und Kaliumionenabscheidung in den Nieren regulieren (Imai *et al.* 1998). Beide Hormone besitzen Auswirkungen auf die Volumen-/Elektrolyt-Homeostase und den Glucose-/Fettstoffwechsel (Kirita *et al.* 1988, Bülow & Bernhardt 2002). Mathew *et al.* (1990) berichten von AS Austauschen P66L und S126P beim Rind. Diese Austausche verhindern sowohl die Cortisolsynthese als auch die Aldosteronsynthese.

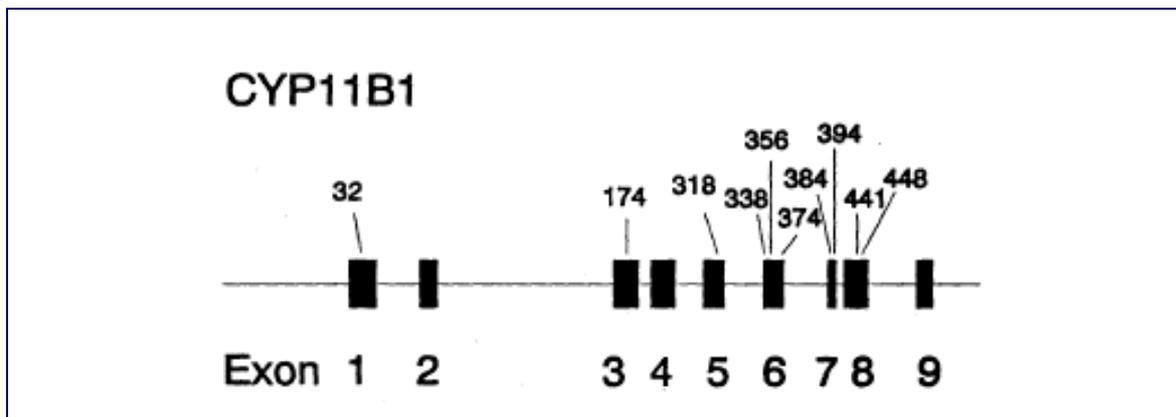


Abbildung 2.18: Bovines CYP11B und humanes *CYP11B1* sind orthologe Gene. Das Diagramm zeigt Nukleotidpositionen im humanen *CYP11B1* Gen, deren Mutation nachweislich 11 β -hydroxylase Mangel verursachen. Sieben Mutationen (T318M, Q338X, Q356X, R374Q, i394, V441G, R448H) treten in homozygoter Form auf, drei Mutationen (Δ C32, K174X, R384Q) in heterozygoter Form (Curnow *et al.* 1993).

2.4.3 GML-Gen

Das *GML* Gen besitzt vier Exone und kartiert beim Menschen auf *HSA* 8q24.3 (Kimura *et al.* 1997a). Sein Produkt gehört zur Gruppe der durch Glycosylphosphatidylinositol (GPI) verankerten Zelloberflächenmoleküle. Derartige Moleküle werden für wichtige physiologische Funktionen benötigt, wie Zelle-Zelle Erkennung, Zellanheftung, Rezeptoren sowie Nährstoff- und Ionentransport (Udenfriend & Kodukula 1995). GPI-Verankerung stellt einen generellen Mechanismus dar, Proteine der Zelloberflächen-Membran anzuheften. Dieses Verankerungssystem wird von allen Säugetierzelltypen genutzt (Takeda & Kinoshita 1995, Udenfriend & Kodukula 1995). Zwei weitere Gene die

ebenso für GPI-verankerte Moleküle kodieren, E48 und LY6E, sind in der unmittelbaren genomischen Region lokalisiert. Das GPAA1 Gen kartiert ebenso in die QTL-Region, sein Produkt ist das Glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor attachment Protein (URL30). Der gesamte Gencluster liegt mit weniger als 0,5 cM Abstand im synthenischen Bereich der QTL-Region des Rindes. Die Expression des GML Gens wird durch das tumorsuppressor Gen p53 reguliert (Kagawa *et al.* 1997) und die p53-Bindestelle befindet sich in seiner 5'-Region. Von einigen der GPI-verankerten Moleküle ist eine Beteiligung an interzellulärer Signalübertragung bekannt, durch Interaktionen mit Tyrosin Kinasen und Phosphatasen (Stefanova *et al.* 1991). Derartige Gene finden sich ebenso in der QTL-Region: Am centromerischen Ende von *BTA14* lokalisiert das *PTK2* Gen, eine Protein-Tyrosin-Kinase, sowie das *PTP4A3* Gen, eine Protein-Tyrosin-Phosphatase.

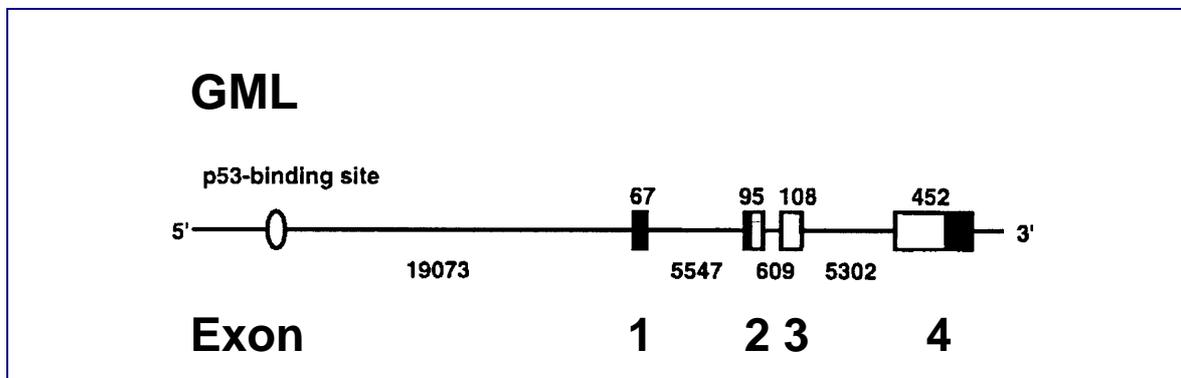


Abbildung 2.19: Schematische Darstellung der genomischen Organisation des humanen *GML* Gens. Exone und Introne sind jeweils durch Kästchen und horizontale Linien dargestellt. Schwarze Bereiche sind nicht kodierend, weiße Bereiche symbolisieren den offenen Leserahmen (Kimura *et al.* 1997a).

2.4.4 *DGATI*-Gen

Das *DGATI*-Gen verkörpert in der Nutztierzucht das rezente Beispiel eines Kandidatengens mit Auswirkung auf Leistungsmerkmale beim Rind, welches durch komparative Genetik erfolgreich identifiziert werden konnte (Grisart *et al.* 2002, Winter *et al.* 2002). Smith *et al.* (2000) stellten durch ein knock-out Mausmodell (B6.129S4-Dgat1^{tm1^{Far}}/J) fest, dass Mäuse mit defekten *DGATI*-Genen nicht laktieren können. Die Position des *DGATI* Gens auf den synthenischen Chromosomenabschnitten von Maus (*MMU15*) und Mensch (*HS48*) zur QTL-Region beim Rind in der centromerischen Region von *BTA14* machte es zu einem sehr wahrscheinlichen positionellen Kandidatengens. Die zentrale Rolle des Gens in der Lipidsynthese machte es darüber hinaus zu einem physiologischen Kandidatengens.

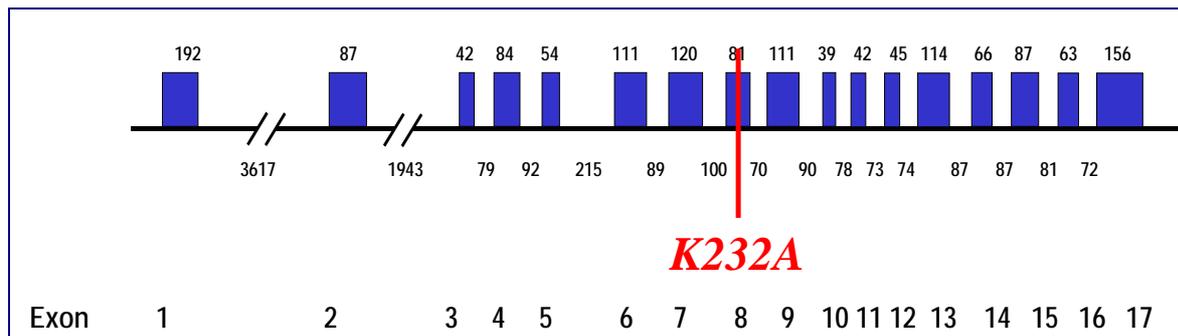


Abbildung 2.20: Schematische Darstellung der genomischen Organisation des bovinen *DGATI* Gens. Exone und Introne sind jeweils durch gefüllte Kästchen und Zwischenräume dargestellt, ihre Größen sind in bp angegeben. Die Lysin/Alanin-Substitution in Exon 8 ist eingezeichnet (Winter *et al.* 2002).

In der Literatur finden sich Beiträge von Assoziationsstudien der K232A Substitution im *DGATI* Gen. Niederländische und neuseeländische Holsteins (Grisart *et al.* 2002), neuseeländische Schwarzbunte (Spelman *et al.* 2002), deutsche Holstein- und Fleckvieh (Thaller *et al.* 2003), israelische Holstein- (Weller *et al.* 2003), deutsch/französische Holstein- (Bennewitz *et al.* 2003) sowie deutsche Holstein- (Bennewitz *et al.* 2004) Populationen wurden bislang untersucht. Für *DGATI*^K (Q-Allel) stellten alle Autoren gleichgerichtete Effekte fest, so dass mit jedem weiteren *DGATI*^K die Fettmenge erhöht und die Proteinmenge und Milchmenge reduziert ist. Die Höhe des durchschnittlichen Allelsubstitutionseffektes ($\alpha/2$) liegt zwischen Rassen nicht immer in vergleichbarer Größenordnung und beträgt für neuseeländische Jerseys -110,00 kg, neuseeländische Holsteins -133,00 kg und neuseeländische Ayrshires -202,00 kg (Spelman *et al.* 2002). Thaller *et al.* (2003) fanden durchschnittlich 107,00 kg für Fleckvieh und 146,00 kg für deutsche Holstein in den ersten drei Laktationen. *DGATI*^K Effekte führen demnach, wie in Tabelle 2.6 gezeigt, zu erhöhten Milchfett- und Milchproteinprozenten, jedoch aufgrund einer reduzierten Milchmenge nur bei Fettmenge zu einer Erhöhung und bei Proteinmenge zu einer Reduktion.

Der von Winter *et al.* (2002) beschriebene PCR-RFLP Gentest durch PCR-Amplifikation eines 411 bp großen, die K232A-Substitution enthaltenden Genfragments und anschließendem Restriktionsverdau mit Enzym *CfrI* bzw. *EaeI* (Y▼GGCCR) ermöglicht es, Rinder auf Allelvarianten zu testen und anschließend nach Allelvarianten zu selektionieren. Der jeweilige Vorteil der unterschiedlichen Allele hängt jedoch von ökonomischen Gewichtungen der Milchproduktionsmerkmale im Zuchtziel ab. Spelman *et al.* (2002) konnte zeigen, dass unter momentanen neuseeländischen Marktbedingungen sich der ökonomische Nutzen eines *DGATI*^K und des *DGATI*^A gegenseitig aufheben.

Tabelle 2.6: *DGATI*^K Allelsubstitutionseffekte $\alpha/2$ (definiert wie in Falconer & Mackay 1996) anderer Autoren, für Milchleistungsmerkmale in Holstein Rindern.

Autoren	<i>DGATI</i> ^K				
	$\alpha/2$ Milch kg	$\alpha/2$ Fett kg	$\alpha/2$ Prot. kg	$\alpha/2$ Fett %	$\alpha/2$ Prot. %
Grisart <i>et al.</i> 2002 (Ø 1-3 Lakt.)	-158,00	+5,23	-2,82	+0,17	+0,04
Thaller <i>et al.</i> 2004 (Ø 1-3 Lakt.)	-146,00	+4,85	-2,51	+0,14	+0,03
Spelman <i>et al.</i> 2002	-133,00	+5,92	-2,40	---	---
Bennewitz <i>et al.</i> 2003 (Ø 1-3 Lakt.)	-153,00	+4,14	-2,46	+0,14	+0,03
Weller <i>et al.</i> 2003	-153,00	+3,70	-1,55	+0,08	+0,03
Bennewitz <i>et al.</i> 2004 (Ø 1-3 Lakt.)	-136,00	+3,26	-3,20	+0,13	+0,03
de Roos <i>et al.</i> 2007	---	---	-4,6	+0,35	---

Von *DGATI* wird, gemeinschaftlich mit dem Thyroglobulinen (*TG*), ein Einfluss auf den intramuskulären Fettgehalt (IMF) beim Rind vermutet (Barendse 2002, Thaller *et al.* 2003). Beide Gene kartieren an das proximale Ende von *BTA14*. Für beide Gene ergeben sich Hinweise auf einen rezessiven Erbgang, d.h. ein positiver Effekt ist vor allem dann festzustellen, wenn die vorteilhafte Variante reinerbig vorliegt (Thaller & Fries 2004, Thaller *et al.* 2003). Der Einfluss des *DGATI* Gens auf intramuskuläres Fett (IMF) in Fleischrindern wird jedoch diskutiert. Thaller *et al.* (2003) berichten von einem signifikanten Effekt des *DGATI* Gens auf intramuskulären Fettgehalt der Rücken- und Unterschalenmuskulatur (*Musculus longissimus dorsi*, *Musculus semitendinosus*) in Holstein und Charolais Rindern. Kämmerer *et al.* (2008) analysierten den IMF-Gehalt der Rückenmuskulatur (*Musculus longissimus dorsi*) in Populationen von Fleckvieh Bullen, gepoolt für hohe und niedrige Zuchtwerte für intramuskuläres Fett und konnten in keiner der Gruppen signifikante Genwirkung für *DGATI* nachweisen. Casas *et al.* (2005) verifizierten den Einfluss des *DGATI* Gens auf die Variation des IMF-Gehalts der Muskulatur von Brahman Kälbern (*Bos indicus*). Auch diese Untersuchung konnte keinen Einfluss nachweisen. Demgegenüber fanden Gill *et al.* (2009) in einer Untersuchung der Aberdeen Angus Rasse ein erhöhtes Gewicht der Rückenmuskulatur (*Musculus longissimus dorsi*), sowie erhöhte Fettummantlung dieser Muskulatur (intermuskulärer Fettgehalt) bei Rindern, homozygot für *DGATI*^A.

Acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase 1 [EC:2.3.1.20] ist das Genprodukt des *DGATI* Gens (Genbank AY065621, AJ318490). Dieses Enzym nutzt Diacylglycerol und Fatty-Acyl-CoA als Substrate um den letzten Schritt der Triacylglycerol-Synthese zu katalysieren. Triglyceride stellen das wichtigste Energiespeichermolekül im Organismus

dar. Das *DGATI* Genprodukt ist ebenso involviert in zelluläre als auch physiologische metabolische Prozesse.

2.5 Haustierzucht unter molekulargenetischen Aspekten

In den vergangenen Jahren wurde eine Fülle genetischer Marker, die sich in Kopplung mit QTL befinden und Merkmale mit ökonomischer Bedeutung beeinflussen, im Rindengenom kartiert (Georges *et al.* 1995, Kappes *et al.* 1997, Barendse *et al.* 1997, Zhang *et al.* 1998, Schrooten *et al.* 2000, Van Tassel *et al.* 2000, Plante *et al.* 2001, Nadesalingam *et al.* 2001, Grisart *et al.* 2002). Das Ansammeln derart hochgradiger, qualifizierter genotypischer Information setzte Bemühungen in Gang, Nutztiere nicht mehr ausschließlich über ihre messbare phänotypische Leistung und unter Berücksichtigung ihres Pedigrees zu selektieren, sondern zu untersuchen, in wie weit Markerinformation und QTL-Feinkartierungsergebnisse sinnvoll als weitere Selektionsinformation genutzt werden kann (de Roos *et al.* 2007).

2.5.1 Marker gestützte Selektion (MAS)

Die Entstehung der Hochleistungsrasen beim Milchrind im vergangenen Jahrhundert war im Wesentlichen gekennzeichnet durch eine Selektion auf wenige gut messbare Merkmale (Milch- und Fettmenge, Exterieurmerkmale). Derartige Merkmale besitzen in der Regel Heritabilitäten (h^2) von 0,3 bis 0,4.

Mit dem bis 1940 angesammelten genetisch-statistischen Wissen entwickelten Lush und Hazel die Grundsätze der Index-Zucht, um die künstliche Selektion, basierend auf bekannten Beziehungen zwischen Individuen und phänotypischer Merkmalinformation zu optimieren. Dabei erwies sich die Index-Zucht als eine äußerst effiziente und flexible Methode für die praktische Züchtung von Pflanzen und Tieren (Weller, kein Datum). Jedoch war die traditionelle Selektion innerhalb Populationen nicht immer effektiv, wenn Zuchtziele zum Beispiel Merkmale mit negativen Korrelationen wie Milchmenge und Proteinprozent beinhaltete (Schwerin *et al.* 1995) oder geringe Heritabilitäten wie Fruchtbarkeitsmerkmale und Krankheitsresistenzen besaßen (Weller 2001). Aufgrund veränderter ökonomischer Produktionsbedingungen muss heute das Leistungsspektrum eines Nutztieres jedoch weiter gefasst werden. Auf diese Weise finden in heutigen Zuchtzielen auch Merkmale mit geringen Heritabilitäten ($h^2 \leq 0,1$) Eingang. Schlecht messbare Merkmale wie Parasitenresistenz und allgemeine Konstitution, ebenso wie Merkmale, die vor der ersten Selektionsgelegenheit oder am lebenden Tier nicht messbar sind, wie Langlebigkeit, Nutzungsdauer oder Schlachtkörper-Merkmale erlangen

zunehmend ökonomische Bedeutung (VIT 2010). Klassische Selektion anhand der gemessenen Phänotypen favorisiert Individuen oder Populationen mit dem besten Gesamtergebnis und übersieht untergeordnete Qualitätsstufen mit möglicherweise wertvollen Einzelgenen.

Mehrere in der Fachliteratur veröffentlichte Simulationsstudien haben zum Inhalt, dass MAS die Rate der genetischen Antwort in einem Rahmen von 5 % bis 64 % in Tierzuchtpopulationen steigern kann, dies jedoch in Abhängigkeit von Selektionsmerkmal und Marker - und QTL- Informationen (Ruane & Colleau 1995, Meuwissen 2003, Hayes & Goddard 2003). Obwohl die Schätzungen der Substitutionseffekte von erkannten QTL generell eine Tendenz zur Überschätzung in sich bergen (Goring *et al.* 2001), wird von einigen Autoren (Kashi *et al.* 1990, Mackinnon & Georges 1998, de Roos *et al.* 2007) die Ansicht vertreten, dass die Mehrzahl der gefundenen QTL von ausreichender Mächtigkeit seien, um sie zur Nutzung in der markergestützten Selektion in Betracht ziehen zu können, vor allem bei der Vorselektion von Jungbullen, die in die Nachkommensprüfung eintreten aber auch in der Zuchtwertschätzung.

Weltweit werden heute mehr als 80 % der Besamungsbullen auf dem Weg des Embryotransfers (ET) erzeugt (Roschlau 2005). Bei der Nutzung genetisch überlegener Eltern zur Erzeugung der nächsten Generation durch gezielte Paarungen von Elitebullen und Elitekühen, entstehen unter Nutzung von multipler Ovulation mit anschließendem Embryotransfer Vollgeschwistergruppen. Speziell hier kann durch MAS auf den Besitz favorabler Genvarianten hin getestet und differenziert werden, um dadurch kostenträchtige Nachkommensprüfungen effektiver zu gestalten (Georges *et al.* 1995). Bereits durch den Einsatz von MAS bei Embryonenselektion ist die Möglichkeit gegeben, ein solches Ziel zu erreichen, so dass zur Erzeugung einer weiteren Generation keine geschlechtsreife, fortpflanzungsfähige Generation erstellt werden muss (Georges & Massey 1991, Haley & Visscher 1998).

Zukünftig könnte MAS den jährlichen genetischen Zuwachs in der Milchrinderzucht durch Zuwächse in der Selektionsgenauigkeit und der Selektionsintensität, sowie einer Verringerung des Generationsintervalls bereichern (Weller 2001). Bislang kam zusätzliche Information durch genetische Marker hauptsächlich der Selektionsgenauigkeit zugute, so dass in MAS - Zuchtprogrammen Zuchtfortschritt in erster Linie auch durch erhöhte Selektionsgenauigkeit erzeugt werden kann. Aktuelle Zuchtprogramme sind jedoch derart konzipiert, dass Selektionsgenauigkeit bereits sehr hoch ist, so z.B. bei Nachkommen-

prüfungen um 80 - 90 % (Powell *et al.* 2003). Aufgrund dessen eignet sich MAS vor allem für Merkmalskomplexe wo die Genauigkeit der konventionellen Selektion gering ist.

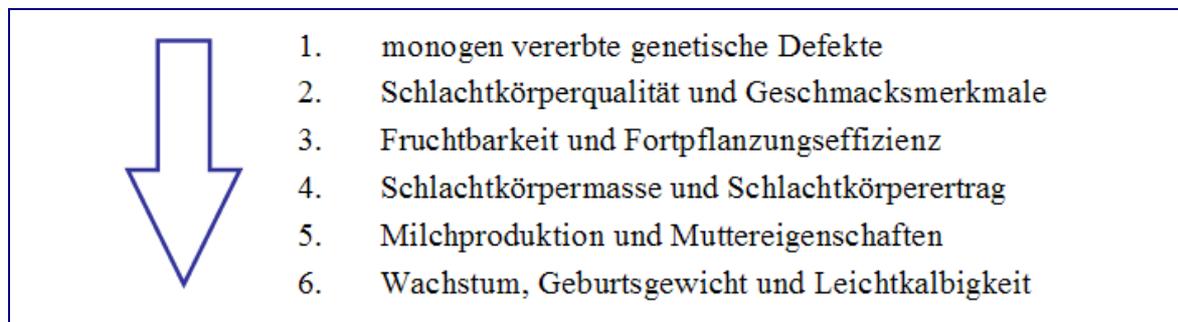


Abbildung 2.21: Selektionskriterien beim Rind in absteigender Reihenfolge des größten bis geringsten Nutzens von markergestützter Selektion (MAS) nach van Eenennaam (2004).

Die Integration von MAS in bestehende Selektionssysteme macht aber auch dort Sinn, wo trotz hoher Selektionsgenauigkeit aufgrund von Nachkommensprüfungen Generationsintervalle sehr groß sind und dadurch Zuchtfortschritt reduzieren. So besteht durch MAS von Jungtieren oder Embryonen die Möglichkeit das Zeitintervall einer Generation beträchtlich zu verkürzen. Nach Meuwissen (2003) kann Zuchtfortschritt (ΔG) in Nutztierzuchtprogrammen definiert werden wie in Abbildung 2.22 beschrieben. Sie zeigt, dass bei einer Verkürzung des Generationsintervalls um die Hälfte, bei gleich bleibender Selektionsgenauigkeit sich der Zuchtfortschritt verdoppelt (Meuwissen 2003).

$$\Delta G = \frac{\text{Selektionsintensität} \cdot \text{Selektionsgenauigkeit} \cdot \text{genetische Standardabweichung}}{\text{Generationsintervall}}$$

Abbildung 2.22: Formale Definition des Zuchtfortschritts (ΔG) nach Meuwissen (2003).

In der Literatur vorgeschlagene Nutzungsmöglichkeiten von Marker gestützter Selektion (zusammengestellt nach Weller 2001) in der Tierzucht umfassen sechs Punkte:

- 1) In einem standardisierten Nachkommen Testsystem mit Informationen aus genetischen Markern, um die Genauigkeit der Vater Bewertung zu verbessern, zusätzlich zu phänotypischen Information von Tochter Datensätzen (Meuwissen & Arendonk 1992).
- 2) In einem 'Multiple Ovulation and Embryo Transfer' (MOET) Nukleuszuchtschema, in dem Markerinformation genutzt wird, um Vererber für den Zuchteinsatz in der MOET Population zu selektieren, zusätzlich zu phänotypischen Informationen aus Halbschwestern (Meuwissen & Arendonk 1992).

- 3) In Nachkommen Testsystemen, in denen Information von genetischen Markern genutzt wird, um junge Vererber für die Teilnahme am Nachkommentest vorzuselektieren (Kashi *et al.* 1990).
- 4) Bei der Selektion von Bullenvätern ohne Nachkommentest, basierend auf Halbgeschwisterdaten und genetischen Markern (Spelman *et al.* 1999).
- 5) Bei der Selektion von Bullenvätern in einem Halbgeschwisterschema, basierend auf Halbgeschwisterdaten und genetischen Markern (Spelman *et al.* 1999).
- 6) Der Einsatz genetischer Marker bei der Abstammungskontrolle (Israel & Weller 2000).

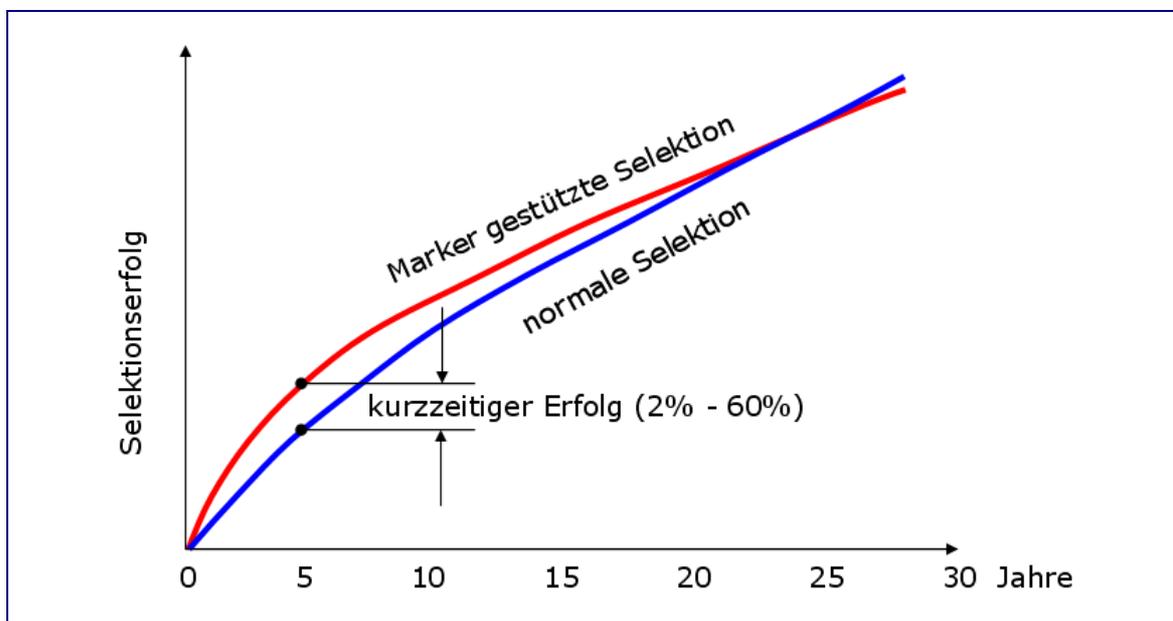


Abbildung 2.23: Markergestützte Selektion (MAS) kann kurzzeitig die Rate der genetischen Antwort in einem Rahmen von 2% bis 60% in Tierzuchtpopulationen steigern (Kinghorn & van der Werf 2000).

Auf lange Sicht nimmt der Selektionsfortschritt bei markergestützter Selektion (MAS) ab, da der QTL, der sich in Kopplung mit dem Marker befindet, in der Rasse fixiert wird, sodass danach eine Selektion auf dieses Allel nicht mehr möglich ist (Goddard & Wiggans 1999). Da aber sowieso jegliche Selektion diesen Weg beschreiten würde, könnte MAS den Zeit- und Kostenrahmen in der Tierzucht positiv beeinflussen. Tests für den QTL selbst an Stelle des gekoppelten Markers ermöglichen einen noch forcierteren genetischen Fortschritt, da hierbei eine Datenerhebung für die Kopplungsphase unnötig ist. Deshalb wäre der ideale Marker für MAS und MAI ein Gen mit einer kausalen Mutation selbst oder ein Fragment daraus, welches für das Merkmal von Interesse kodiert, so dass die Selektion

auf den Marker immer den erwarteten Genotyp erbringt (Simm 1998). Wenn auch der Einsatz von MAS zur Erhöhung des Zuchtfortschrittes bei Produktionsmerkmalen eine rezente Neuerung in der Tierzucht darstellt, kann sie bei der Selektion von Besamungsbullen bereits seit längerem erfolgreich zur Vermeidung einer Transmission von Erbfehlern angewandt werden (Herzog 1992). So werden heute bekannte Erbfehler wie Citrullinämie (Dennis *et al.* 1989), DUMPS (Deficiency in Uridine Monophosphate Synthase) (Schwenger *et al.* 1993), WEAVER (Progressive bovine myeloencephalopathy) (Georges *et al.* 1993), BLAD (Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency) (Shuster *et al.* 1992), MD (Myophosphorylase Deficiency) (Bilmstrom *et al.* 1998), CVM (Complex Vertebral Malformations) (Agerholm *et al.* 2001) und weitere bei Besamungsbullen systematisch mit Gentests überprüft.

Mit dem Forschungsvorhaben Genomanalyse-Rind (I) wurde die Implementierung der markergestützten Selektion im Jahr 1995 für Deutsche Holstein eingeleitet (Szyda *et al.* 2003) und ist seit dem Jahr 2003 voll etabliert (Wilkens *et al.* 2006). Es wird erwartet, dass mit der Identifizierung bzw. Kartierung von QTL mit signifikanten Effekten auf Leistungs- und Qualitätsparameter und durch die Anwendung dieses Wissens im Rahmen der MAS eine weitere Steigerung des Zuchtfortschrittes sowohl für die direkten Produktionsmerkmale als auch für die sekundären Merkmale erreicht werden kann (Schwerin *et al.* 2003).

2.5.2 Zuchtwertschätzung und Selektion unter der Berücksichtigung des gesamten Genoms

Genomische Selektion ist eine Form von markergestützter Selektion. Dabei versucht genomische Selektion (G-Selektion) alle genetische Variation durch eine über das gesamte Genom verteilte Fülle von genetischen Markern zu erklären, ohne sich auf eine Auswahl von Markern zu beschränken, die zur genetischen Varianz beitragen (de Roos *et al.* 2007).

Neuerliche Untersuchungen zeigen einen Vorteil durch die Einbeziehung genetischer Daten (gene assisted selection) oder gesamtgenomischer Daten (genomic selection) zur Zuchtwertschätzung, gegenüber der konventionellen Methode (BLUP). Derartige Ansätze haben den Vorteil einer größeren Genauigkeit, ohne dass kausale Mutationen bekannt sein müssen, um z.B. eine QTL-Wirkung berücksichtigen zu können (de Roos *et al.* 2007). Allerdings weisen Hayes *et al.* (2009) darauf hin, dass die genutzte Referenzpopulation sehr groß sein muss, um genaue genomische Zuchtwerte schätzen zu können. Schätzmodelle, die aus nur einer Rasse abgeleitet werden, schätzen keine genauen

genomischen Zuchtwerte in einer anderen Rasse. Die Autoren sehen aufgrund dessen Schwierigkeiten in der Anwendung von genomischer Selektion in kleinen Rassenpopulationen. Beruht jedoch die Auswahlgruppengröße der genotypisierten Bullengruppen auf gleichen relativen Mengenverhältnissen zur Gesamtpopulation wie bei großen Rassenpopulationen, sollten auch hier gleiche Genauigkeiten erreicht werden können.

Schaeffer (2006) konnte zeigen, dass die überwältigende Fülle der verfügbaren Nachweise genomischer Sequenzvariation, von einer genomweiten SNP Abdeckung mit bis zu 1 cM großen Markerintervallen, klare strategische Vorteile bietet. Da in einer Population, abhängig vom Heterozygotiegrad, bis zu vier Haplotypen pro Markerintervall möglich sind, ergibt sich bei hoher Markerdichte ein großes Potential durch die simultane Schätzung für alle Intervalle in einem Modell, in dem Intervalleffekte Zufallsfaktoren darstellen. Das Aufsummieren der Einzeleffekte pro Haplotyp führt dann, nach der zitierten Untersuchung, zu Genauigkeiten um 80%. Die Gewissheit derart hoher Zuchtwertgenauigkeiten bereits zur Geburt eines Tieres, würde es unter anderem ermöglichen die Kosten der Bullenselektion in erheblichem Umfang zu reduzieren. Villumsen *et al.* (2009) untersuchten die Veränderung der Genauigkeiten genomischer Zuchtwerte über sieben Generationen in einer simulierten Milchviehpopulation und fanden in Abhängigkeit der Heritabilität unterschiedliche Veränderungsraten. Merkmale mit mittlerer Heritabilität ($h^2 = 0,30$) verloren 20 % (93 % → 86 %) und Merkmale mit geringer Heritabilität verloren 45 % (80 % → 69 %) an Genauigkeit im untersuchten Zeitraum. Die Autoren schlugen auf der Grundlage ihrer Ergebnisse Milchrinder Selektionsschemata ohne Nachkommensprüfung für die Dauer von zwei bis drei Generationen vor.

2.5.3 Marker gestützte Introgression (MAI)

Die Bedeutung der markergestützten Selektion in der Tierzucht verdeutlicht sich nicht nur durch die Erhöhung der Effizienz der Zuchtwertschätzung (Fernando & Grossman, 1989) sondern auch durch die Möglichkeit von Introgression züchterisch und wirtschaftlich interessanter Allelvarianten in Populationen und anschließender Rückkreuzung. Introgression kann aber nur dann nachhaltig durchgeführt werden, wenn es möglich ist die Vererbung der Allele am zu introgressierenden Locus sowie im genotypischen Hintergrund zu kontrollieren (van Heelsum *et al.* 1997). Die notwendige Anzahl von Rückkreuzungen, um ein Allel erfolgreich zu introgressieren und anschließend den Ausgangsgenotyp wieder herzustellen, ist abhängig von der Anzahl und Qualität der verwendeten Marker (Hospital *et al.* 1992). Marker Genotypen können auf diese Weise als Unterstützung einer

Selektionsentscheidung zur Anwendung kommen, um die Frequenz wertvoller QTL anzureichern aber auch um ihre Introgression in andere Zuchtlinien zu erreichen (Montgomery & Kinghorn 1997).

In zurückliegender Zeit wurde in der Fleckviehrasse dieser Weg der Zuchtverbesserung gewählt. In Rinder der Produktionsrichtung Milch wurden wertvolle Allele der Red Holstein Rasse zur Steigerung der Milchproduktion introgressiert. Winter *et al.* (2002) konnten in der von ihnen untersuchten Fleckviehpopulation bereits gemeinsame *DGATI* Haplotypen zwischen Holstein und Fleckviehrindern nachweisen.

Durch das Auftreten von natürlich hornlosen Individuen in der Fleckviehrasse konnte durch gezielte Introgression des Polled-Locus in behörnte Herden der Produktionsrichtung Fleisch eine genetisch hornlose Population aufgebaut werden. Drögemüller *et al.* (2005) feinkartierten den Polled-Locus auf *BTA1q12* in einen BAC-Contig von 1 Mb Größe. Über eng gekoppelte Marker wurde an der TiHo-Hannover ein Gentest entwickelt (Wöhlke 2004), der für die Genotypen PP, Pp, pp informativ ist. Derartige Erfolge führten in den zurückliegenden Jahren ebenso zum Aufbau einer genetisch hornlosen Population der Produktionsrichtung Milch. Seit den Auswertungen der Jahresleistungen 2005/2006 haben die ersten genetisch hornlosen Milchkühe der neuen Zuchtrichtung das durchschnittliche Leistungsniveau der Fleckvieh Rasse erreicht (Lunz & Robeis 2007).

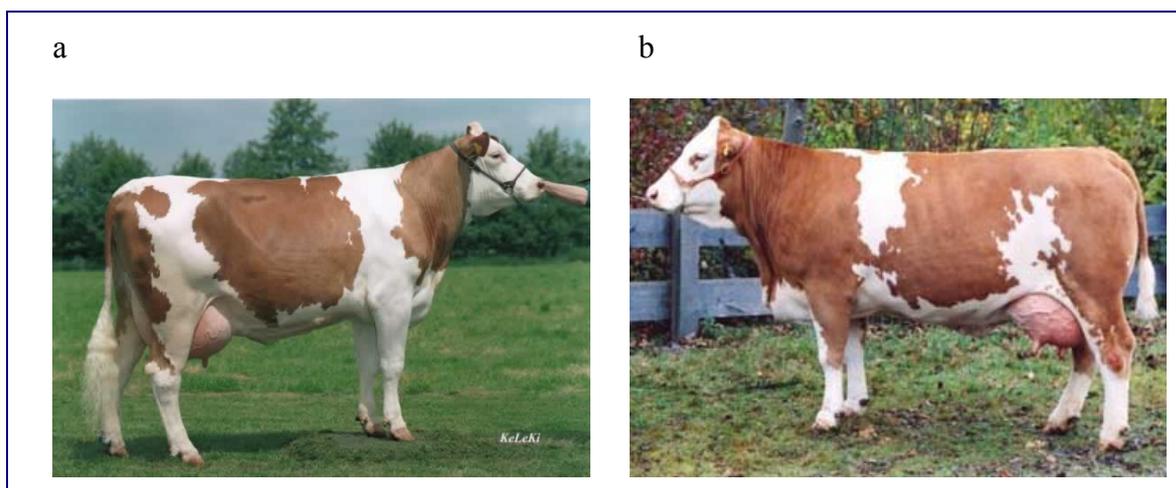


Abbildung 2.24: Weibliche Rinder der Rasse Dt. Fleckvieh (Zuchtrichtung Milch).
a: Fleckvieh Kuh aus der Introgressionszucht mit Red Holstein Genetik zur Steigerung der Milchleistung.
b: Fleckvieh Kuh aus der Introgressionszucht mit genetisch hornlosen Fleckviehbullen (PP) zur Erstellung einer genetisch hornlosen Milchfleckvieh Rasse.
(Fotos & Information: BLT, Grub).

3 Materialien & Methoden

3.1 Materialien

Die in dieser Arbeit verwendeten Materialien wurden von Zulieferfirmen bezogen oder stammten aus den Grundausrüstungen der Labore. Aufgeführte Geräte beziehen sich auf die Ausstattung der Tierzuchtinstitute der Justus-Liebig Universität Giessen und der Technischen Universität München. Radioaktive Arbeiten wurden im Isotopenlabor der TU-München durchgeführt. Gentechnische Arbeiten wurden nach Sicherheitsstufe 1 (S 1) in den dafür zugelassenen Laboren der TU-München und JLU-Giessen durchgeführt.

3.1.1 Verbrauchsmaterialien

Falcon-Tubes	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Handschuhe:	
Safe Skin	Kimberly-Clarke Corp., Roswell, USA
Rotiprotect	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Microtiterplatten 96-well	Corning Costar Deutschland, Bodenheim
Nylonmembran Hybond-N+	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
PCR softstrips 0,2 mL	Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf
Petrischalen	Sarstedt AG & Co, Nürnbrecht
Pipettenspitzen:	
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co, Nürnbrecht
Pipettenspitzen mit Aerosolfilter	Fisher Scientific, Nidderau
Reaktionsgefäße:	
0,5 - 15 mL Gefäße	Sarstedt AG & Co, Nürnbrecht
0,5 - 15 mL Gefäße	Eppendorf AG, Hamburg
9 mL EDTA-Monovetten	Sarstedt AG & Co, Nürnbrecht
S&S Faltenfilter	Schleicher & Schnell GmbH, Dassel
Sterilfilter (0,2 µm)	Schleicher & Schnell GmbH, Dassel

3.1.2 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden in *pro analysis* Qualität verwendet.

Aceton	Merck KGaA, Darmstadt
Acrylamid	Biotech Fisher GmbH, Reiskirchen
Acrylamid/Bisacrylamid (29:1, 40%)	Biotech Fisher GmbH, Reiskirchen
Acrylamid/Bisacrylamid (37:1, 40%)	Biotech Fisher GmbH, Reiskirchen
Acrylamid/Bisacrylamid (49:1, 40%)	Applichem GmbH, Darmstadt
Agar	USB United States Biochemicals Inc., Cleveland, OH, USA
Agarose	AGS Angewandte Gentechnologie Systeme GmbH, Heidelberg
Agarose	Applichem GmbH, Darmstadt
Ammonium Acetat	Merck KGaA, Darmstadt
Ammonium Chlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Ammonium Persulfat (APS)	Merck KGaA, Darmstadt
Ampicillin	Sigma Chemie, St.Louise, MO, USA

Bactotrypton	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Bacto yeast Extrakt	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Borsäure	ICN Biochemicals GmbH, Eschwege
Bovine Serum Albumine (BSA)	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
DAPI	Boehringer GmbH, Mannheim
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Dodecylsulfat-Na-Salz (SDS)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Essigsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Ethidiumbromid	Serva Feinbiochemica GmbH & Co, Heidelberg
Ethylen diamin tetra-acetat (EDTA)	Serva Feinbiochemica GmbH & Co, Heidelberg
Formamid	Applichem GmbH, Darmstadt
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Glycerol	Serva Feinbiochemica GmbH & Co, Heidelberg
Hoechst H 33258	Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt
Lachssperma	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Magnesiumchlorid	AGS Angewandte Gentechnologie Systeme GmbH, Heidelberg
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
Methanol-Eisessig	Merck KGaA, Darmstadt
NaCl	Applichem GmbH, Darmstadt
N,N'-methylenbisacrylamid	Biotech Fisher GmbH, Reiskirchen
N,N,N',N'-Tetramethylendiamin (TEMED)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Perchloroessigsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Phosphorsäure	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Quinacrine mustard	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Sodium dodecyl sulphat (SDS)	Serva Feinbiochemica GmbH & Co, Heidelberg
Salzsäure 37% (HCl)	Serva Feinbiochemica GmbH & Co, Heidelberg
Tris	ICN Biochemicals GmbH, Eschwege
Triton X-100	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Trypton	Applichem GmbH, Darmstadt
Tween20	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Urea	ICN Biochemicals GmbH, Eschwege
Vectashield Mounting Medium	Vektor Laboratories, Burlingam, CA, USA
X-Gal	Gerbu-Biotechnik GmbH, Gaiberg
Xylen cyanol FF	USB United States Biochemicals Inc., Cleveland, OH, USA

3.1.3 Reaktionskits

AutoSeq™ G-50	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	AB Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA
DyeEx 2.0 Spin Kit	Qiagen GmbH, Hilden
E.Z.N.A. Gel Extraction Kit	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Fast Plasmid Mini, 100	Eppendorf AG, Hamburg
GFX Micro Plasmid Prep Kit	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
GIBCO BRL BioNick Labeling System Kit	Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD, USA
Microcon YM-100 MIDI Aufreinigungskit	Millipore GmbH, Eschborn
MinElute Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Montage™ PCR Aufreinigungskit	Millipore GmbH, Eschborn
Nucleobond PC 500 Plasmid MIDI Kit	Macherey-Nagel GmbH & Co KG, Düren
Plasmid MAXI-Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Plasmid MIDI-Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Plasmid MINI-Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QiaEx II Gel Extraktionskit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Wizard SV Gel and PCR Clean-up System	Promega GmbH, Mannheim
Wizard Plus MINI Kit	Promega GmbH, Mannheim
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
TOPO XL PCR Cloning Kit	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Megaprime™ DNA labelling Systems	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg

3.1.4 Enzyme

<i>Klenow</i> Fragment	Promega GmbH, Mannheim
<i>Taq</i> (<i>Thermus aquaticus</i>) Hotstar-/DNA-Polymerase	Qiagen GmbH, Hilden
<i>Taq</i> (<i>Thermus aquaticus</i>) DNA-Polymerase	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
<i>Pwo</i> (<i>Pyrococcus woesei</i>) DNA-Polymerase	AGS Angewandte Gentechnologie Systeme GmbH, Heidelberg
<i>RNAse</i> A	Serva Feinbiochemica GmbH & Co, Heidelberg
<i>Proteinase</i> K	Biometra GmbH, Göttingen
Restriktions Enzyme:	
<i>Bgl</i> I	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Roth
<i>Bgl</i> III	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Roth
<i>Bpu</i> 10I	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Roth
<i>Bse</i> SI	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Roth
<i>Cfr</i> I	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Roth
<i>Dra</i> I	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Roth
<i>Eco</i> RI	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Roth
<i>Ehe</i> I	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Roth
<i>Hind</i> III	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Roth

<i>HinfI</i>	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Roth
<i>HpaII</i>	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Roth
<i>MboI</i>	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Roth
<i>MboII</i>	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Roth
<i>MnlI</i>	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Roth
<i>NdeI</i>	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Roth
<i>PstI</i>	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Roth
<i>BccI</i>	NEB New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main
<i>BseRI</i>	NEB New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main
<i>BstBI</i>	NEB New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main
<i>DdeI</i>	NEB New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main
<i>Cac8I</i>	NEB New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main
<i>EcoNI</i>	NEB New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main
<i>MspAII</i>	NEB New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main
<i>StuI</i>	NEB New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main
<i>SmLI</i>	NEB New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main

3.1.5 Nukleotide

dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Eppendorf AG, Hamburg
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	MWG Biotech AG, Ebersberg
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Interactiva Biotechnologie GmbH, Ulm
[α - ³² P]dCTP	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
[α - ³⁵ P]dATP	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg

3.1.6 Puffer

1 x PBS	Merck KGaA, Darmstadt
1 x Proteinase K-Reaktionspuffer	Biometra GmbH, Göttingen
1 x RBC-lysis solution	Merck KGaA, Darmstadt
10x Buffer Tango™ (with BSA) BSA	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
10x Buffer B	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
10x Buffer G	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
10x Buffer O	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
10x Buffer R	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
10 x Nick-Translationspuffer	Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD, USA
Church Puffer	Merck KGaA, Darmstadt
Church Puffer	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Church Puffer	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Dulbecco's Minimum Essential Medium	Biochrom AG, Berlin
Dulbecco's Minimum Essential Medium	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Dulbecco's Minimum Essential Medium	Merck KGaA, Darmstadt
Hybridisierungsmischung: 10% Dextransulfat	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
NEBuffer 1 + BSA	NEB New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main
NEBuffer 2	NEB New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main
NEBuffer 3	NEB New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main
NEBuffer 4	NEB New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main

NEBuffer 4 + BSA	NEB New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main
P1 für Plasmid-Präparation	Qiagen GmbH, Hilden
P2 für Plasmid-Präparation	Qiagen GmbH, Hilden
P3 für Plasmid-Präparation	Qiagen GmbH, Hilden
QC für Plasmid-Präparation	Qiagen GmbH, Hilden
QF für Plasmid-Präparation	Qiagen GmbH, Hilden
QTB für Plasmid-Präparation	Qiagen GmbH, Hilden
SOC-Medium	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
SOC-Medium	Merck KGaA, Darmstadt
SOC-Medium	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Söhrensens Puffer	Clin-Tech Limited, Guildford, SRY, UK
Tris-Puffer	Merck KGaA, Darmstadt

3.1.7 Lösungen und Medien

1 x TAE	400 mM Tris-Acetat, 10 mM EDTA, pH 8,0
1 x TE	10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA pH 8,0
10 x TBE	0,89 M Tris/HCl, 0,89 M Borsäure, 20 mM EDTA, pH 8,3
20 x SSC	3,0 M NaCl, 300 mM tri-Natriumcitrat, pH 7,0
Auftragspuffer	15 mmol/L EDTA, 2% SDS, 0,5% Bromphenolblau, 50% Glycerin
Gelfärbe-Lösung	2 mg Ethidiumbromid pro Liter dH ₂ O
LB-Medium	10 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 10/L NaCl, pH 7,5

3.1.8 Antibiotika

Ampicillin	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Chloramphenicol	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe

3.1.9 Dokumentationsmaterial

Planfilme:	
Agfa Pan F Film	Agfa-Gaevert AG, Leverkusen
Hyperfilm β -Max, Hyperfilm MP	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Röntgenfilm NewRX	FUJIFILM Medical Systems, Stamford, CT, USA
Thermodruckpapier B 500 HD	Polaroid GmbH, Offenbach

3.1.10 Geräte

ABI377 Prism Sequencer	AB Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA
Autoklav	Webeco GmbH, Bad Schwartau
Bidestanlage Bi-Dest 2302	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Eismaschine Scotsman AF10	Kälte Mack, Maintal
Elektrophorese-Geräte:	
Elektrophoresekoammer Biomax	Scientific Imaging Systems, Eastman Kodak Co., New Haven, CT, USA
Elektrophoresekammern HRH, VCV	IBI International Biotechnologies, Inc., Subsidiary of Eastman Kodak Co., New Haven, CT, USA
Elektrophoresekammer P9DS	OWL Scientific, Inc., Woburn, MA,

Elektrophoresekammern Mini & Midi	USA
Electrophoresekammer, wasserkühlbar	von Keutz Laborgeräte GBR,
Netzgeräte E 321/425/443	Reiskirchen
SSCP Elektrophoresekammer P9DS	C.B.S. Scientific Co., DelMar, CA, USA
Pengjun	Consort S.A., Turnhut, Belgien
Fluorometer	OWL Separation Systems,
	Portsmouth, NH, USA
	Hofer DyNA Quant 200, Hoechst
	Pharmacia Biotech Inc., San Francisco,
	CA, USA
Gene Quant II	Pharmacia LKB Biochrome LTD.,
	Cambridge, UK
Gene Pulser II	Bio-Rad Laboratories Inc.,
	Hercules, CA, USA
Heizplatte MR2002	Heidolph Instruments GmbH, Kehlheim
Hybridisierungsöfen 30 spezial	Bachhofer GmbH, Reutlingen
Inkubatoren:	
Brutschrank	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Brutschrank O40	Memmert GmbH&Co KG, Schwabach
Schüttelinkubator Certomat H/R	B. Braun Dissel Biotech GmbH,
	Melsungen
Kameras:	
Nikon CoolPix 995 Digital Camera	Nikon Corp., Tokio, Japan
Nikon-Kamera FE2	Nikon Ltd., Tokio, Japan
Kryostat	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach
Kryostat	Colora Messtechnik, Lorch
Mikrowellen-Gerät	Siemens AG, München
Mikroskope:	
Zeiss Axioplan Mikroskop	Carl Zeiss AG, Oberkochen
PCR-Geräte:	
PCR Mastercycler gradient	Eppendorf AG, Hamburg
Thermocycler iCycler 96 well	Bio-Rad Laboratories Inc.,
	Hercules, CA, USA
Thermocycler PE 9600	Perkin Elmer Corp., Norwalk,
	Connecticut, USA
Thermocycler personal	Biometra GmbH, Göttingen
Thermocycler professional	Biometra GmbH, Göttingen
pH-Meter pH 537	Wiss. Technische Werkstätten,
	Weilheim
Photometer Gene Quant II	Amersham Bioscience GmbH, Freiburg
Pipetten:	
P2/10/20/100/200, Distriman,	Gilson Medical Electronics S.A.,
Multipipette 20-200 µL	Villiers-le-Bel, Frankreich
Multipipette 1-10 µL	Eppendorf AG, Hamburg
Röntgenkassetten	Appligene S.A., Illkirch, Frankreich
Schüttler:	
Kreiselschüttler KS 10	Edmund Bühler Laborgerätebau,
	Tübingen
Rotationsschüttler 3011	Gesellschaft für Labortechnik mbH,
	Burgwedel

Taumelschüttler 3011	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Sterilwerkbank Kojair	Cleanair Reinraumtechnik GmbH, Rielasingen-Worblingen
Strahlungsmessgeräte:	
Strahlungsmessgerät Contamat FHT 111M	FAG Kugelfischer, Erlangen
Strahlungsmessgerät LB 2810	Berthold GmbH, München
Strahlungsschutzschilder Nalgene	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Thermoblock TB2	Biometra GmbH, Göttingen
Trockenschränke:	
Trockenschrank UM600	Memmert GmbH, Schwabach
Trockenschrank	WTB Binder Labortechnik, Memmingen
Ultraschallbad Sonorex RX 255	Brandelin electronic GmbH & Co KG, Berlin
UV-Transilluminatoren:	
UV-Transilluminator	Polaroid, Offenbach/Main
UV-Transilluminator TM20	UVP, San Gabriel, CA, USA
Video-Dokumentationen:	
BioDocAnalyze, Biometra Ti5	Biometra GmbH, Göttingen
Videodokumentation Polaroid Digital Video System	Polaroid GmbH, Offenbach/Main
PXL-CCD-Kamera	Photometrics Inc., Tucson, AZ, USA
Vortexer, Reax 2000	Heidolph Instruments GmbH, Kehlheim
Waagen:	
Analysenwaage	Satorius AG, Göttingen
Feinwaage AE 100	Mettler Waagen GmbH, Giessen
Feinwaage PE 628	Bosch AG, Jungingen
Wasserbäder:	
Wasserbad Julabo 22A	Julabo Labortechnik GmbH, Saalbach
Thermostadbad RTE-111	Neslab, Frankfurt/Main
Wasserbad 3043	Köttermann GmbH&Co KG, Uetze/Hänigsen
Unitherm 1225 PC	Fröbel Labortechnik, Wasserburg
Zentrifugen:	
Biofuge A	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Biofuge 13	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Biofuge 13R	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Labofuge GL	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Suprafuge 22	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Winkelroto HFA 21.94	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Eppendorf Zentrifuge 5810R	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge J2-21M/E	Beckmann Instruments GmbH, München
Combi-Spin FUL-2400	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen

3.1.11 Computerprogramme

Online Programme:

GenePop Version 3.1	(Raymond & Rousset 1995); URL 17
QTL-Express	(Seaton <i>et al.</i> 2002); URL 45
Rebase	(Roberts <i>et al.</i> 2003); URL 6
Primer3	(Rozen & Skaletsky 2000); URL 8

Reverse Compliment Conversion Program	University of California, Irvine, CA, USA; URL 14
MultAlin	(Corpet 1988); URL 15
CAP3	(Huang & Madan 1999); URL 16
GeneBee	(Brodkii <i>et al.</i> 1995); URL 12
BCM Search Launcher: Multiple Sequence Alignments	Baylor College of Medicine, Houston, TX, USA; URL 19
BLAST 2 Sequences	NCBI, NIH, USA; URL 1
Spectral Repeat Finder V 1.1	Bioinformatics Centre IMTECH, Chandigarh, Indien; URL 20
ExPasy Translation Tool	SwissProt, Lausanne, Schweiz; URL 23
Evolutionary phylogenetic SHADOWing of closely related species	Comparative Genomics Center at Lawrence Livermore National Laboratory, USA; URL 38
Residentielle Programme:	
Adobe Photoshop	Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA
Chromas V 2.13	Technelysium Pty Ltd., Helensvale, Australia
CRI-MAP Version for MS-WINDOWS	Millon LV, University of California, Davis, CA, USA
Endnote	Adept Scientific GmbH, Frankfurt/Main
SAS-Programmpaket	SAS Institute Inc., Cary, NC, USA

3.1.12 Datenbanken, online

Bovmap	INRA, Frankreich; URL 18
Cattle gene index	TIGR, Rockwell, MD, USA; URL 24
Cattle Genome Database	CSIRO, Australien; URL 21
COMPASS	University of Illinois, IL, USA; URL 25
ESTIMA: Cattle	University of Illinois, IL, USA; URL 26
NCBI:	NIH, Bethesda, MD, USA; URL 1
Genbank	Map Viewer
BLAST	Pub Med
Gene	Journal
Interactive Bovine In Silico SNP database	CSIRO, Australien; URL 22
UniProt/SwissProt	URL 33

3.1.13 DNA

Für die Untersuchungen dieser Arbeit stand eine große Vielfalt von Rinder-DNA zur Verfügung. Dazu gehörte genomische DNA unterschiedlicher *Bos taurus* Rinderrassen aus dem ADR-Familienmaterial, sowie dem Fleckvieh/Deutsch-Angus-Familienmaterial des Instituts für Tierzucht und Haustiergenetik der JLU-Giessen. Ebenso wurde DNA internationaler *Bos taurus* und *Bos indicus* Rinderrassen aus DNA-Sammlungen paralleler Forschungsprojekte in den Untersuchungen genutzt. Desweiteren wurden DNA-Pools und klonierte Rinder-DNA aus BAC-Banken eingesetzt und auch Standard DNA als Marker in der Elektrophorese.

3.1.13.1 DNA der Rinderrassen

ADR-Familienmaterial:

Dt. Holstein (Milch) Dt. Fleckvieh (Milch) Dt. Braunvieh (Milch)

Familienmaterial des Instituts für Tierzucht & Haustiergenetik, JLU-Giessen:

Dt. Fleckvieh (Fleisch) Dt. Angus (Fleisch)

Internationale Rinderrassen (Milch, Fleisch):

Aberdeen Angus	Dt. Braunvieh	Nellore
Anatolian Black	Dt. Brown Swiss	Pezzata Rossa
Angler	Dt. Fleckvieh	Piemontese
Asturian Mountain	Dt. Holstein	Pinzgauer
Ayrshire	Dt. Schwarzbunte	Polish Red
Banyo Goudali	East Anatolian Red	Sahival
Belgian Blue Beef	Gelbvieh	Santa Gertrudis
Belgian Blue Mixed	Hariana	Slavonian Sarmian
Bohemian Red	Hereford	South Anatolian Red
British Frisian	Istrian	Swiss Simmental
Casta Navarra	Jersey	Tharparkar
Charolaise	Maremmana	Toro De Lidia
Chianina	Menorquina	Turkish Grey Steppe
Dt. Angus	N'Dama	White Fulani

3.1.13.2 ADR-Familienmaterial

Das zur Verfügung gestellte Familienmaterial der Arbeitsgemeinschaft Deutscher Rinderszüchter (ADR) bestand aus einem über männliche Halbgeschwister verwandtschaftlich strukturierten Familienmaterial und umfasst die drei deutschen Rinderrassen: Dt. Holstein, Dt. Fleckvieh und Dt. Braunvieh. Innerhalb der Holstein Rasse konnte ein zusammenhängendes Familiensystem (Familien A, B, C, D, E, F) aufgebaut werden, wobei die Familien A, B, C in Unterfamilien (A: AB, AC, AD, AE, AF; B: BC, BD, BE; C: CD, CE, CF, CG, CH, CI, CK) strukturiert sind. Die Fleckvieh Rasse ist mit drei Familien (G, H, I) und die Braunviehrasse mit einer Familie (K) vertreten (Abb. 3.1). Allelfrequenzen der Marker *KIEL_E8*, *DGAT1*, *CYP11B1*, *GML*, *ILSTS039*, *CSSM066* wurden in allen Familien (Holstein, Fleckvieh, Braunvieh) geschätzt. Aufgrund der zu geringen Anzahl an Braunviehproben wurden nur die genetischen Karten der Rassen Dt. Holstein und Dt. Fleckvieh errechnet. Die QTL-Studien berücksichtigten die Allelfrequenzen der Rinder der Familien Dt. Holstein.

Auf der Basis des von Weller *et al.* (1990) vorgestellten «Granddaughter Designs», wobei in einem Familienmaterial der heterozygote männliche Vorfahre «Grandsire» genannt wird, seine Söhne «Sons» und deren Töchter «Granddaughters», wurde im Rahmen des ersten Abschnitts des Forschungsvorhabens Genomanalyse Rind der Arbeitsgemeinschaft Deutscher Rinderzüchter (ADR), ein 4 Generationen umfassendes

Granddaughter-Design für die Rasse Dt. Holstein erstellt. Davon wurden Generation 1, 2 und 3 genotypisiert und Phänotypen in Generation 4 erhoben (Thomsen *et al.* 2000).

Bei der Suche von Polymorphismen in Kandidatengenomen wurde zusätzlich DNA von europäischen und afrikanischen *Bos taurus*, sowie afrikanischen *Bos indicus* Rindern eingesetzt, die parallelen Forschungsprojekten des Instituts für Tierzucht und Haustiergenetik der JLU-Giessen, entstammten.

DNA von Deutsch Angus und Fleckvieh Fleischrinder-Familienmaterial des Instituts für Tierzucht und Haustiergenetik der JLU Giessen wurde zu Segregations-Analysen genutzt. Dieses Familienmaterial umfasste zum Zeitpunkt der Untersuchungen 8 Väter der Rasse Dt. Fleckvieh und 10 Väter der Rasse Dt. Angus. DNA von Kälberjahrgängen 1998 bis 2002 konnte in beiden Rassen genutzt werden.

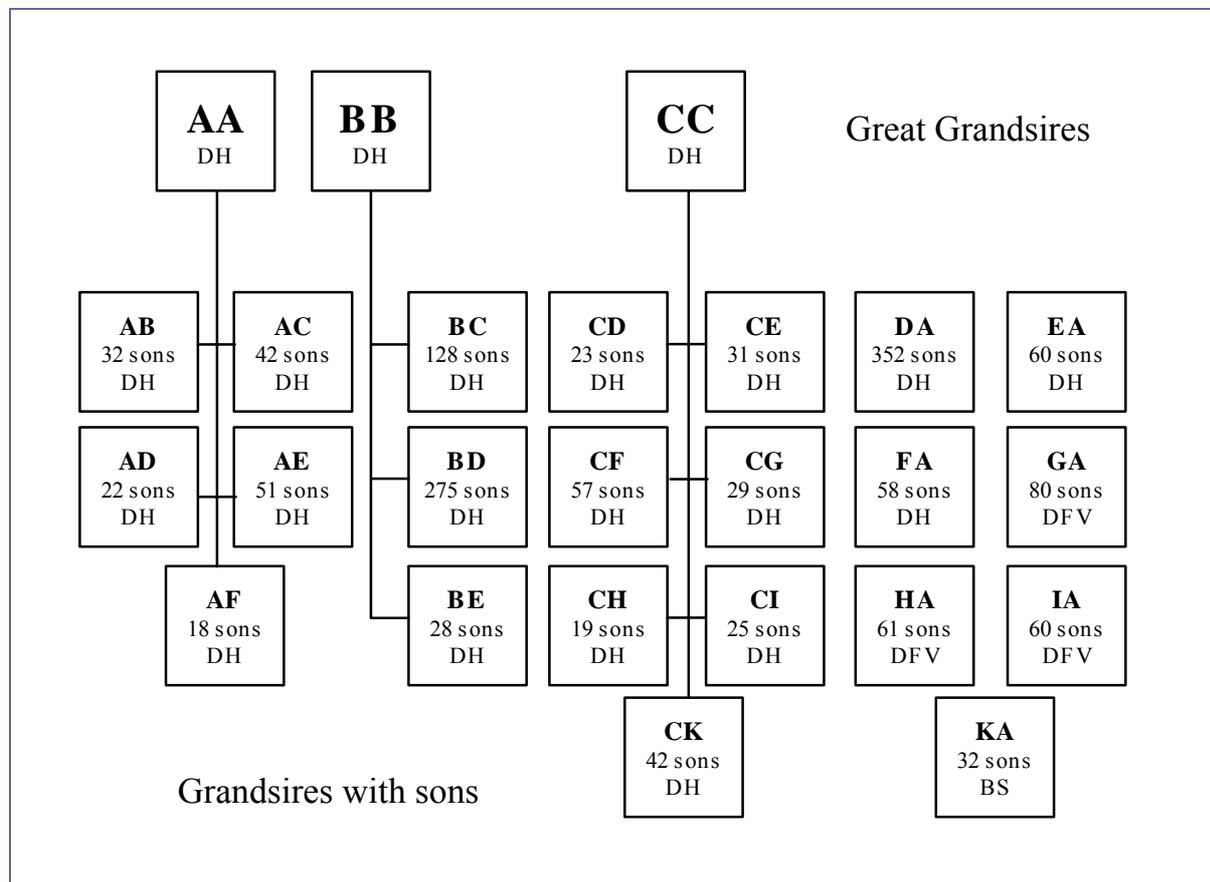


Abbildung 3.1: Das ADR Granddaughter-Design nach Thomsen *et al.* (2000) beinhaltet 18 väterliche Halbgeschwisterfamilien der Dt. Holstein Population (DH), 3 Familien der Dt. Fleckvieh Population (DFV) und eine Familie Dt. Brown-Swiss (BS). Die Größe jeder Halbgeschwisterfamilie wird dargestellt durch die Anzahl der Söhne in den umrandeten Feldern. Einige Halbgeschwisterfamilien sind durch gemeinsame Großväter (AA, BB, CC) verwandt, die als 'Great Grandsires' dargestellt sind.

3.1.13.3 BAC-Banken

BAC-Banken:

RZPD_B750	RZPD Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH, Berlin
RZPD_B754	RZPD Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH, Berlin
RPCI_42	Children's Hospital Oakland Research Institute (BACPAC Resources), Oakland, CA, USA

High-density Filter:

High-density filter Library BBI_B750	RZPD
High-density filter Library TUM_B754	RZPD
High-density filter RPCI_42	BACPAC Resources

Primary Pools:

Primary Pools Library BBI_B750	RZPD
Primary Pools Library TUM_B754	RZPD

Secondary Pools:

BBI_B750PP1 bis 16/ -PP18 bis 23/ -PP25 bis 26/ -PP28 bis 34/ -PP37/ -PP39/ -PP41 bis 45	RZPD
TUM_B754PP1 bis 10/ -PP12 bis 25	RZPD

3.1.13.4 BAC-Klone

Tabelle 3.1a, b beinhaltet BAC-Klone mit ihren S1-relevanten Identifikationen. Zugeordnet sind die DNA-Sonden mit ihren PCR-Primern, die zum Auffinden der Klone genutzt wurden. Kartierte BAC-Klone sind als solche gekennzeichnet.

3.1.13.5 DNA-Standardproben (DNA-Größenmarker)

pUC Mix Marker, 8	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Lambda-Mix Marker, 19	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Lambda-HindIII Marker, 2	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
pUC19 DNA/MspI Marker, 23	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
GeneRuler 100bp DNA Ladder	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
GeneRuler DNA Ladder Mix	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

Tabelle 3.1a: Übersicht der BAC-Klone mit S1 relevanten Identifikationen. JLU-Reg.-Nr. (JLU), Herkunfts-ID (ID), Herkunft (Ort), Kartierungen (FISH, n.k.=nicht kartiert, is.=in silico kartiert), Screening Methode (SM, r=radioaktiver Filter Screen, p=PCR-Pool Screen) und den PCR Primersequenzen (Primer) der jeweiligen Screening-Sonde (Sonde).

JLU	ID	Ort	FISH	SM	Sonde	Primer forward	Primer reverse
1	B750E04217Q3	RZPD	n.k.	r	<i>KJEL_E8</i>	AGCGGAGAAGGGAAGGAAAGC	CGTGTGCAGCCAGAGC
2	B750P18110Q2	RZPD	n.k.	r	<i>KJEL_E8</i>	AGCGGAGAAGGGAAGGAAAGC	CGTGTGCAGCCAGAGC
3	B754K07103Q3	RZPD	BTA1	r	<i>KJEL_E8</i>	AGCGGAGAAGGGAAGGAAAGC	CGTGTGCAGCCAGAGC
4	B754D11127Q3	RZPD	n.k.	r	<i>KJEL_E8</i>	AGCGGAGAAGGGAAGGAAAGC	CGTGTGCAGCCAGAGC
5	B750N0363Q3	RZPD	n.k.	r	<i>KJEL_E8</i>	AGCGGAGAAGGGAAGGAAAGC	CGTGTGCAGCCAGAGC
6	B750I11223Q3	RZPD	n.k.	r	<i>KJEL_E8</i>	AGCGGAGAAGGGAAGGAAAGC	CGTGTGCAGCCAGAGC
7	B754J11135Q3	RZPD	n.k.	r	<i>KJEL_E8</i>	AGCGGAGAAGGGAAGGAAAGC	CGTGTGCAGCCAGAGC
8	B754J10135Q3	RZPD	BTA14q26	r	<i>KJEL_E8</i>	AGCGGAGAAGGGAAGGAAAGC	CGTGTGCAGCCAGAGC
9	B750K2432Q2	RZPD	BTA14q12	r	<i>CYP11B</i>	GGCCATCCAGTAGTCGTGTC	CTGTGCTTCCATGAGTGC
10	366 at B-12	RPCI	n.k.	r	<i>KJA40278</i>	TGCAGGACGGCCTGGAGCC	GGCGGGCGTGGGACTCG
11	428 at N-22	RPCI	n.k.	r	<i>KJA40278</i>	TGCAGGACGGCCTGGAGCC	GGCGGGCGTGGGACTCG
12	416 at N-22	RPCI	Zentromere	r	<i>KJA40278</i>	TGCAGGACGGCCTGGAGCC	GGCGGGCGTGGGACTCG
13	426 at B-9	RPCI	n.k.	r	<i>KJA40278</i>	TGCAGGACGGCCTGGAGCC	GGCGGGCGTGGGACTCG
14	404 at B-9	RPCI	BTA7	r	<i>KJA40278</i>	TGCAGGACGGCCTGGAGCC	GGCGGGCGTGGGACTCG
15	429 at P-5	RPCI	n.k.	r	<i>KJA40278</i>	TGCAGGACGGCCTGGAGCC	GGCGGGCGTGGGACTCG
16	454 at C-3	RPCI	n.k.	r	<i>KJA40278</i>	TGCAGGACGGCCTGGAGCC	GGCGGGCGTGGGACTCG
17	442 at B-8	RPCI	n.k.	r	<i>KJA40278</i>	TGCAGGACGGCCTGGAGCC	GGCGGGCGTGGGACTCG
18	456 at N-6	RPCI	BTA16	r	<i>KJA40278</i>	TGCAGGACGGCCTGGAGCC	GGCGGGCGTGGGACTCG
19	474 at B-6	RPCI	n.k.	r	<i>KJA40278</i>	TGCAGGACGGCCTGGAGCC	GGCGGGCGTGGGACTCG
20	545 at B-22	RPCI	n.k.	r	<i>KJA40278</i>	TGCAGGACGGCCTGGAGCC	GGCGGGCGTGGGACTCG
21	B754O2395Q2	RZPD	n.k.	p	<i>KJEL_E8</i>	TGTTCAOCCAAOAGAGCAAC	AGATTCAAAAAGTAGGGGGC
22	B750H22261Q2	RZPD	n.k.	p	<i>KJEL_E8</i>	TGTTCAOCCAAOAGAGCAAC	AGATTCAAAAAGTAGGGGGC
23	B750L17181Q2	RZPD	n.k.	p	<i>KJEL_E8</i>	TGTTCAOCCAAOAGAGCAAC	AGATTCAAAAAGTAGGGGGC
24	B750I13258Q2	RZPD	n.k.	p	<i>PTK2</i>	GAGCAOCTCTTGCTACCCCTC	AGTTTAGGAATTAAGATGTCAOCCC
25	B750E13258Q2	RZPD	n.k.	p	<i>PTK2</i>	GAGCAOCTCTTGCTACCCCTC	AGTTTAGGAATTAAGATGTCAOCCC
26	B750C01336Q2	RZPD	n.k.	p	<i>KJA40278</i>	TGCAGGACGGCCTGGAGCC	GGCGGGCGTGGGACTCG
27	B750D01336Q2	RZPD	n.k.	p	<i>KJA40278</i>	TGCAGGACGGCCTGGAGCC	GGCGGGCGTGGGACTCG
28	B750C02336Q2	RZPD	n.k.	p	<i>KJA40278</i>	TGCAGGACGGCCTGGAGCC	GGCGGGCGTGGGACTCG
29	B750D02336Q2	RZPD	n.k.	p	<i>KJA40278</i>	TGCAGGACGGCCTGGAGCC	GGCGGGCGTGGGACTCG
30	B750C09336Q2	RZPD	n.k.	p	<i>KJA40278</i>	TGCAGGACGGCCTGGAGCC	GGCGGGCGTGGGACTCG
31	B750D09336Q2	RZPD	n.k.	p	<i>KJA40278</i>	TGCAGGACGGCCTGGAGCC	GGCGGGCGTGGGACTCG
32	B750A0467Q2	RZPD	n.k.	p	<i>PTK2</i>	GAGCAOCTCTTGCTACCCCTC	AGTTTAGGAATTAAGATGTCAOCCC
33	B750A2370Q2	RZPD	n.k.	p	<i>PTK2</i>	GAGCAOCTCTTGCTACCCCTC	AGTTTAGGAATTAAGATGTCAOCCC
34	B750A0438Q2	RZPD	n.k.	p	<i>PTK2</i>	GAGCAOCTCTTGCTACCCCTC	AGTTTAGGAATTAAGATGTCAOCCC

Tabelle 3.1b: Übersicht der BAC-Klone mit S1 relevanten Identifikationen. JLU-Reg.-Nr. (JLU), Herkunfts-ID (ID), Herkunft (Ort), Kartierungen (FISH, n.k.=nicht kartiert, is.=in silico kartiert), Screening Methode (SM, r=radioaktiver Filter Screen, p=PCR-Pool Screen) und den PCR Primersequenzen (Primer) der jeweiligen Screening-Sonde (Sonde).

JLU	ID	Ort	FISH	SM	Sonde	Primer forward	Primer reverse
35	B750A23238Q2	RZPD	n.k.	p	<i>PTK2</i>	GAGCACGCTCTTGCTACCCCTC	AGTTTAGGAATTAAGATGTCACCCC
36	B750O04238Q2	RZPD	n.k.	p	<i>PTK2</i>	GAGCACGCTCTTGCTACCCCTC	AGTTTAGGAATTAAGATGTCACCCC
37	B750O023238Q2	RZPD	n.k.	p	<i>PTK2</i>	GAGCACGCTCTTGCTACCCCTC	AGTTTAGGAATTAAGATGTCACCCC
38	B754J10150Q2	RZPD	n.k.	p	<i>PTK2</i>	GAGCACGCTCTTGCTACCCCTC	AGTTTAGGAATTAAGATGTCACCCC
39	B754J16150Q2	RZPD	n.k.	p	<i>PTK2</i>	GAGCACGCTCTTGCTACCCCTC	AGTTTAGGAATTAAGATGTCACCCC
40	B754J22150Q2	RZPD	n.k.	p	<i>PTK2</i>	GAGCACGCTCTTGCTACCCCTC	AGTTTAGGAATTAAGATGTCACCCC
41	B754L10150Q2	RZPD	BTA4q13	random pickng			
42	B754L16150Q2	RZPD	BTA14q15	random pickng			
43	B754L22150Q2	RZPD	BTA14q24	random pickng			
44	B754C0289Q2	RZPD	BTA14q11	r	<i>KTEL_E8</i>	AGCGGAGAAGGGACGGGAAGC	CGGTGTGACGCCAGAGC
45	B754F2141Q2	RZPD	is. BTA14	r	<i>ILSTS039</i>	GTTTCTGCCCTATGCCGTAA	GCACTCCATGGAATCACAAA
46	B754L143Q2	RZPD	is. BTA14	r	<i>PTK2</i>	ATTTCACTAGAGCTGGCGATTG	GGCTGAATTAATTTGTTCCGCTCT
47	B754O143Q2	RZPD	is. BTA14	r	<i>PTK2</i>	ATTTCACTAGAGCTGGCGATTG	GGCTGAATTAATTTGTTCCGCTCT
48	B750E1416Q2	RZPD	is. BTA14	r	<i>INR4237</i>	CTCAGAGCAGAGCTTCTTCCA	CTGTCTCCTGGTGGTTCCTC
49	B750A0924Q2	RZPD	is. BTA14	r	<i>CSSM066</i>	ACACAAATCCTTTCTGCCAGCTGA	AAATTAATGCATGAGGAGCTTGG
50	B750H1563Q2	RZPD	is. BTA14	r	<i>PTK2</i>	ATTTCACTAGAGCTGGCGATTG	GGCTGAATTAATTTGTTCCGCTCT
51	B750P1563Q2	RZPD	is. BTA14	r	<i>PTK2</i>	ATTTCACTAGAGCTGGCGATTG	GGCTGAATTAATTTGTTCCGCTCT
52	B750G01100Q2	RZPD	-	r	nicht zugeordnet		
53	B750O23120Q2	RZPD	is. BTA14	r	<i>ILSTS039</i>	GTTTCTGCCCTATGCCGTAA	ATCCCTGGAGGAGGAAAATA
54	B750A06122Q2	RZPD	-	r	nicht zugeordnet		
55	B750P22359Q2	RZPD	is. BTA14	r	<i>IDVGA76</i>	ACACGGGACCACCTGGGACCT	CACCTTGGCAAAGATGAAACAT
56	B754G0725Q2	RZPD	is. BTA14	r	<i>ILSTS039</i>	GTTTCTGCCCTATGCCGTAA	ATCCCTGGAGGAGGAAAATA
57	B754F1796Q2	RZPD	is. BTA14	r	<i>CACNB3</i>	ACTCTGTGCACGCTGCCCAATG	TTGCCCTGTTCCACAAAACCTGA
58	B754F1896Q2	RZPD	is. BTA14	r	<i>CACNB3</i>	ACTCTGTGCACGCTGCCCAATG	TTGCCCTGTTCCACAAAACCTGA
59	B754G1796Q2	RZPD	is. BTA14	r	<i>CACNB3</i>	ACTCTGTGCACGCTGCCCAATG	TTGCCCTGTTCCACAAAACCTGA
60	B754G1896Q2	RZPD	is. BTA14	r	<i>CACNB3</i>	ACTCTGTGCACGCTGCCCAATG	TTGCCCTGTTCCACAAAACCTGA
61	B754B0297Q2	RZPD	is. BTA14	r	<i>IDVGA76</i>	ACACGGGACCACCTGGGACCT	CACCTTGGCAAAGATGAAACAT
62	B754J0297Q2	RZPD	is. BTA14	r	<i>IDVGA76</i>	ACACGGGACCACCTGGGACCT	CACCTTGGCAAAGATGAAACAT
63	B754B01113Q2	RZPD	is. BTA14	r	<i>CYC1</i>	TGCCACAGCATGGACTATGT	TGTTTTGGGGAAGTAGTCAGA
64	B754B01114Q2	RZPD	is. BTA14	r	<i>CACNB3</i>	ACTCTGTGCACGCTGCCCAATG	TTGCCCTGTTCCACAAAACCTGA
65	B754B13114Q2	RZPD	is. BTA14	r	<i>CACNB3</i>	ACTCTGTGCACGCTGCCCAATG	TTGCCCTGTTCCACAAAACCTGA
66	B754E13125Q2	RZPD	is. BTA14	r	<i>PTK2</i>	ATTTCACTAGAGCTGGCGATTG	GGCTGAATTAATTTGTTCCGCTCT
67	B754H18128Q2	RZPD	is. BTA14	r	<i>TG</i>	GTCAGCCTATTCCTGGAACTCGAAG	CCCAGCGTTTCATACCACCTCAAAGGC
68	B754C11198Q2	RZPD	is. BTA14	r	<i>CYC1</i>	TGCCACAGCATGGACTATGT	TGTTTTGGGGAAGTAGTCAGA

3.1.14 *E.coli* Stamm DH10B(K12)

In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich *E.coli* K12-Derivate mit dem Status von Sicherheitsstämmen (Kunert *et al.* 1995) genutzt, die auf den ursprüngliche *E.coli* Stamm K12 zurückgehen, der 1922 aus dem Darm eines Diphteriepatienten an der Stanford-Universität isoliert wurde. **Abbildung 3.2** zeigt den Genotyp des *E.coli* DH10B(K12). Speziell kam der *E.coli* K12 Stamm DH10B zur Nutzung, der in der Entwicklungsreihe der *E.coli* Stämme DH1, DH5 und DH10 steht (Grant *et al.* 1990) und eine technische Weiterentwicklung des letzteren darstellt.

Marker	Anmerkung
F ⁻	Stamm enthält kein F Episom, keine Konjugation möglich
<i>mcrA</i>	Mutation verhindert die McrA-Restriktion methylierter DNA
$\Delta(mrr\text{-}hsdRMS\text{-}mcrBC)$	Deletion eines ganzen Genclusters von 6 Restriktionsenzymen (<i>mrr-hsdR-hsdM-hsdSmrcB-mrcC</i>)
$\Phi 80dlacZ\Delta M15$	Stamm trägt den defekten Lambda-Prophagen $\Phi 80$, dieser trägt das <i>dlacZ</i> $\Delta M15$ -Allel, <i>dlacZ</i> $\Delta M15$ codiert das ω -Fragment der β -Galactosidase
$\Delta lacX74$	Deletion des kompletten <i>lac</i> Operons
<i>endA1</i>	Mutation der unspezifischen Endonuclease I (ermöglicht stabilere DNA Präparationen)
<i>recA1</i>	Mutation verhindert homologe Rekombination
<i>deoR</i>	Mutation in einem Repressor des <i>deoCABD</i> Operons ⇒ konstitutive Expression (Aufnahme großer Plasmide möglich)
$\Delta(ara, leu)7697$	Deletion eines Genclusters (reicht vom <i>ara</i> bis ins <i>leu</i> -Operon)
<i>araD139</i>	Mutation der L-ribulose 5-phosphate 4-epimerase ⇒ L-Arabinose kann nicht metabolisiert werden
<i>galU</i>	Mutation der UDP-Glucose Pyrophosphorylase ⇒ Galaktose kann nicht metabolisiert werden
<i>galK</i>	Mutation der Galaktokinase ⇒ Galaktose kann nicht metabolisiert werden
<i>nupG</i>	Mutation eines Nucleoside-Transporters
<i>rpsL</i>	Mutation im Protein S12 der 30S Untereinheit ⇒ Steptomycin-Resistenz

Abbildung 3.2: Genotyp des *E.coli* Stammes DH10B(K12) (Goller & Mitterbauer 2004)

3.1.15 Vektor pBACe3.6

Der Vektor pBACe3.6 (Abb. 3.3) wurde näher von Frengen *et al.* (1999) beschrieben. Seine komplette genomische DNA-Sequenz ist in Genbank unter Accession-Nr. U80929 hinterlegt.

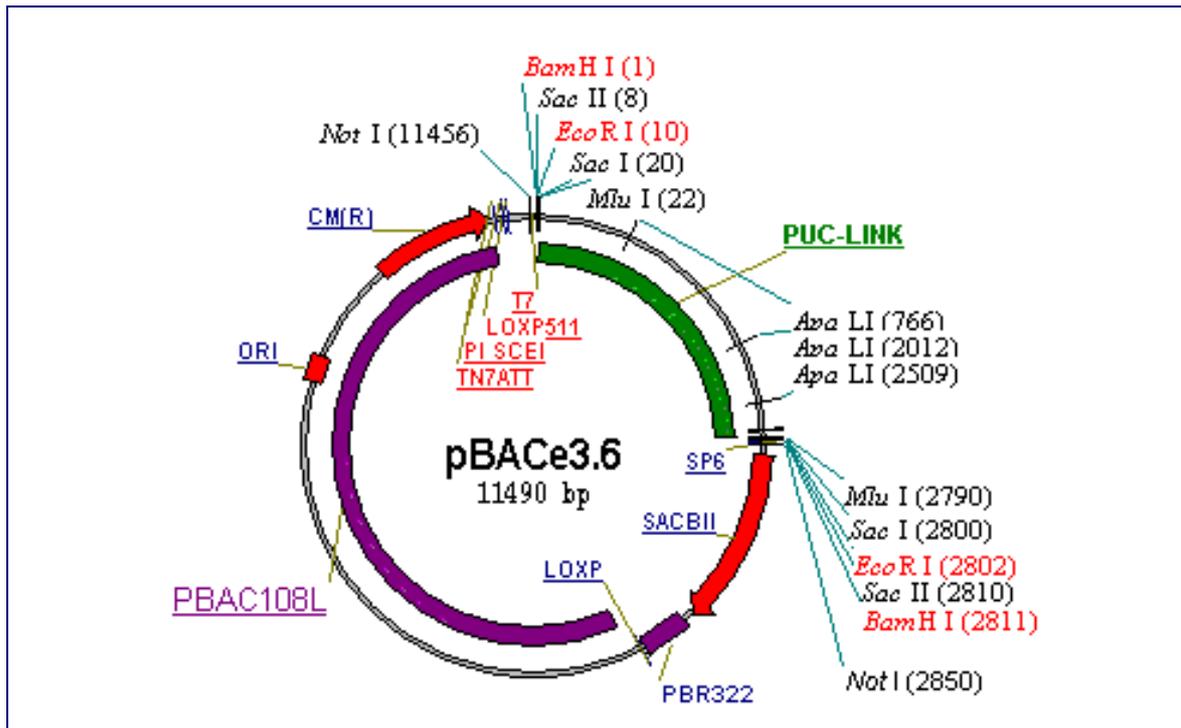


Abbildung 3.3: Karte des pBACe3.6 Vektors. Das pUC Link wird bei erfolgreicher Ligation durch DNA-Inserts zwischen den *EcoRI* Schnittstellen ersetzt. *CM(R)* kennzeichnet das Chloramphenicol Resistenzgen zur Negativselektion für nicht transformierte Zellen sowie das *SacB* Gen als Indikator erfolgreicher Ligation. Die T7 und SP6 Promotorsequenzen wurden zum Primerdesign für BAC Endsequenzierungen genutzt.

3.2 Methoden

Dieses Kapitel umfasst Methoden der Informationsbeschaffung, der Laboranalysen und der biometrischen Analysen. Informationsbeschaffung erfolgte fast ausschließlich über das 'WorldWideWeb' (www), ältere Informationen aber auch über Universitätsbibliotheken und umfasst wissenschaftliche Literatur, ebenso wie genomische Information. Zur Datengenerierung im Labor kamen klassische Methoden (Sambrook *et al.* 1989) zur Anwendung. Zur Datenanalyse durch statistische Auswertung wurden sowohl online verfügbare, als auch residentielle Computerprogramme genutzt.

3.2.1 Methoden zur Nutzung von genomischer und biotechnologischer Information aus dem World Wide Web

In besonderem Maße konnten die Seiten des National Center of Biotechnology Information (NCBI) und National Library of Medicine (NLM), Bethesda, MD, USA als Informationsdrehkreuz genutzt werden. Darüber hinaus wurde Information aus einer Vielzahl von Internetseiten internationaler Biotech-Centren und Unternehmen, sowie

Universitäten einbezogen. Das Verzeichnis der URL im Text beinhaltet die entsprechenden www-Adressen.

3.2.1.1 Datenbanken

Nukleotid Datenbanken: NCBI (URL 1): Mit vollständiger humaner oder muriner mRNA Sequenz oder auch Sequenzfragmenten (EST) wurde bovine Sequenzinformation positioneller Kandidatengene anhand der BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) Funktion (Altschul *et al.* 1990) der NCBI Datenbank gesucht. Die EST-Datenbank (Boguski *et al.* 1993) ist Teil der NCBI Datenbank und lieferte wertvolle Ansätze zur Entwicklung von Kandidatengenomen. EMBL (URL 39): Das European Molecular Biological Laboratory, stellt durch das Angebot des EMBL Outstation, dem European Bioinformatics Institute (EBI), Hinxton, UK (URL 32) eine in den letzten Jahren sprunghaft angestiegene Fülle von genetischer Information in Form von Datenbanken online zur Verfügung. Aus diesem Angebot wurde bevorzugt die Nukleotide Sequence Database (URL 32) (Baker *et al.* 2000, Kulikova *et al.* 2004) genutzt. CSIRO (URL 40): Die Commonwealth Scientific & Industrial Research Organisation, Canberra, Australia stellt mit ihrer Division Livestock Industries, St Lucia, Queensland (URL 41) spezifische bovine Genominformationen bereit. IBISS (URL 22), Interactive InSilico Bovine SNP Database (Hawken *et al.* 2004) ist eine bovine SNP-Datenbank. Ihr wurden Informationen über Polymorphismen und Intron-Exon-Strukturen entnommen.

Protein Datenbanken: UniProt/SwissProt (URL 33): Universal Protein Resource stellt weltweit den umfassendsten Katalog von Proteininformationen dar (Bairoch & Apweiler 2000, Gasteiger *et al.* 2003) und enthält die Datenbank SWISSPROT. Enzyme (URL 34): Mit dem Expert Protein Analysing System, ExpASy (Gasteiger *et al.* 2003) des Swiss Institute of Bioinformatics (SIB), Lausanne, Schweiz (URL 42) ist eine umfassende Sammlung von Informationen bekannter Enzyme von 4309 Einträgen (2004) online verfügbar. Die in diesen Datenbanken enthaltenen Proteinsequenzformationen wurden zur Entwicklung boviner Kandidatengensequenzen genutzt.

Genomische Datenbanken: Seit der Fertigstellung von kompletten Genom-Sequenzen, ist die Suche nach Genen in ihrem genomischen Kontext möglich. Datenbanken wie *e!* (URL 37) ermöglichen die Suche für alle bislang fertig gestellten Genome, *Pre!* (URL 36) für das murine Genom und RGD Rat Genomic Database (URL 31) für das Rattengenom. Diese Datenbanken wurden zur Suche homologer Sequenzinformation genutzt.

3.2.1.2 Editieren von Sequenzen zum Primer Design

Die gefundenen bovinen EST Sequenzen, aber auch jegliche fragmentarische genomische Sequenz von Rind, Schaf oder Ziege wurden über Alignment Programme wie BLAST 2 Sequences (URL 1), CAP3 (URL 16), MultAlin (URL 15) zu putativen cDNAs zusammengestellt. Die Consensus Sequenzen wurden mit mRNAs von Mensch, Maus und Ratte soweit verfügbar aligned, um konservierte Bereiche zwischen den Arten zu lokalisieren. Alignments mit genomischer Sequenz aus humanen HTGs (high throughput genomic sequences) wurden genutzt, um Intron-Exon Grenzen festzulegen. Die auf diese Weise aufbereitete bovine Sequenzinformation wurde anschließend zum Primer Design genutzt. Vorzugsweise wurden Primer in konservierte Bereiche in Exons gelegt.

3. 2.1.3 Primer Design

PCR-Primer Sequenzen wurden entweder manuell oder mit dem Primer3 [www](http://www.primer3.com) Programm des Whitehead Institutes, Cambridge, MA, USA (Rozen & Skaletsky 2000) erstellt (URL 8).

Manueller PCR-Primer Design wurden nach den Grundregeln von Innis *et al.* (1999) durchgeführt, die Schmelztemperatur (T_m) nach der Formel von Suggs *et al.* (1981) bzw. Wu *et al.* (1991) errechnet.

Die Mehrzahl der PCR-Primer wurde jedoch mit dem Primer3 Programm entworfen. Die Voreinstellungen des Programms wurden dazu üblicher Weise in den folgenden Punkten verändert. Primer Size opt. 22 (min. 18, max. 27), Primer T_m opt. 60.0 (min. 59.0, max. 61.0), Primer GC % opt. 50 (min. 40, max. 60), MaxSelfComplementary: 4.00, Max 3' SelfComplementary: 1.50. Schränkten diese Maßnahmen die Detektionsrate von potentiellen Primersequenzen derart ein, dass keine Auswahl mehr getroffen werden konnte, so wurden die Veränderungen immer nur soweit in kleinen Schritten zurückgenommen, bis das Programm akzeptable Primersequenzen vorschlug.

Die Sequenzierprimer wurden als Nested-Primer designed und zusätzlich die Voreinstellungen wie folgt verändert. Primer Size: opt. 24 (min. 20, max. 27), CG Clamp: 1. Die Programmoption Objective Function Penalty Weights for Primers ermöglicht die Stringenz der Suchvorgaben für das Programm zu erhöhen. Hier wurden Vorgaben von 1-100 eingetragen und wie oben beschrieben nur in dem Masse zurückgenommen, bis akzeptable Sequenzen vorgeschlagen wurden.

Im Falle der selektiven *CYP11B1*-Primer lag die Selektivität in der Nutzung einer 4 bp großen “Deletionslücke” der DNA Sequenz. Aus diesem Grunde musste die DNA-Sequenz an dieser Stelle unverändert als PCR-Primer übernommen werden.

3.2.2 Molekulargenetische Methoden

3.2.2.1 Polymerase Kettenreaktion

Zentrale Labortechnik dieser Arbeit stellte die Polymerase Kettenreaktion (PCR) dar, die in unterschiedlichen Varianten zum Einsatz kam.

3.2.2.1.1 Standardisierte PCR-Methode

Da eine größere Anzahl Kandidatengene in die Entwicklung der Feinkartierung im centromerischen Bereich auf *BTA14* aufgenommen wurden und entsprechend zahlreiche PCR-Systeme zu etablieren waren, wurden diese im Sinne einer einfachen Durchführbarkeit und einer eventuellen Multiplexkombination möglichst nahe einem Standard-Protokoll etabliert. Mit Primern, die optimaler Weise eine Schmelztemperatur (T_m) von 60°C aufwiesen wurde immer mit dem in [Tabelle 3.2](#) aufgeführten Standard-Protokoll das Austesten und Etablieren des PCR-Systems begonnen und dieses anschließend nur in der notwendig erscheinenden Art und Weise abgeändert. Die amplifizierten Produktgrößen variierten zwischen 200 bp und 800 bp, aus diesem Grund blieben dNTP Mengen in der Regel unverändert. Das Gesamtvolumen einer Reaktion betrug immer 20 µL, so dass es auch in einzelnen PCR-Ansätzen noch möglich war Einzelvolumina verlässlich genau zu pipetieren. In Großansätzen konnten aus ökonomischen Erwägungen Volumina halbiert werden.

Tabelle 3.2: Protokoll der standardisierten PCR-Methode

		Konzentration Stock	Volumen Reaktion	Konzentration Reaktion
H ₂ O		-- --	13,9 µL	-- --
Puffer	mit 15 mM MgCl ₂	10 x	2,0 µL	1 x
MgCl ₂		25 mM	--- µL	1,5 mM
dNTP		2 mM	1,0 µL	100 µM
Primer 1		10 pM	1,0 µL	0,5 pM
Primer 2		10 pM	1,0 µL	0,5 pM
DNA		50 ng/µL	1,0 µL	2,5 ng
<i>Taq</i>		5 U/µL	0,1 µL	0,5 U
gesamt			20,0 µL	

Das Austesten der optimalen Annealingtemperatur erfolgte mit einem Temperaturgradienten-Cycler (BIORAD) in einem Variationsbereich von 8 Temperatursprüngen. Dabei wurde immer darauf geachtet, dass die Gradientenabstufung in ganzen Gradschritten erfolgte. Obwohl Annealingtemperaturen in der Regel 2-5°C unter Primerschmelztemperaturen liegen, wurde 60°C als mittlere Annealingtemperatur im Testgradienten angenommen. Die Mehrzahl der nach erfolgtem Essay selektierten Annealingtemperaturen im PCR-System betrug ebenfalls 60°C.

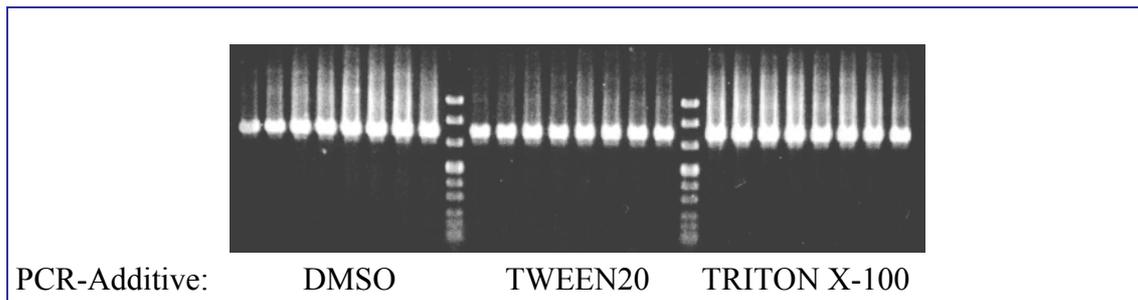


Abbildung 3.4: Drei identische PCR-Ansätze mit unterschiedlichen Enhancer-Substanzen im Temperaturgradienten von 63°C (links) bis 56°C (rechts), getrennt durch DNA Größenmarker. PCR-Additive sind DMSO (links), Tween20 (Mitte) und Triton X-100 (rechts).

3.2.2.1.2 PCR-Optimierung

Um die Produktausbeute, Produktspezifität und Produktkonsistenz pro PCR-Reaktion zu optimieren, werden neben der Möglichkeit die PCR-Substanzen mengenmäßig zu variieren auch unterschiedliche Substanzen als Additive genutzt. Im Rahmen dieser Arbeit kamen DiMethylSulfOxid (DMSO), Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat (Tween20) und Alkylphenyl-polyethylenglykol (Tritin X-100) zur Anwendung (Abb. 3.4). DMSO unterstützt den PCR Vorgang durch Destabilisierung des Inter- und Intrastrang-Reannealings der DNA und wird gezielt bei GC reichen Templates in PCR Reaktionen eingesetzt. Aus den gleichen Gründen kommt es auch bei Dye Terminator Sequenzierreaktionen zum Einsatz. Tween20 wird pharmazeutisch als Emulsions- oder Dispersionsagens genutzt und kann Verunreinigungen im Template neutralisieren (Innis *et al.* 1999). Triton X-100 ist als ein nicht ionisches und oberflächenaktives Mittel beschrieben und kann in der PCR-Reaktion die Produktmenge erhöhen (Innis *et al.* 1999).

Tabelle 3.3: Cycler-Temperaturgradienten-Protokoll zum Etablieren der PCR-Systeme

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
1	94°C	3'	x 30
2	94°C	30''	
3	57°C-64°C	30''	
4	72°C	30''-45''	
5	72°C	10'	
6	4°C	∞	

3.2.2.1.3 PCR-Variationen

Da Nested-PCR (Newton & Graham 1994) durch die Verwendung von PCR-Produkt als Template in einer neuen PCR-Reaktion eine außerordentlich empfindliche Methode darstellt wächst die Anfälligkeit für Verunreinigungen und Nebenprodukte. Sie wurde nur selten, hauptsächlich bei unerklärlich schwacher Amplifikation oder bei Templateknappheit eingesetzt.

Touch-down-PCR (Don *et al.* 1991) erbrachte spezifische Produkte und wurde auch bei Amplifikationen mit Selektivprimern für das *CYP11B1*-Gen eingesetzt. Obwohl Annealingtemperaturen, generell in hohen Temperaturabschnitten, wesentlich weniger effizient sind, sind sie aber spezifischer als in niedrigeren Temperaturbereichen. Auf diese Weise werden in den ersten Zyklen hochspezifische Moleküle vervielfältigt, die anschließend für die exponentielle Amplifikation als Template zur Verfügung stehen. Da intra- und intermolekulare Vorgänge, die durch Temperaturerhöhung erzeugt werden jedoch nicht direkt kontrollierbar sind, wurde an Stelle einer konstant erhöhten Temperatur ein abnehmender Temperaturgradient genutzt. Primersysteme die bei einer bestimmten Annealing Temperatur etabliert waren, wurden mit einem Vorlauf von 10°C Temperaturerhöhung gestartet, welcher in jedem folgenden Zyklus 1°C abnahm und nach den ersten 10 Zyklen die ausgetestete Annealingtemperatur erreichte. Dem schlossen sich weitere 30 Zyklen mit konstanter Annealingtemperatur an.

Kolonie-PCR (Hofmann & Brian 1991) stellt eine schnelle und erste Überprüfungsmöglichkeit sowie Erfolgskontrolle beim Klonieren und nach BAC-Screening dar. Kolonie-PCR wurde mit Hotstar *Taq*-Polymerase durchgeführt, um die hierbei notwendige initiale Denaturierung bei 95°C für 15 min zur Aktivierung der Polymerase gleichzeitig zum Denaturieren der als Template verwendeten Zellen einer gepickten Kolonie zu nutzen. Bei einer Verwendung von gewöhnlicher *Taq*-Polymerase wurden die gepickten Zellen vorher denaturiert, indem sie in 60 µL Tris-Puffer (10 mM, pH 8) suspendiert und bei 99°C

für 1 min inkubierten. *E.coli* Zellen wurden entweder mit einer sterilen Pipette von einer Agarplatte mit Selektionsmedium gepickt oder wurden dem Anzuchtmedium entnommen. Da Vektor-Primer das gesamte Klonierungsprodukt flankieren, das durch seine Größe die Kapazität der *Taq*-Polimerase in einer PCR-Reaktion jedoch überfordern könnte, wurden sie nicht zur Kolonie-PCR eingesetzt. Die zum BAC-Bank- Screening genutzten PCR-Primern lieferten hier spezifischere Ergebnisse.

Long-range-PCR (Barnes *et al.* 1994) kann mit einer Mischung aus *Taq*-Polymerase und einer thermostabilen DNA-Polymerase mit Proofreading-Aktivität normale Größenlimitierung von Standard-PCR weit übertreffen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden anstelle kommerzieller Kits, mit vorhandenen PCR-Substanzen eigene Protokolle entwickelt, die in 2 separaten Volumina (Lösung I, Lösung II, siehe [Tabelle 3.4](#)) vorgemischt wurden. Nach einer initialen Denaturierung von 96°C für 15 min. von 'Lösung I' wurden die Reaktionsgefäße, im Cycler verbleibend, nochmals geöffnet und 'Lösung II' zugegeben. Durch mehrmaliges vorsichtiges Durchziehen des Pipettenhubs wurden die Lösungen gemischt und anschließend die Reaktionsgefäße wieder verschlossen. Dazu war ein Wartezyklus von 68°C für 2 min. im Temperatur-Programm des Cyclers vorgesehen. [Tabelle 3.4](#) zeigt ein derartiges Long-range PCR-Protokoll aus einem in zwei Teile getrennten 50 µL Ansatz, mit dem dazugehörigen Cycler-Temperatur-Protokoll in [Tabelle 3.5](#) in Form einer Touch-down-PCR.

Tabelle 3.4: Long-range PCR-Protokoll aus einem in zwei Teile getrennten 50 µL Ansatz.

Lösung I	Konzentration Stock	Volumen Reaktion	Konzentration Gesamtreaktion
H ₂ O	-- --	1,25 µL	-- --
DMSO	100 %	0,75 µL	1,5 %
Glycerol	50 %	8,00 µL	8,0 %
dNTP	2,0 mM	7,50 µL	0,3 mM
Primer 1	10 pM	5,00 µL	1,0 pM
Primer 2	10 pM	5,00 µL	1,0 pM
DNA	50 ng/µL	2,50 µL	125 ng
gesamt		30,00 µL	

Lösung II	Konzentration Stock	Volumen Reaktion	Konzentration Gesamtreaktion
H ₂ O	-- --	13,75 µL	-- --
Puffer	mit 15 mM MgCl ₂ 10 x	5,00 µL	1 x
MgCl ₂	25 mM	--- µL	1,5 mM
<i>Taq</i>	5 U/µL	1,00 µL	2 U
<i>PWO</i>	1 U/µL	0,25 µL	0,1 U
gesamt		20,00 µL	

Tabelle 3.5: Cyclor-Temperatur-Protokoll zur Long-range-PCR

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen	
1	96°C	15'	x 1	
2	68°C	2'	x 1	(Wartezyklus)
3	92°C	10''	x 30	
4	62-50°C	30''		
5	68°C	7'		
6	68°C	30'	x 1	
7	4°C	∞		

3.2.2.1.4 Aufreinigen der PCR Produkte

PCR-Produkte wurden vor einer weiteren Verarbeitung zum Sequenzieren, zur Entfernung überschüssiger Primer, restlicher Puffer-Salze und nicht eingebauter dNTP über QIAquick Säulen, Wizard® SV Gel und PCR Clean-Up System Säulen oder über Montage™ PCR Centrifugal Filter Devices nach Protokollen der Hersteller aufgereinigt. Zur Konzentrationsbestimmung und als Kontrolle des Vorkommens von Nebenprodukten wurden PCR-Produkte bereits bei Etablierung aber in der Regel erneut vor der Sequenzierung auf einem Agarosegel überprüft.

3.2.2.2 Screening von BAC-Banken

Die Screens wurden durchgeführt als Hybridisierung radioaktiv markierter Sonden an High-density Filter mit anschließendem Autoradiogramm zur Sichtbarmachung, sowie PCR-Screening von DNA-Pools mit anschließender Agarosegel-Elektrophorese. PCR-Systeme wurden vor einem Screening mit genomischer DNA als eine Funktionsüberprüfung ausgetestet. Das Volumen einer PCR-Reaktion war dabei auf 20 µL standardisiert.

3.2.2.2.1 PCR Pool-Screening

Nach dem typischen Aufbau eines DNA-Pool als BAC-Bank müssen einzelne Klone in zwei getrennten Screening Schritten (1. primary screen, 2. secondary screen) aufgefunden werden. Dabei erfolgt das Screening der DNA-Pools durch Amplifikation des locus-spezifischen DNA-Fragmentes aus der Insert-DNA des BAC. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die BAC-Banken RZPD_B750 bestehend aus 45 Primary-Pools und RZPD_B754 bestehend aus 27 Primary-Pools zur BAC-Klonsuche genutzt.

Primary Pool-Screening: In einem ersten Schritt wurden die lyophilisiert gelieferten Primary Pools in 5 µL ddH₂O aufgenommen und ü.N. gelöst. Aus dieser Stocklösung

wurden Arbeitsverdünnungen von 1:50 mit ddH₂O hergestellt. Aus diesen Arbeitsverdünnungen wurden pro 20 µL PCR-Ansatz 1 µL als Template eingesetzt. In jedem einzelnen Primary-Pool ist die BAC-DNA aus acht 384 well Mikrotiterplatten vereinigt. Auf diese Weise wird mit diesem ersten PCR-Durchgang rekonstruiert, in welcher 8er-Einheit von Mikrotiterplatten sich der positive BAC-Klon befindet. Deshalb wird pro Auffindung eines Klons nur ein Signal erwartet. Das PCR-Resultat wird auf einem Agarosegel durch Elektrophorese überprüft und dargestellt.

Secondary Pool-Screening: In einem zweiten Schritt werden die gelieferten Secondary Pools in 50 µL ddH₂O aufgenommen und ü.N. gelöst. Aus diesen Stocklösungen werden Arbeitsverdünnungen von 1:5 mit ddH₂O hergestellt. Aus diesen Arbeitsverdünnungen werden pro PCR-Ansatz 5 µL als Template eingesetzt. Jeder Secondary-Pool wird auf einer zur Hälfte belegten 96 well Mikrotiterplatte, d.h. in insgesamt 48 Wells geliefert. Diese Anzahl setzt sich zusammen aus 8 Wells mit je einer DNA-Mischung von je einer der acht detektierten Mikrotiterplatten, in je 24 Wells befinden sich die DNA-Mischungen der vereinigten gleichen Spaltennummern und in den verbleibenden 16 Wells die DNA-Mischungen der vereinigten gleichen Reihenummern aller acht Mikrotiterplatten. Auf diese Weise legt der Secondary Screen fest auf welcher der acht Platten (1. Signal), in welcher der Reihen (2. Signal) und in welcher der Spalten (3. Signal) sich der gesuchte Klon befindet. Durch die multiple Genomabdeckung der BAC-Banken ist es durchaus möglich mehrere Klone zu finden, deren Inserts die gesuchte Sequenz beinhalten. Ebenso besteht aber auch die Möglichkeit, dass bestimmte Teile des Genoms nicht in der BAC-Bank enthalten sind.

3.2.2.2 Radioaktives Filterscreening

Im radioaktiven Screening nach BAC-Klonen mit chromosomalen Inserts aus der centromerischen Region von *BTA14* konnten die BAC-Banken RZPD_B750 (Zhu *et al.* 1999) und RZPD_B754 (Buitkamp *et al.* 2000) sowie BAC-Bank RPCI_42 (Warren *et al.* 2000) genutzt werden. Aufgebaut waren die BAC-Banken aus der Leukozyten-DNA eines Jersey Kalbes (RZPD_B750) sowie zweier Holstein Kälber (RZPD_B754, RPCI_42). Die errechneten Genomäquivalente betragen nach Angaben der Autoren 3-fache (RZPD_B754), 5-fache (RZPD_B750) und 10-fache (RPCI_42) Genomabdeckung mit mittleren Insertlängen von 105 kb (RZPD_B750), 112 kb (RZPD_B754) und 164 kb (RPCI_42).

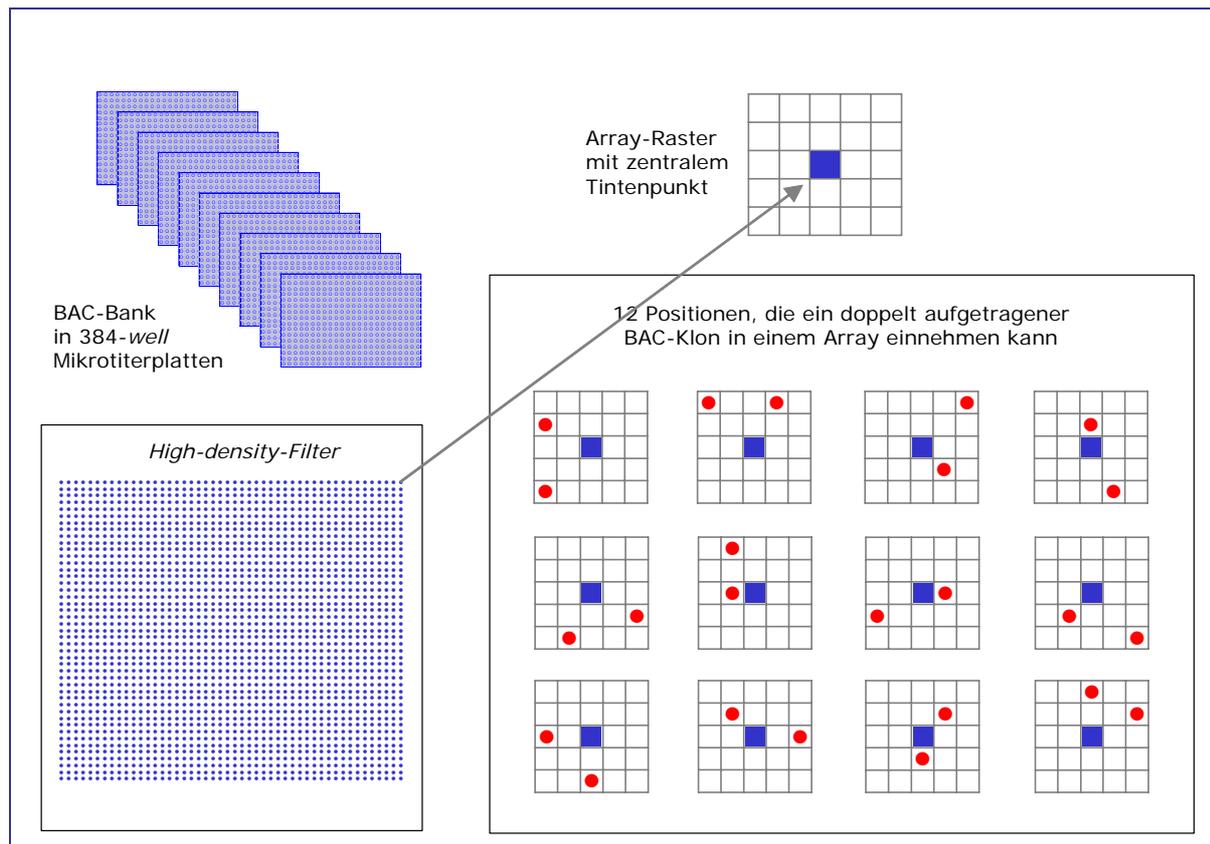


Abbildung 3.5: Aufbau eines High-density-Filters der BAC-Bank RZPD_B754. Die Klone, einer in 384-well Mikrotiterplatten gelagerten BAC-Bank, werden 2-mal pro Array aufgetragen. Jeder Array besteht aus $5 \times 5 = 25$ Feldern. Zentral wird ein Orientierungspunkt aus Tinte (■) erzeugt. Alle 24 verbleibenden Felder werden mit BAC-Klonen belegt, wodurch sich 12 mögliche Hybridisierungsmuster (●) für jeden BAC-Klon ergeben. Auf jedem high-density Filter befinden sich $48 \times 48 = 2304$ Arrays, die jeweils durch einen Orientierungspunkt (■) markiert sind.

Mit *EcoRI* partial verdaute und anschließend gröbenselektierte DNA war bei allen drei BAC-Banken zwischen die *EcoRI*-Klonierungsstellen (GAATTC) des pBACe3.6 Vektors (Freggen *et al.* 1999, Genbank: U80929) ligiert. Dieser Vektor stellt eine Weiterentwicklung des Vektors pBAC108L dar (She 2003). Die Ligationsprodukte waren in elektrokompente *E.coli* Zellen transformiert. Die Filter bestanden aus positiv geladenen, 22x22 cm großen Array gerasterten Nylonfiltern (Abb. 3.5).

Screening Sonde: Zum BAC-Bank Screening wurden PCR Produkte als Sonden genutzt, die wie oben (3.2.2.2) beschrieben erzeugt wurden. Die PCR Produkte waren von Primer und dNTP-Resten mit QIAquick PCR-Purification Kit aufgereinigt.

Markierung der Sonde: Die Markierung der PCR-Produkte erfolgte mit dem Kit Megaprime™ DNA labelling Systems durch enzymatische Neusynthese des DNA-

Doppelstrangs der Sonde und Einbau des Nukleotid Deoxyadenosine-5'-(α -³²P)-triphosphat. Ein PCR-Produkt wurde auf 40 ng und 21 μ L eingestellt und anschließend bei 99°C für 5 min., zusammen mit 5 μ L PrimerMix (Random Nanomer Primer) denaturiert. Nach dem Abkühlen auf Eis wurden 5 μ L 10x Reaktionspuffer, 4 μ L pro dGTP, dCTP und dTTP, 2 μ L Klenow Fragment (1U/ μ L) und 5 μ L [α -³⁵P]dATP (1,85 kBp) der Reaktion zugegeben. Die Reaktion wurde bei 37°C für 15 min. inkubiert und anschließend durch Zugabe von 10 μ L 0,2 M EDTA (pH 0.8) abgestoppt. Abschließend wurde die Reaktion für 7 min. bei 95°C denaturiert.

Dot-Blot als Positivkontrolle: Je 2 μ L unverdünntes, und 10fach verdünntes PCR-Produkt wurden auf Nylonmembran geblottet, die vorher in 0,4 N NaOH getränkt war. Nach 5 min. Einwirkzeit wurde der DotBlot leicht, für 1 min., in 5x SSC Puffer geschwenkt.

Vorhybridisierung und Hybridisierung: Die Filter der BAC-Bank, gemeinsam mit den Dot-Blots, wurden in verschraubbare Hybridisierungs-Glasröhren derart eingelegt, dass sie sich durch die Drehrichtung der Röhrenhalterung im Hybridisierofen nicht zusammenrollten und bei 70°C vorhybridisiert: Zwei Filter pro Glasröhre mit 10-20 mL Church-Buffer (Church *et al.* 1984): 5% SDS, 1 mM EDTA, 0,34 M Na₂HPO₄ und 0,16 M NaH₂PO₄. Nach 30 min. wurden 17 μ L radioaktiv markierte Probe zugegeben und hybridisierte in 10 mL Church-Buffer bei 67°C ü.N. (14-16 h) an die Filter. Nach erfolgter Hybridisierung wurden die Filter zweimal in 2x SSC und ein drittes Mal in 0,5x SSC mit 1% SDS für 20 min. bei 63°C gewaschen. Abschließend wurde jeder Filter mit 2x SSC gespült, in Haushaltsklarsichtfolie verpackt und auf einem gebrauchten Blatt Röntgenfilm als Trägerfolie fixiert.

Detektion: Gemeinsam mit einem neuen Blatt Röntgenfilm NewRX wurde der Filter in eine Röntgenfilmkassette für 5-8 Stunden bei -81°C exponiert. Dem schloss sich eine fotografische Entwicklung der Filme im Fotolabor des Lehrstuhls für Tierzucht (TU-München) nach Angaben des Herstellers an. Nach den mitgelieferten Anleitungen der Hersteller der entsprechenden BAC-Banken wurden Signale auf den entwickelten Filmen, von positiven BAC-Klonen zu ihrer Lokalisierung in der 384 well Mikrotiterplatte aus der sie ursprünglich auf den high-density Filter gespottet worden waren, zurückverfolgt. Die jeweiligen Klonbezeichnungen setzen sich zusammen aus Plattenummer, Plattenzeile und Plattenspalte. Mit Kolonie-PCR und dem Primersystem der Hybridisierungssonde wurde wie oben (3.2.2.1.3) beschrieben überprüft, ob die Klone das gesuchte Insert trugen.

3.2.2.3 Präparation von BAC-DNA

Bei allen drei in dieser Arbeit genutzten BAC-Banken wurde der *E.coli* Bakterienstamm DH10B als Plasmid-Host genutzt.

3.2.2.3.1 Kultur von *E.coli* (DH10B)

BAC-Klone wurden nach erfolgreichem Screening beim RZPD bzw. BACPAC-Resources bestellt und kamen in 1 mL Selektivmedium LB-Stabs aus Standard LB-Medium mit 0,7% Agar und 20 µg/mL Chloramphenicol. 10 µL wurden mit einer sterilen Pipettenspitze entnommen und auf 37°C warme, frisch gegossene Kulturplatten aus Standard LB-Medium mit 10 g Bactotrypton, 10 g NaCl, 5 g Bactoyeast mit 1,5 % Agar, 20 µg/mL Chloramphenicol und mit einem pH Wert von 7.2, mit einer ausgeglühten Vereinzelungsöse aus Platindraht ausgestrichen. Nach 37°C ü.N. Kultur (12-24 h) wurde eine normal gewachsene Kolonie mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und in 3 mL sterilisiertem Standard LB-Medium mit 20 µg/mL Chloramphenicol bei 37°C und 300 rpm auf der Schüttelplatte kultiviert. Aus der 8-10-stündigen logarithmischen Wachstumsphase der Kultur, wie in [Abbildung 3.6](#) gezeigt, wurden 850 µL entnommen und in ein vorbereitetes, mit den Klon ID-Daten etikettiertes und autoklaviertes 1,8 mL Schraubgefäß mit 150 µL Glycerol 100% eingefüllt, verschlossen und leicht gevortext. Diese Glycerol Bakterien Stocks lagern bei -71°C. Zur Überprüfung der erfolgreichen Herstellung der Bakterien Stocks, wurden aus dem Rest der Bakterienkultur 3 µL in einer Kolonie-PCR als Template eingesetzt.

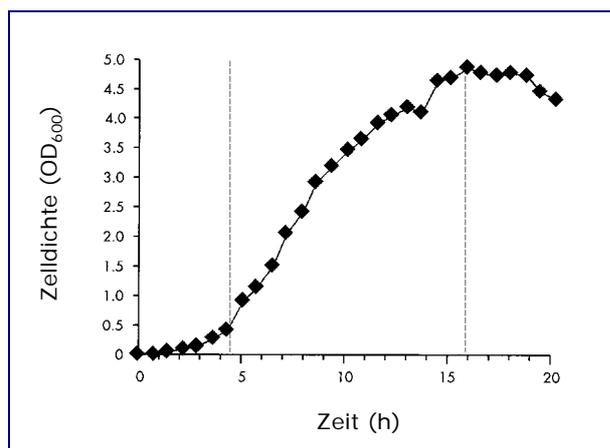


Abbildung 3.6: Wachstumskurve von *E.coli* in LB-Medium am Beispiel des Bakterienstammes DH5αTM mit Plasmid pUC21 (QIAGEN News 4/1998, verändert). Der Zeitabschnitt der logarithmischen Wachstumsphase ist zwischen unterbrochenen Linien auf der x-Achse gekennzeichnet.

Zur Isolation von BAC-DNA wurden 10 µL dem bei -71°C gelagerten Glycerol Bakterien Stock entnommen und wie oben beschrieben auf Kulturplatten mit Selektivagar ausgestrichen und ü.N. kultiviert. Eine normal entwickelte Kolonie wurde mit einer sterilen

Pipettenspitze gepickt und in 3 mL Selektiv-LB-Medium 8-10 h bei 37°C, 300 rpm kultiviert. Aus dieser Vorkultur wurden anschließend 1,5 mL als Animpfkultur in 1 L auf 37°C vorgewärmtes Selektiv-LB-Medium (1:750) gegeben und dieses ü.N. (12-16 h) bei 37°C, 300 rpm in 2 L großen Erlenmeyerkolben (für maximalen Luftraum) kultiviert.

3.2.2.3.2 Isolation von BAC-DNA

Die Binde-, Wasch- und Elutionspuffer der in kommerziell angebotenen Plasmid Präparationskits sind in ihrer Wirksamkeit und Effizienz stark von ihren pH-Werten abhängig. Aus diesem Grund erbringen frische Kits die höchste DNA-Ausbeute, da die Puffer nicht überaltert sind. BAC gehören generell zu den low-copy Plasmiden, da das *E.coli* F-Faktor Replikon die Anzahl von BAC auf 1 bis 2 Kopien pro Zelle limitiert (Kelley *et al.* 1999). Um die Anzahl der Plasmidkopien pro Zelle zu steigern wurde im pBACe3.6 Vektor das P1 Replikon in F' durch ein entfernbare high-copy Replikon aus einem pUC19 Insert ersetzt (She 2003). Durch die Nutzung der *EcoRI*-Restriktions-Schnittstellen als Klonierungsstellen besteht jedoch die Möglichkeit einer erneuten low-copy Replikation. Um DNA-Ausbeuten bei der Präparation zu steigern wurden jeweils zwei 50 mL Volumina Bakterienkultur für den DNA-Bindeschritt pro Säule vorbereitet, und nach dem folgenden Protokoll verarbeitet.

Protokoll: MIDI-Präparation nach Qiagen (Hilden, Germany) Angaben (verändert):

- 1 Verfüllen der frischen Bakterienkultur in 50 mL Zentrifugengefäße (Falcon-Tubes).
- 2 Pelletieren der Bakterien durch Zentrifugieren bei 6000 x g, 4°C, 15 min.
- 3 Überstand verwerfen und gründliches Resuspendieren der Pellets in 4 mL kaltem Puffer 1 (P1) mit 100 µg RNase A pro mL Puffer auf Eis.
- 4 Lyse der Bakteriensuspension mit 4mL frischem RT warmem Puffer 2 (P2) für 5 min bei RT.
- 5 Abstoppen der Lyse und Präzipitation durch Zugabe von 4 mL kaltem Puffer 3 (P3) und Inkubation auf Eis für 15 min.
- 6 Pelletieren von Zellbestandteilen und Proteinen durch Zentrifugation bei 20000 x g, 4°C, 30 min
- 7 Vorsichtiges und präzipitatfreies Dekantieren des Überstandes in einen ddH₂O angefeuchteten Faltenfilter

- 8 Zwischenzeitlich Equilibrieren des Silica-Pads in den Säulen mit 4 mL QTB-Puffer
- 9 Binden der Plasmid-DNA an das Silica-Pad durch Einfüllen des filtrierten Überstandes in die equilibrierte Säule
- 10 Pro Säule werden 2 filtrierte Überstände eingefüllt (Silica-Pad bleibt ca. 3 h bindefähig)
- 11 2 maliges Waschen der DNA mit jeweils 10 mL QC-Puffer bei RT
- 12 Lösen der Plasmid-DNA von dem Silica-Pad, Elution der DNA mit 65°C vorgewärmten QF-Puffer
- 13 Präzipitation der Plasmid-DNA durch Zugabe von 3,5 mL Isopropanol zum Eluat, Schwenken und Zentrifugation bei 5500 x g, 4°C, 60 min.
- 14 Verwerfen des Überstandes und 2 maliges Waschen des Präzipitates durch Zugabe von jeweils 5 mL 70% ETOH und Zentrifugation bei 15000 x g, 4°C, 15 min.
- 15 Überstand verwerfen und Pellet lufttrocknen für 10 min.
- 16 ü.N. lösen in 30 µL 10 mM Tris-HCL, pH 8.0

Die Überprüfung der Ausbeute wurde durch Messung der Konzentration von Plasmid-DNA (MIDI-Präparation) in einem Fluorometer durchgeführt und Ausbeuten von bis zu 85 ng/µL Plasmid-DNA bestätigt. Zur Kontrolle der Plasmid-Inserts wurden 3 µL Plasmid-DNA mit 4 U des Enzyms *NotI* ü.N. in 30 µL Gesamtvolumen verdaut und anschließend auf einem 1 % Agarosegel bei 1,6 V/cm, für 20 h elektrophoretisch aufgetrennt. Durch die im Vektor pBACe3.6 eingebauten *NotI*-Schnittstellen wurde beim Verdau die Plasmid-DNA in zwei Teile, den Vektor und das Insert zerlegt. Genomweit treten *NotI*-Schnittstellen in Säugetier DNA alle 1000-1500 kb auf (Sambrook *et al.* 1989). Durch zufällig häufiger auftretende *NotI*-Schnittstellen in genomischer DNA können klonierte Inserts in mehr als ein Fragment zerschnitten werden, die dann auf einem Agarosegel nach elektrophoretischer Auftrennung als multiple Banden erscheinen.

3.2.2.3.3 DNA Quantifizierung mittels Fluoreszenzemission

Vor Beginn der Messung wurde das Fluorometer kalibriert. Dazu wurden 200 ng Calf Thymus DNA (100 µg/mL in ddH₂O) als Referenz-DNA verwendet. Zur Quantifizierung wurden je 2 µL DNA in 2 mL TNE-Messlösung (pH 7.4, 10 mM Tris, 1 mM EDTA Na₂·2H₂O, 0,2 mM NaCl, 0,1 g/mL Hoechst H 33258 (Bisbenzimid)) in einer Küvette

gemischt. Gemessen wurde bei einer Exzitationswellenlänge von 350 nm und einer Emissionswellenlänge von 456 nm. Im Konzentrationsbereich von 10-500 ng/ μ L DNA, war für die oben beschriebene TNE-Messung, die gemessene DNA Konzentration proportional zur gebundenen Hoechst-H33258 Menge im DNA Doppelstrang. Nach der DNA-Messung wurden die Proben auf eine Konzentration von 25 ng/ μ L mit TE (pH 8.0) eingestellt und zur Überprüfung auf einem 0,8 % Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

3.2.2.3.4 Aufreinigen von BAC MIDI-Präparation

Die in der MIDI-Präparation gewonnene BAC-DNA musste vor der weiteren Nutzung entsalzt und konzentriert werden. Dazu wurden die Proben in Microcon YM-100 Filtern bei 500 x g für 15 min. und für weitere 10 min. nach der Zugabe von 250 μ L Tris Puffer (10 mM, pH 8.0) zentrifugiert. Zur Rückgewinnung der BAC-DNA wurde der Filter umgedreht auf ein frisches Reaktionsgefäß gesteckt und nach der Zugabe von 50 μ L TE Puffer bei 500 x g für 5 min. zentrifugiert.

3.2.2.4 BAC-Fingerprint Analyse

Im Wesentlichen wurde versucht, die in der Publikation von Marra *et al.* (1997) zur Verfügung gestellte Information auf die eigene Versuchsanstellung zu übertragen. Dazu wurden für jeden BAC-Klon von frischen und inkubierten Ausstrichen auf Selektiv-Agar jeweils 3 Klone gepickt, in selektivem LB-Medium angezogen und daraus MINI-Präparationen hergestellt.

Aus MINI-Präparationen, die mit Microcon YM-100 Filtern entsalzt und aufkonzentriert waren, wurden pro BAC-Klon 2 μ L mit jeweils 5 U *EcoRI* bzw. *HindIII* in 20 μ L Ansätzen bei 37°C über Nacht verdaut. 1x TBE wurde in einer wasserkühlbaren Elektrophoresekammer mittels eines Kryostaten konstant auf einer Temperatur von +0,5°C gehalten. Darein eingelegt wurde ein 18,5 x 40 cm großes Gel aus 0,8 % Agarose. Pro Tasche wurden 10 μ L Verdau geladen. Jeweils drei Klone eines BAC wurden immer alternierend mit einem DNA-Größenmarker geladen. Als DNA-Marker wurden 5 μ L eines DNA-Marker-Mix geladen, die kurz vorher für 5 min bei 60°C denaturiert wurden. Dieser Marker-Mix bestand zu gleichen Teilen aus GeneRuler DNA Ladder Mix und Lambda Mix Marker 19, die auf eine Konzentration von 0,5 mg/mL verdünnt waren. Die aktiv auf 0,5°C gekühlte Elektrophorese lief mit 3 V/cm für 15 - 24 h.

In Ethidiumbromid eingelegte und anschließend gewässerte Gele wurden auf einem BioDocAnalyse-System unter kurzweiligem UV-Licht (310 W, 50 Hz) mit Hilfe einer

Videokamera abgebildet und elektronisch gespeichert. Diese Abbildungen wurden anschließend in einer 1:2 Vergrößerung der Originalgröße des Gels ausgedruckt. Die Auswertung der Gelbilder bestand im Auffinden und Zuordnen von Gelbanden gleicher Größe bzw. Lauflänge zwischen den BAC-Klonen und wurde manuell durchgeführt.

3.2.2.5 Subklonierung von PCR-Produkten

Die Subklonierung wurde mit dem TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing nach folgenden Protokoll durchgeführt:

Ligationsansatz:

4 µL frisches PCR-Produkt, 1 µL Salzlösung, 1 µL TOPO-Vektor.

Ligation:

- 1 Den Ligationsansatz vorsichtig mischen und 5 Minuten bei RT (22-23°C) inkubieren.
- 2 Den Ligationsansatz auf Eis stellen.

Transformation:

- 3 2 µL des Ligationsansatzes in ein Eppendorf-Cup mit chemisch kompetenten Zellen geben und vorsichtig mit der Pipettenspitze rühren. Nicht durch auf- und abpipettieren mischen.
- 4 Danach für 5 bis 30 min auf Eis inkubieren. (Längere Inkubationszeiten haben keine Auswirkungen auf Transformationseffizienz)
- 5 Anschließend die Zellen für 30 sec. einem Hitzeschock von 42°C aussetzen, ohne zu schütteln.
- 6 Unverzüglich (!) danach die Zellen auf Eis stellen.
- 7 250 µL raumtemperiertes SOC-Medium zugeben.
- 8 Das Eppendorf-Cup dicht verschließen und waagrecht für 1 h, 200 rpm, 37°C schütteln.
- 9 10 bis 50 µL einer jeden Transformation werden auf vorgewärmten LB-Agar-Platten ausgestrichen und bei 37°C Ü.N. inkubiert. LB-Agar muss adäquates Antibiotikum, sowie X-GAL zur Blau/Weiß-Selektion enthalten. (Um bei kleinen Volumina ein gleichmäßiges Ausstreichen zu gewährleisten, kann 20 mL SOC Medium zugegeben werden. Es ist vorteilhaft zwei unterschiedliche Volumina auf zwei verschiedenen Platten auszustreichen um zu garantieren, dass wenigstens eine Platte Kolonien in ausreichendem Abstand aufweist)
- 10 Zur Plasmid-Präparation weiße normal gewachsene Kolonien picken und anziehen.

3.2.2.6 DNA Sequenzierung

Die DNA Sequenzierreaktionen wurden nach der Kettenabbruch-Methode nach Sanger (Sanger *et al.* 1977) auf einem GeneAmp® PCR System 9600 durchgeführt, die Polyacrylamidgel-Elektrophorese, Signaldetektion und Auswertung auf einem

ABI PRISM® 377. Als Sequenzierchemie wurde das BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit genutzt.

3.2.2.6.1 Sequenzierreaktion

In Sequenzierreaktionen mit einem Volumen von 20 µL wurden in Cycle-Sequencing-Enzymreaktionen von 30 bis 100 Zyklen, mit fluoreszenten dye-label Terminatoren am 3'-Ende versehene Sequenzkettenfragmente amplifiziert, die anschließend in einer Polyacrylamidgel Elektrophorese (Kapitel 3.2.2.6.3) über 5 bis 8 h in einem ABI PRISM®377 Sequencer aufgetrennt wurden. Zur Detektion regt ein Argonionen Laser die Dye-Label an. Diese emittieren daraufhin Wellenlängen von 532 nm (blau), 563 nm (grün), 595 nm (gelb), 620 nm (rot), die von einer Kamera aufgefangen und durch ein Computersystem dargestellt werden. Gelesen werden diese Dateien entweder direkt am angeschlossenen Computersystem, können aber auch auf einem PC mit Hilfe des Programms Chromas dargestellt und bearbeitet werden.

PCR Direktsequenzierung: Zur Sequenzierung von aufgereinigten PCR-Produkten wurden entweder PCR-Primer oder speziell gelegte Sequenzierprimer als interne Primer in einer Größe von 20 bis 24 bp eingesetzt. Dadurch waren unterschiedliche Annealingtemperaturen in der Cyclesequencing-Reaktion notwendig, wie in [Tabelle 3.6](#) gezeigt.

Tabelle 3.6: Unterschiedliche Sequenzier-Annealingtemperaturen nach Primergrößen

Annealingtemperatur 50°C	Primer ≤ 20 mer
Annealingtemperatur 55°C	Primer 20 – 23 mer
Annealingtemperatur 60°C	Primer ≥ 23 mer

Die Konzentrationsschätzung von PCR-Produkten wurde mit Hilfe von 1,5-2%igen Agarosegelen (Sambrook *et al.* 1989) vorgenommen. Dabei diente der DNA-Größenmarker pUC 8 als Referenzgröße. Waren auf dem Gel Nebenproduktbanden sichtbar, so konnte die Sequenzierung durch intern gelegte Primer erfolgen.

Tabelle 3.7: Sequenzieransatz für PCR-Direktsequenzierung

	Konzentration Stock	Volumen Reaktion	Konzentration Reaktion
H ₂ O HPLC	-- --	11,0 µL	-- --
BigDye Terminator v1.1	o. A.	4,0 µL	-- --
Verdünnungs- Puffer	10 x	2,0 µL	1 x
Primer	100 pM	1,0 µL	5 pM
PCR-Produkt	50 ng/µL	2,0 µL	2,5 ng
gesamt		20 µL	

Tabelle 3.8: Cycler-Temperatur-Protokoll zum Cycle-Sequencing von PCR Produkten

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
1	96°C	1' x	1
2	96°C	10"]	25
3	50-60°C	5" x	
4	60°C	4']	
5	4°C	∞	

Sequenzierung von BAC MIDI-Präparation und TOPO MINI-Präparation: Die Auswertungen der Gelelektrophoresen ergaben verlässliche Sequenzen zwischen 500-700 bp. Gegenüber den Angaben des Herstellers wurde die initiale Denaturierung von 2 min. auf 5 min., sowie die Anzahl der Zyklen von 30 auf 100 angehoben.

Die messenger-RNA des bovinen *CYP11B1*-Gens besteht aus 36 % AT und 64 % GC Nucleotiden. Die Substanz DMSO besitzt eine destabilisierende Wirkung beim Inter- und Intrastrang Reanealing der DNA und eignet sich aufgrund dessen dazu, den Ablesevorgang der *Taq*-Polymerase während des Annealing-Vorganges zu unterstützen (Winship 1989). Aufgrund dieser unterstützenden Wirkung beim Sequenzieren wurden der Sequenzier-Reaktion 5 % DMSO zugegeben.

Tabelle 3.9: Sequenzieransatz für *CYP11B1* BAC-MIDI und TOPO-MINI Präparation

	Konzentration Stock	Volumen Reaktion	Konzentration Reaktion
H ₂ O HPLC	-- --	9,0 µL	-- --
BigDye Terminator v1.1	-- --	8,0 µL	-- --
DMSO	100 %	1,0 µL	5 %
Primer	100 pM	1,0 µL	5 pM
PCR-Produkt	400 ng/µL	1,0 µL	2,5 ng
gesamt		20 µL	

Tabelle 3.10: Cycler-Temperatur-Protokoll zum Cycle-Sequencing von MIDI-/MINI-Präparationen

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
1	96°C	5' x	1
2	96°C	20"]	100
3	50-60°C	10" x	
4	60°C	4']	
5	4°C	∞	

Zu Sequenzierungen aus BAC-MIDI-Präparationen wurden Primer des Gens der jeweiligen genetischen Zielsequenz eingesetzt, zum Sequenzieren der Subklone die M13-Primer forward und reverse (Invitrogen, Karlsruhe) genutzt.

3.2.2.6.2 Aufreinigen der Sequenzierreaktion

Die Sequenzierreaktion musste vor dem Auftrennen in der Polyacrylamidgel Elektrophorese und Detektion der Fluoreszenzmarkierungen aufgereinigt werden. 20 µL Sequenzierreaktion von PCR-Direktsequenzierungen wurde mit 2 µL 3M NaAc (pH 4.6) und 50 µL EtOH (absolut) gefällt, mit 10000 x g, 20 min. bei RT zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde zweimal mit 150 µL 70 % EtOH gewaschen, mit 10000 x g, 5 min bei RT zentrifugiert und der Überstand verworfen. Offene Cups wurden anschließend im Heizblock bei 60°C 20 min. getrocknet, darauf hin geschlossen und bei -20°C bis zur Gelelektrophorese eingefroren.

Für BAC-DNA Sequenzierungen wurden zur Aufreinigung DyeEx™ 2.0 Spin Kit oder AutoSeq™ G-50 Säulen nach den Protokollen der Hersteller angewandt. Die gereinigten Produkte wurden ebenfalls im Heizblock bei 60°C 20 min. getrocknet.

3.2.2.6.3 ABI-Gelelektrophorese

Die ABI PRISM®377 Gelelektrophorese erfolgte als eine denaturierende Polyacrylamid Gelelektrophorese auf einem 5 % igen Polyacrylamidgel.

Tabelle 3.11: Zusammensetzung eines 5% igen PAA-Gels zur Sequenzanalyse auf einem ABI PRISM®377 Sequencer

	Harnstoff	21 g
30 %	Polyacrylamid (29 Teile Acrylamid : 1 Teil Bisacrylamid)	8,4 mL
10 x	TBE (Tris-Bor-EDTA-Puffer)	6 mL
HPLC	H ₂ O	20 mL
	Temed (Tetraethylmethylenediamin)	20 mL
10 %	APS (Ammoniumpersulfat)	300 µL

Die Elektrophorese wurde durchgeführt mit 2,5 kV, 50 mA und 48 W bei einer Temperatur von 51°C für 6-8 Stunden. Der Laser wurde mit 40 mW betrieben.

3.2.2.7 Typisierungen der PCR-RFLP

Die Typisierungen der *CYP11B1* und *DGATI* Allele wurde durch elektrophoretische Trennung der PCR-RFLP Verdaufragmente in Agarosegelen vorgenommen. Dort wandern

Fragmente aus linearer DNA mit einer Beweglichkeit, die sich invers proportional dem \log_{10} ihrer Größe in Basenpaaren verhält (J. Rinehart, URL 27). Fragmente wurden üblicher Weise durch Färbung der Gele mit Ethidiumbromid ($C_{21}H_{20}BrN_3$) und Durchleuchtung mit kurzwelligem UV Licht sichtbar gemacht und anschließend mit einer Videokamera mit Computeranschluss fotografiert. Die Dateien konnten in TIFF-Format gespeichert und durch einen Thermodrucker zur Auswertung ausgedruckt werden.

Typisierung *DGATI*-Gen: Das Typisierungssystem der Polymorphismen an Basenpaarpositionen 10433 und 10434 des *DGATI*-Gens wurde der Publikation Winter *et al.* (2002) entnommen. Dort repräsentieren auf dem Typisierungsgel die ungeschnittenen 411 bp großen Fragmente die Lysin Allelvariante (*DGATI*^K) und die verdauten Fragmente von 203 bp und 208 bp Größe die Alanin Allelvariante (*DGATI*^A).

Typisierung *CYP11B*-Gen: Zur Entwicklung von Primern, die in der Lage waren zwischen dem bovinen kodierenden *CYP11B1*-Gen und dem *CYP11B1*-Pseudogen in direkter Nähe (~30 kB) zu unterscheiden wurde eine 4 bp große Deletion (GAGG) in der 5'-Region der Pseudogen-Sequenz genutzt, die den Positionen -263, -264, -265 und -266 der Sequenz des kodierenden Gens entsprachen. Um sicherzustellen, dass die Primer sich selektiv und ausschließlich an dem kodierenden Gen anlagerten, wurde die genomische Sequenz der 5'-Seite der Deletion als Primer kopiert mit jeweils einem Nukleotid Versatz Richtung 3'-Seite pro Primer. Daraus ergaben sich die folgenden vier forward-Primer:

(245) forward 5'-ATACTGGAGGGGGAGGAGG-3'

(251) forward 5'-CATACTGGAGGGGGAGGAG-3'

(252) forward 5'-CCCATACTGGAGGGGGAGGA-3'

(253) forward 5'-TCCCATACTGGAGGGGGAGG-3'

Als Kontrollgruppe wurden zwei weitere Primer entworfen, die keines der deletierten Nukleotide enthielten, um selektiv nur in der Pseudogensequenz anzulagern.

(255) forward 5'-CATACTGGAGGGGGAGCCTC-3'

(256) forward 5'-ACTGGAGGGGGAGCCTCTTG-3'

Diese Vorgehensweise führte insgesamt zu sechs unterschiedlichen forward-Primern, die in separaten PCR-Systemen mit dem gleichen reverse Primer aus der Anfangssequenz des Introns 1 getestet wurden.

(195) reverse 5'-GGACAGAACGTGAGGGTGTT-3'

Von den Primerpaaren wurde erwartet, dass sie insgesamt sechs PCR-Fragmente unterschiedlicher Größe ergaben, wie in [Tabelle 3.12](#) gezeigt. Zu diesem Zweck wurde ein PCR-System in einem GeneAmp® PCR System 9600 mit 20 μ L Volumen entworfen. Eine

Reaktion enthielt 50 ng genomischer DNA, 0,5 U Hotstar-*Taq*, 1x Hotstar PCR Puffer, 1,5 mM MgCl₂, 150 µM von jedem dNTP, 0,5 pM von je einem forward und einem reverse Primer, sowie 5% DMSO aufgrund GC reicher PCR Produkte. Das PCR-Cyclerprofil bestand aus 1 Zyklus von 15 min bei 95°C, gefolgt von 10 Zyklen von 30 sec bei 94°C, 30 sec bei 72°C-62°C (1°C Temperaturabnahme bei jedem Zyklus) und 45 sec bei 72°C, gefolgt von 30 Zyklen von 30 sec bei 94°C, 30 sec bei 62°C und 45 sec bei 72°C, gefolgt von einem Zyklus von 10 min bei 72°C.

Tabelle 3.12: Erwartete Fragmentgrößen aus sechs selektiven PCR-Primersystemen

	Primerpaar	Fragmentgröße
kodierendes <i>CYP11B1</i> -Gen	245 / 195	568 bp
	251 / 195	570 bp
	252 / 195	571 bp
	253 / 195	572 bp
<i>CYP11B1</i> - Pseudogen	255 / 195	565 bp
	256 / 195	562 bp

SSCP: Für die SSCP-Technik wird doppelsträngige DNA in einzelsträngige DNA überführt und anschließend in nicht denaturierenden Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt. Um die Wirksamkeit der Selektivität der Primer zu überprüfen, wurden die Amplifikate von zwei Primerpaaren (245/195, 253/195) des kodierenden *CYP11B1*-Gens, die gegenüber den beiden anderen deutlich erhöhte Konzentrationen aufwiesen, sowie beide PCR-Produkte der Primerpaare des *CYP11B1*-Pseudogens (255/195, 256/195) in einem SSCP-Essay eingesetzt. Auf diese Weise sollten Konformationsunterschiede der amplifizierten Moleküle, wenigstens zwischen der Gruppe des kodierenden und der Gruppe des *CYP11B1*-Pseudogens nachgewiesen werden, die sich aufgrund der Deletion ergeben mussten.

Dazu wurden PCR-Produkte für 1 min bei 90°C in einem 95 % igen Formamid-Dye denaturiert und sofort in Eiswasser abgekühlt. Daran anschließend wurden die Fragmente elektrophoretisch in einem nicht denaturierenden 10 % Polyacrylamid₃₇ Gel mit 1 % Glycerol, in 0,5x TBE bei 5°C mit 650 V für 5 h in einem P9DS Pengiun System aufgetrennt. Anschließend wurden die Gele in Anlehnung an Bassam *et al.* (1991) in 10 % iger Essigsäure mit 15 % igem Ethanol fixiert und silbergefärbt und zusätzlich mit einer 0,04 M EDTA Stopplösung behandelt.

Als eine weitere Gewissheit der Selektivität der Primersysteme wurden die PCR-Produkte mit BigDye® Terminator v1.1 in einem GeneAmp® PCR System 9600 in 20 µL Volumen nach Angaben des Herstellers sequenziert und auf einem ABI PRISM®377 Sequencer elektrophoretisch aufgetrennt. Dazu wurden die PCR-Produkte mit Montage PCR Centrifugal Filter und die Sequenzierreaktionen mit DyeEx 2.0 Spin Kit aufgereinigt.

Zum Einsatz in der Genotypisierung der ADR-Familienmaterial-Population wurde das Primerpaar 245/195 ausgewählt. 2 µL PCR-Produkt von 568 bp Größe wurden dazu mit 3 U des Restriktionszyms *Pst*I (CTGCA▼G) in 20 µL Volumen ü.N. bei 37°C verdaut. Die Elektrophorese erfolgte in 2% Agarosegelen mit 4 V/cm in 0,5x TBE Puffer für 2 h. Danach repräsentierte die Kombination aus 442/103/23 bp großen Verdaufragmenten die Valin-Allelvariante (*CYP11B^V*) und die Fragmentkombination aus 371/103/71/23 bp die Alanin-Allelvariante (*CYP11B^A*).

3.2.2.8 Kartierungen der Gene *CYP11B1* und *CYHR*

Mit einer physischen und einer genetischen Kartierung wurden zwei Kartierungsarten genutzt: Durch Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) konnten das *CYP11B1*-Gen sowie das *CYHR*-Gen cytogenetisch kartiert werden. Anhand ihrer Typisierungsergebnisse konnten die Marker genetisch kartiert werden.

3.2.2.8.1 Physische Kartierungen (FISH)

Chromosomen Präparation: Bovine Fibroblasten eines Simmental-Bullen mit einer zentrischen Fusion einer Kopie von Chromosom *BTA14* mit einer Kopie von Chromosom *BTA20* (Karyotyp 57XY, Joerg *et al.* 2001) wurden unter Standardbedingungen nach einem Protokoll von Mather & Barnes (1998) kultiviert. Mitotische Zellen wurden mit KCl in der logarithmischen Wachstumsphase geerntet, bei 37°C für 13 min inkubiert und mit Methanol-Eisessig fixiert. Durch Auftropfen von 20 µL Zellsuspension auf eiskalte und mit 99 % EtOH gewaschene Objektträger wurden Metaphase Chromosomen präpariert.

Markieren der Proben: Die zu kartierenden Proben wurden den Angaben des Herstellers folgend durch Nick Translation (Rigby *et al.* 1977) mit Hilfe des GIBCO BRL® BioNickTMLabeling System Kits mit Biotin markiert. Chromosomale *in situ* Suppression (Lichter *et al.* 1990) wurde durch die Inkubation der gelabelten DNA mit 10 µg Lachssperma-DNA, 10 µg gescherter genomischer boviner DNA als Kompetitor-DNA und

99 % EtOH bei 20°C für 30 min erreicht. Das mit 150 µL 70 % EtOH gewaschene Pellet wurde anschließend in Hybridisierungsmix wieder gelöst.

Hybridisierung: Die Proben wurden für 5 min. bei 75°C denaturiert. Renaturierung der repetitiven Sequenzabschnitte mit Kompetitor-DNA wurde durch Inkubation bei 37°C für 30 min durchgeführt. Objektträger mit Metaphase Chromosomen wurden nun in 70 % Formamid für 1,5 min bei 71°C denaturiert. Dehydrierung der denaturierten Chromosomen wurde mittels Inkubation in einer Alkoholserie erreicht: 1 mal in 70 % EtOH eiskalt für 2 min, 1 mal in 90 % EtOH bei RT für 2 min und 2 mal in 99 % EtOH bei RT für 2 min. Nach dem Vorfotografieren der Metaphasen wurden Proben aufgetragen und mit einem Abdeckglas versiegelt. Die Hybridisierung erfolgte bei 37°C für 16 h.

Waschen und Inkubation: Nach dem Entfernen der Versiegelung wurden die Objektträger gewaschen: 2 mal in 2x SSC bei 37°C, 2 mal in 0,1x SSC bei 62°C, 2 mal in 2x SSC bei 37°C und 1 mal bei 37°C in 2x SSC mit 0,05 % Tween20. Die Detektion der Proben erfolgte mittels 150 µL Antikörpermischung Avidin-FITC (verdünnt 1:200) durch Inkubation bei 37°C für 20 min. Anschließend wurden die Objektträger 3 mal in 2x SSC mit 0,5 % Tween20 gewaschen. Die Gegenfärbung der Chromosomen mit DAPI erfolgte für 3,5 min und anschließend trockneten die Objektträger im Dunkeln. Zur Konservierung wurden die Objektträger mit Vectashield Mounting Medium versehen, einem Deckglas bedeckt und mit gewöhnlichem Nagellack versiegelt.

Mikroskopieren: Ausgesucht gleichmäßig verteilte Metaphasen wurden durch ein Zeiss Axioplan Mikroskop ausgestattet mit einer PXL-CCD-Kamera fotografiert. Die Einzelkanal-Fotos wurden mit dem Adobe Photoshop Programm unter Zuweisung von Falschfarben übereinander gelegt und gespeichert.

Identifikation der Chromosomen: Die Identifikation der Chromosomen für die Kartierung erfolgte aufgrund des Bandenmusters der Q-Bandenfärbung mit Fluoreszenzfarbstoff Quinacrin-mustard, die durch das Fotografieren ausgesuchter Metaphasen vor dem Hybridisierungsschritt festgehalten wurden. Im Vergleich mit dem standardisierten Karyotypen des Rindes, nach dem International System for Cytogenetic Nomenclature of Domestic Animals (ISCNDA) (Di Berardino *et al.* 1990) bzw. dem Texas Standard (Popescu *et al.* 1996) konnten anschließend Chromosomen identifiziert werden. Die hier verwendeten Metaphasen-Chromosomen trugen eine zentrische Fusion einer Kopie von Chromosom *BTA14* mit einer Kopie von Chromosom *BTA20* (Joerg *et al.* 2001). Auch durch diese Besonderheit konnten beide Chromosomen zweifelsfrei erkannt werden.

3.2.2.8.2 Genetische Kartierungen

Zur genetischen Kartierung wurde das Kartierungsprogramm CRIMAP Version 2.4 (Green *et al.* 1990) genutzt. Dieses UNIX-Programm wurde in einer für WINDOWS angepassten Form von L.V. Millon, University of California, Davis, CA, USA bezogen und auf PC eingesetzt. CRIMAP ist ein Programm mit einer Kartierungsfunktion für unbekannte Kopplungsphasen. Mit den Typisierungsdaten von 16 Typ I und Typ II Markern (*KIEL_E8*, *DGAT1*, *CYP11B1*, *GML+405*, *GML+573*, *ILSTS039*, *CSSM066*, *RM180*, *RM11*, *BM4630*, *RM192*, *BMS1899*, *BM4513*, *BL1036*, *INRA092*, *INRA100*, *CYHRI*) wurde mit der MULTIPOINT (BUILD) Option je eine geschlechtsspezifische (männliche) genetische Karte für die Rassen Dt. Holstein und für die Rasse Dt. Fleckvieh errechnet.

Im 'Parameter file' (.par) der BUILD Option wurden die Positionen der Marker *KIEL_E8*, *DGAT1*, *CYP11B1*, *GML+405*, *GML+573*, *ILSTS039*, *CSSM066* im centromerischen Bereich von *BTA14* nach ihrer Position in der physischen Karte des NCBI (BT-Build 3.1) angeordnet. Die Positionen der Marker *RM180*, *RM11*, *BM4630*, *RM192*, *BMS1899*, *BM4513*, *BL1036*, *INRA092*, *INRA100* wurde aus der Literatur übernommen (Thomsen *et al.* 2001, Bennowitz *et al.* 2003, Ihara *et al.* 2004). Die genetischen Distanzen zwischen den Markern wurden durch die BUILD Option im 'Build file' (.bld) ausgegeben. Unterschiede zu Literaturangaben konnten mit der FLIPSn Option bestätigt werden. FLIPS6 wurde angewendet bis die Markeranordnung mit der größten Wahrscheinlichkeit erreicht war. FLIPS3 wurde genutzt, um Revisionen der Markeranordnung nach dem Einfügen aller Marker zu testen.

Die Anzahl informativer Meiosen wurden mit der BUILD Option im 'Location file' (.loc) ausgegeben.

Der Test auf das Vorliegen von Hardy-Weinberg-Gleichgewicht für jeden Locus, das Kopplungsungleichgewicht zwischen Markern, sowie die Markerheterozygotie (Nei 1973) wurden mit dem online Programm 'Genepop' (Weir & Cockerham 1984) (Optionen 1, 2 & 5) aus den Genotypen errechnet (URL 17).

Der single-point 'Polymorphism Information Content' (PIC) (Botstein *et al.* 1980) für jeden Marker wurde mit dem CERVUS 3.0 Programm (Slate *et al.* 2000) aus den Genotypen errechnet.

3.2.3 Phänotypen

Die in dieser Arbeit ausgewerteten phänotypischen Daten bestanden aus geschätzten Zuchtwerten (Liu *et al.* 2000a / 2000b) und Sicherheiten (Liu *et al.* 2001) für alle Familien des ADR-Granddaughter-Design. Sie wurden von Vereinigte Informationssysteme Tierhaltung w.V. (VIT), Heideweg 1, 27283 Verden/Aller für die Rasse Dt. Holstein bezogen. Im Einzelnen beinhalteten sie die Zuchtwerte für die Merkmale Milchmenge, Fettmenge, Proteinmenge, Fettprozent, Proteinprozent, somatische Zellzahl, 16 Exterieurmerkmale, 6 Reproduktionsmerkmale und Nutzungsdauer. Die Exterieurmerkmale im Einzelnen waren: Milchcharakter, Größe, Körpertiefe, Stärke, Beckenneigung, Beckenbreite, Hinterbeinwinkelung, Klauen, Sprunggelenke, Hinterbeinstellung, Hintereuter, Zentralband, Vordereuteraufhängung, Eutertiefe, Strichlänge, Strichplatzierung vorne/hinten. Die Reproduktionsmerkmale bestanden aus Kalbeverlauf (paternal, maternal), Totgeburt (paternal, maternal), Non-return-rate 90 (paternal, maternal).

Produktions- und Exterieurdaten für Dt. Holsteins wurden der bundesweiten Evaluierung Februar 2004 und Fruchtbarkeitsdaten der Evaluierung August 2003 entnommen.

3.2.4 Statistische Methoden

Das Programmpaket "SAS" (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) wurde zur Berechnung der ANOVAs und Regressionen verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurde mit den Prozeduren *FREQ*, *MEANS*, *GLM*, *STEPWISE* und *CORR* gerechnet.

3.2.4.1 Regressions-Analyse des gemeinsamen Einflusses von genetischen Effekten der Marker *DGATI* und *CYP11B1* auf Milchproduktion, somatische Zellzahl, Fruchtbarkeit und Nutzungsdauer in Dt. Holstein Rindern

Da Abstammungen im Halbgeschwister-ADR-Familienmaterial nur auf der väterlichen Seite verfügbar war, wurden $DGATI^{K+A}$ und $CYP11B^{V+A}$ Allelfrequenzen mütterlicher Herkunft in den Söhnen geschätzt. Bei den Nachkommen homozygoter Väter wurden Frequenzen direkt von den Genotypen der Söhne abgeleitet. Bei Nachkommen heterozygoter Väter konnten Allele mütterlicher Herkunft nur dann zweifelsfrei bestimmt werden, wenn die Söhne homozygot waren. Aus diesem Grunde wurde eine 'Maximum-Likelihood-Procedure' angewendet (Thaller *et al.* 2003), um Allelfrequenzen zu schätzen

$$p = \frac{n'_{11} + n_{12}}{n'_{11} + n_{12} + n'_{22} + n_{22}} \quad (1)$$

wobei p die Allelfrequenz der *CYP11B1* Valin Allelvariante (V=1, A=2) bzw. die *DGATI* Lysin Allelvariante (K=1, A=2) repräsentiert und n'_{11} und n'_{22} jeweils die Anzahl der homozygoten (11, 22) Söhne innerhalb heterozygoter Väter darstellen. n_{12} und n_{22} sind jeweils die Anzahlen der heterozygoten (12) und homozygoten (22) Söhne innerhalb homozygoter (11, 22) Väter. Die komplette Anzahl Söhne mit alternativen Genotypen über jeweils alle homozygoten und heterozygoten Väter wurde zur Bestimmung der Allelfrequenzen genutzt.

Die Deregression der geschätzten Zuchtwerte (*DRZW*) für alle Merkmale wurde anhand einer Näherung von Thomsen (persönliche Mitteilung) durchgeführt:

$$DRZW_i = \frac{1}{S_i} \cdot ZW_i \cdot 0,5 \quad (2)$$

wobei $DRZW_i$ der deregressierte relative geschätzte Zuchtwert von Sohn i , ZW_i der relative geschätzte Zuchtwert des Sohnes i und S_i die Sicherheit des relativen geschätzten Zuchtwertes von Sohn i ist (Kühn *et al.* 2003).

Die unterschiedliche Anzahl Töchter pro Vater, die zur Kalkulation der deregressierten Zuchtwerte beitrugen, wurde durch einen Wichtungsfaktor (W) berücksichtigt:

$$W = \frac{n}{1 + (n-1)\frac{1}{4}h^2} \quad (3)$$

in welchem die Anzahl der effektiven Töchter eines jeden Vaters, die zur Kalkulation des deregressierten Zuchtwertes beitrugen gleich n ist, und h^2 die Erblichkeit des jeweiligen Merkmals darstellt.

Für deregressierte Zuchtwerte der Reproduktionsmerkmale musste eine ungewichtete Analyse durchgeführt werden, da die effektive Töchterzahl durch das Rechenzentrum nicht mitgeteilt werden konnte.

Gensubstitutionseffekte ($\alpha/2$), definiert wie in Falconer und Mackay (1996), wurden für *CYP11B1*^V und *DGATI*^K mit den folgenden fixen Modellen geschätzt:

Regressions-Modell der *CYP11B1* Effekte

$$y_{ij} = \mu + Vater_i + b_1 \cdot x_{ij} + e_{ij} \quad (4)$$

Regressions-Modell der *DGATI* Effekte

$$y_{ij} = \mu + Vater_i + b_2 \cdot z_{ij} + e_{ij} \quad (5)$$

Regressions-Modell der gemeinsamen *CYP11B1* und *DGATI* Effekte

$$y_{ij} = \mu + \text{Vater}_i + b_1 \cdot x_{ij} + b_2 \cdot z_{ij} + e_{ij} \quad (6)$$

wobei y_{ij} den deregressierten Zuchtwert des Sohnes j innerhalb Vater i darstellt, μ den Mittelwert, Vater_i den fixen Effekt von Vater i , und x_{ij} die Anzahl der *CYP11B1^V* Allele (0, 1, oder 2). z_{ij} stellt die Anzahl der *DGATI^K* Allele (0, 1, oder 2) des Sohnes j innerhalb Vater i dar, b_1 und b_2 jeweils den Regressionskoeffizienten, der die Hälfte des Gensubstitutionskoeffizienten ($\alpha/2$) repräsentiert. e_{ij} ist der zufällige Restfehler mit polygenischen und Umwelteffekten.

3.2.4.2 Regressions-Analyse des gemeinsamen Einflusses von genetischen Effekten der Marker *DGATI*, *CYP11B1*, *GML*, *KIEL_E8*, *ILSTS039*, *CSSM066* in additiven Kombinationen auf Milchleistungsmerkmale in Dt. Holstein Rindern

In einem ersten Schritt erstellt die SAS-STEPWISE Methode das Modell ohne Variablen. Anschließend werden Variablen einzeln und nacheinander in das Modell und in die Berechnung der F-Statistik aufgenommen, da eine Variable einen signifikanten Einfluss, am Eingangssignifikanzniveau (SL-Entry level) gemessen, haben muss, um aufgenommen werden zu können. Diese Eingangsgrenze kann dem Programm angegeben werden und beträgt als Vorgabe den Wert 0,5. Variablen werden in der Weise selektiert und in das Modell aufgenommen oder aus dem Modell wieder ausgeschlossen, dass jedem vorwärts gerichteten Selektionsschritt auch ein oder mehrere rückwärts gerichtete Ausschlusschritte folgen können. Der Stepwise Auswahlprozess der zu berücksichtigenden Marker endet, wenn keine weiteren Variablen mehr zum Modell hinzugefügt werden können oder wenn die zuletzt aufgenommene Variable die einzige ist, die im nächsten rückwärts Ausschlusschritt wieder entfernt werden müsste. Die geschilderte Prozedur verfolgt bei jedem Schritt das Ziel, die Erklärlichkeit (R^2) zu steigern.

Stepwise-Regressionsanalysen der vorliegenden Auswertungen wurden drei Mal, jeweils mit unterschiedlichen Markerkombinationen durchgeführt, die das Auswahlergebnis der STEPWISE-Methode darstellen und jeweils aus unabhängigen SAS Stepwise-Auswahlverfahren stammen. Dem Programm wurden die folgenden Markerkombinationen angeboten:

Marker-

Kombination 1: *DGATI*, *CYP11B1*, *GML*⁺⁴⁰⁵, *GML*⁺⁵⁷³

Marker-

Kombination 2: *DGATI*, *CYP11B1*, *GML*⁺⁴⁰⁵, *GML*⁺⁵⁷³, *KIEL_E8*

Marker-

Kombination 3: *DGATI*, *CYP11B1*, *GML*⁺⁴⁰⁵, *GML*⁺⁵⁷³, *KIEL_E8*, *ILSTS039*, *CSSM066*

Bei den Kombinationen 1 und 2 wurden alle Marker in die Regressionsmodelle übernommen. Aus der angebotenen Markerkombination 3 wurden *CYP11BI*^V und *KIEL_E8*¹ durch das Programm von der Auswertung ausgeschlossen.

1. Regressions-Modell zur gemeinsamen Analyse von Effekten nach der SAS-Stepwise Markerauswahl: *DGATI*^K, *CYP11BI*^V, *GML*^{+405G}, *GML*^{+573G}

$$y_{ij} = \mu + V_i + b_1 \cdot m_{ij} + b_2 \cdot n_{ij} + b_3 \cdot o_{ij} + b_4 \cdot s_{ij} + e_{ij} \quad (7)$$

2. Regressions-Modell zur gemeinsamen Analyse von Effekten nach der SAS-Stepwise Markerauswahl: *DGATI*^K, *CYP11BI*^V, *GML*^{+405G}, *GML*^{+573G}, *KIEL_E8*¹

$$y_{ij} = \mu + V_i + b_1 \cdot m_{ij} + b_2 \cdot n_{ij} + b_3 \cdot o_{ij} + b_4 \cdot s_{ij} + b_5 \cdot t_{ij} + e_{ij} \quad (8)$$

3. Regressions-Modell zur gemeinsamen Analyse von Effekten nach der SAS-Stepwise Markerauswahl: *DGATI*^K, *GML*^{+405G}, *GML*^{+573G}, *ILSTS039*²¹⁹, *ILSTS039*²²⁵, *CSSM066*¹⁸⁶, *CSSM066*¹⁹⁴

$$y_{ij} = \mu + V_i + b_1 \cdot m_{ij} + b_3 \cdot o_{ij} + b_4 \cdot s_{ij} + b_6 \cdot u_{ij} + b_7 \cdot w_{ij} + b_8 \cdot x_{ij} + b_9 \cdot z_{ij} + e_{ij} \quad (9)$$

wobei die Modellvariablen wie folgt definiert sind als:

- y_{ij} = deregressierter Zuchtwert (*DRZW*) von Sohn j innerhalb Vater i
- μ = Mittelwert
- V_i = der fixe Effekt von Vater i
- m_{ij} = Anzahl der *DGATI*^K Allele (0, 1 oder 2)
- n_{ij} = Anzahl der *CYP11BI*^V Allele (0, 1 oder 2)
- o_{ij} = Anzahl der *GML*^{+405(G)} Allele (0, 1 oder 2)
- s_{ij} = Anzahl der *GML*^{+573(G)} Allele (0,1 oder 2)
- t_{ij} = Anzahl der *KIEL_E8*⁽¹⁾ Allele (0, 1 oder 2)
- u_{ij} = Anzahl der *ILSTS039*⁽²¹⁹⁾ Allele (0, 1 oder 2)
- w_{ij} = Anzahl der *ILSTS039*⁽²²⁵⁾ Allele (0, 1 oder 2)
- x_{ij} = Anzahl der *CSSM066*⁽¹⁸⁶⁾ Allele (0, 1 oder 2)
- z_{ij} = Anzahl der *CSSM066*⁽¹⁹⁴⁾ Allele (0, 1 oder 2)
- $b_1 - b_9$ = Regressionskoeffizienten, die den halben Gensubstitutionseffekt ($\alpha/2$) repräsentieren ($\alpha/2$ wie in Falconer & Mackay, 1996)
- e_{ij} = Rest, einschließlich polygenische und Umwelteinflüsse

Väter wurden im Modell als fixe Effekte eingefügt, da sie hoch selektionierte Tiere der Väter-Population darstellen und nicht als Zufallsstichprobe gelten können.

3.2.4.3 Phänotypische Korrelationen zwischen deregressierten Zuchtwerten (*DRZW*) von fünf Milchproduktionsmerkmalen mit somatischer Zellzahl und Fruchtbarkeitsmerkmalen mit Nutzungsdauer bei Dt. Holstein Rindern

Pearson's Korrelationskoeffizienten zwischen deregressierten Zuchtwerten und Milchproduktions- und Fruchtbarkeitsmerkmalen und Nutzungsdauer wurden mit der

CORR-Procedure des SAS-Statistik-Programmpakets berechnet. Ergebnisse wurden in Matrixformat ausgewiesen.

3.2.5 Charakterisierung des *DGATI* (K232A) Polymorphismus in 42 internationalen Rinderrassen

Zur Differenzierung und Charakterisierung von 42 internationalen Rinderrassen (Kapitel 3.1.13.1) am *DGATI* Locus (K232A-Polymorphismus) konnte das online Programm GENEPOP Version 3.4 genutzt werden. Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht wurde mit Programm Option 1 und Allelfrequenzen mit Programm Option 5 berechnet. Erwartete Anzahlen homozygoter und heterozygoter Genotypen wurden ebenfalls mit Programm Option 5, unter Berücksichtigung von Levene's Korrektur (Levene 1949) errechnet.

Rassen wurden nach Literaturangaben (Jensen 1995) aufgrund ihres durchschnittlichen Milchfettgehaltes gepoolt. Dazu wurden alle *Bos taurus* Rassen drei willkürlich festgelegten Milchfett-Klassen (3,4-3,8 % = gering; 3,9-4,4 % = mittel, 4,5-6,3 % = hoch) zugeordnet. Aus den Allelfrequenzen dieser drei Subpopulationen plus einer *Bos indicus* Rassengruppe als einer weiteren Subpopulation wurden mit GENEPOP Option 6 paarweise F_{ST} -Werte berechnet. Zur Überprüfung der Signifikanz der F_{ST} -Resultate wurde ein χ^2 -Test im Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel vorgenommen.

4 Ergebnisse

Aus systematischen Erwägungen sind Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nach molekularer Analyse (4.1) und Datenanalyse (4.2) gegliedert.

4.1 Molekulargenetische Analyse

Die molekulargenetische Analyse dieser Arbeit umfasst die Identifikation von BAC-Klonen aus der QTL-Region am centromerischen Ende von *BTA14* sowie ihre Darstellung im genomischen Kontext. Identifikation von allelischer Variation des *DGATI*-Gens (Grisart *et al.* 2002, Winter *et al.* 2002) in unterschiedlichen Rinderrassen von *Bos taurus* ssp. und *Bos indicus* ssp. beschreibt die populationsgenetische Bedeutung des QTL für Milchleistungsmerkmale. Die Untersuchung weiterer positionaler und funktionaler Kandidatengene mit ihrer allelischen Variation in der QTL-Region werden anhand der Analyse des *CYP11B1*-Gens (Genbank NM_174638) und des bovinen *GML*-Gens (Genbank MGC134423) vorgestellt. Die Existenz eines *CYP11B1*-Pseudogens in der QTL-Region und seine Differenzierung werden beschrieben. Die Auswertung der Effekte von STS-Markern ergänzen die vorliegenden Auswertungen.

4.1.1 BAC-Bank Screening und BAC-Contigs

Das Screening von zwei BAC-Banken des Deutschen Ressourcenzentrums für Genomforschung, Berlin (RZPD) durch PCR-Pool Screening ([Abbildung 4.1](#)) und radioaktives Filter-Screening ([Abbildung 4.2](#)) zur Auffindung chromosomaler Fragmente aus der QTL-Region erbrachte 13 Klone ([Tabelle 4.1](#)). Aus BAC-Bank RZPD_BBI-B750 ergaben sich 5 Klone, aus BAC-Bank RZPD_TUM-B754 ergaben sich 8 Klone. Das PCR-Pool-Screening wurde mit 13 Primerpaaren, das radioaktive Filterset-Screening wurde mit 5 Primerpaaren aus 8 bzw. 5 unterschiedlichen Gen- oder STS-Regionen aus der QTL-Region am centromerischen Ende von *BTA14* durchgeführt.

Zur Validierung der BAC-Klone auf das Tragen von Inserts und deren approximative Größe wurden *NotI*-Verdauungen unternommen und anschließend auf Agarosegel elektrophoretisch getrennt, wie in [Abbildung 4.3](#) gezeigt. Hierbei wurden an den Vektorenden eingebaute Schnittstellen genutzt, um Vektoren durch Verdauung von den Inserts zu trennen. Die Vektorbanden lagen bei 8 kb, die Insertbanden deutlich über der obersten Größenmarkerbande von 48,5 kb. Durch das Linearisieren der BAC-DNA waren

anschließend in PCR-Reaktionen mit den Marker-Sonden als PCR-Primer Überprüfungen auf Spezifität möglich, die Produkte in erwarteter Größe ergaben.

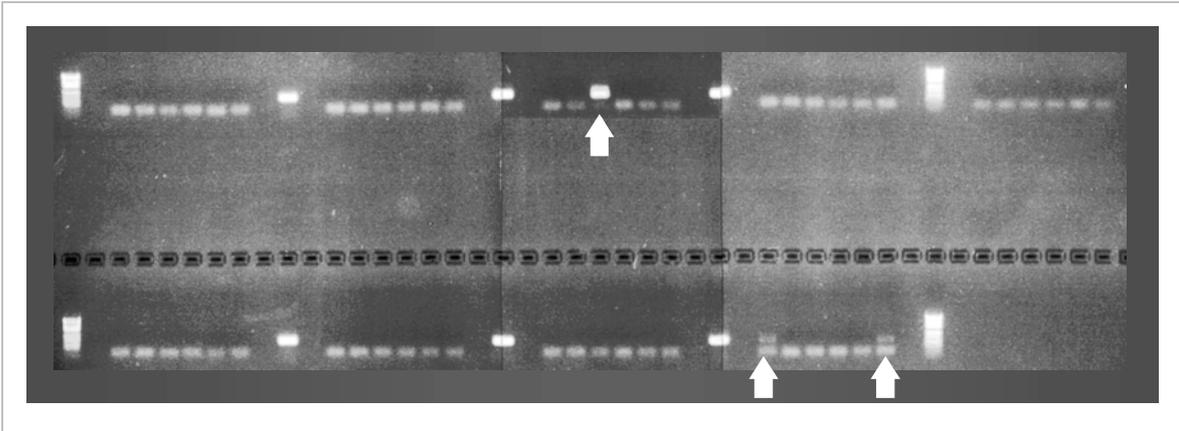


Abbildung 4.1: Ein Secondary-Screen aus der BAC-Bank RZPD_B754 (PCR-Pool-Screening). Die 8 halbbelegten Reihen einer 96 well Mikrotiterplatte sind auf dem Gel ebenfalls in Reihen (6er Einheiten) aufgetragen. Unterbrochen sind sie jeweils durch eine genomische DNA Kontrolle zum Vergleich der erwarteten Produktgröße. An den Gelrändern sind DNA Größenmarker aufgetragen. In der dritten Reihe (1 Pfeil) sowie in der achten Reihe (2 Pfeile) sind insgesamt 3 Signale auf erwarteter Produkthöhe zu beobachten.

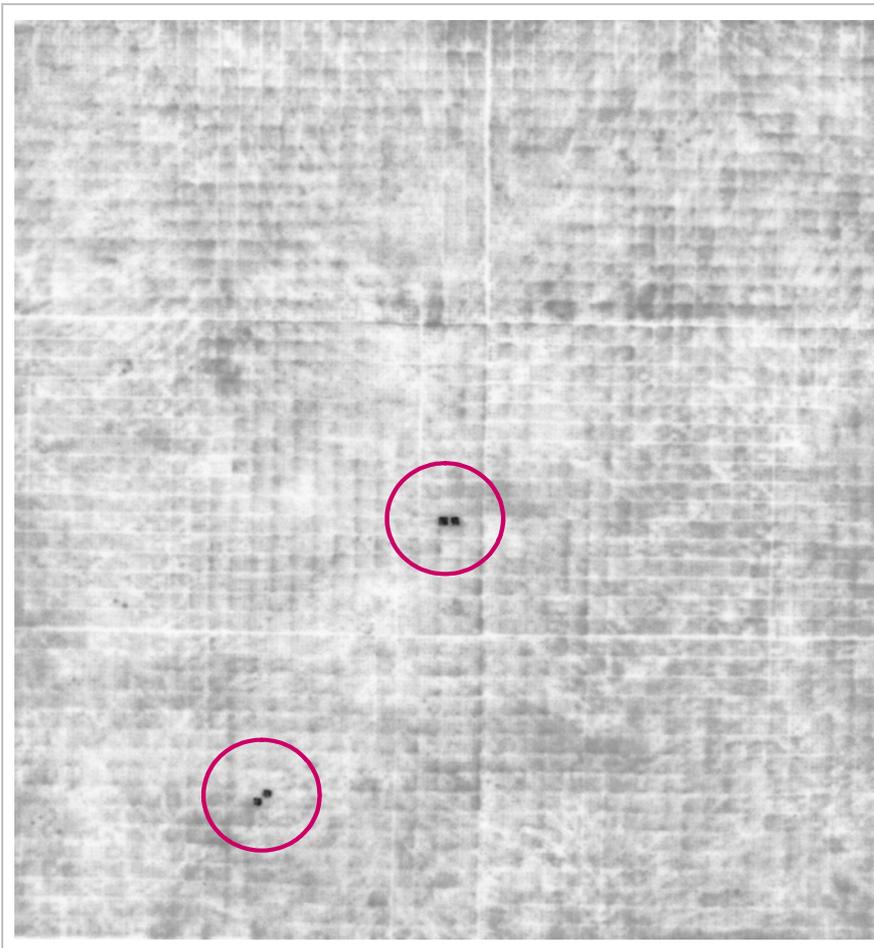


Abbildung 4.2:

Autoradiogramm eines BAC-Bank Filter-Screens. Eine *KIEL_E8* spezifische Sonde wurde an Filter Nr 10L (Filter Set 004594) der BAC-Bank RZPD_TUM-B754 hybridisiert. Kreise kennzeichnen 2 positive Doppelsignale

(Position oben: 439F2

Position unten 461H11).

Tabelle 4.1: Durch PCR-Pool-Screening und radioaktives Filter-Screening identifizierte BAC-Klone der QTL-Region im centromerischen Bereich von *BTA14*. Zum Screening wurden BAC-Bank BBI-B750 (Zhu *et al.* 1999) und BAC-Bank TUM-B754 (Buitkamp *et al.* 2000) des Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH, Berlin (RZPD) genutzt.

SONDE	JLU NR.		PCR-PRIMER 5'-3'	BAC-BANK	BAC-KLON
CYP11B1	9	<i>f</i>	GGCCATCCAGTAGTCGTGTC	RZPD_BBI-B750	K2432Q2
		<i>r</i>	CTGTGCTGTTCCATGAGTGC		
CYHR1	5	<i>f</i>	AGCGGAGAAGGGACGGAAGC	RZPD_TUM-B754	J10135Q2
		<i>r</i>	CGGTGTGCAGCCCAGAGC		
CSSM066	49	<i>f</i>	ACACAAATCCTTTCTGCCAGCTGA	RZPD_BBI-B750	A0924Q2
		<i>r</i>	AATTTAATGCACTGAGGAGCTTGG		
ILSTS039	53	<i>f</i>	GTTTCTGCCCTATGCCGTAA	RZPD_BBI-B750	O23120Q2
		<i>r</i>	ATCCCCTGGAGGAGGAAATA		
ILSTS039	45	<i>f</i>	GTTTCTGCCCTATGCCGTAA	RZPD_TUM-B754	F2141Q2
		<i>r</i>	ATCCCCTGGAGGAGGAAATA		
ILSTS039	56	<i>f</i>	GTTTCTGCCCTATGCCGTAA	RZPD_TUM-B754	G0725Q2
		<i>r</i>	ATCCCCTGGAGGAGGAAATA		
INRA237	48	<i>f</i>	CTCAGAGCAGAGCTTCTTCCA	RZPD_BBI-B750	E1416Q2
		<i>r</i>	CTGTCTCCTGGGTGGTTCTC		
PTK2	47	<i>f</i>	ACACGCCGAGTTCAAGTACC	RZPD_TUM-B754	O143Q2
		<i>r</i>	CCTGACATCAGTAGCATCTCC		
PTK2	50	<i>f</i>	ACACGCCGAGTTCAAGTACC	RZPD_BBI-B750	H1563Q2
		<i>r</i>	CCTGACATCAGTAGCATCTCC		
PTK2	66	<i>f</i>	ACACGCCGAGTTCAAGTACC	RZPD_TUM-B754	E13125Q2
		<i>r</i>	CCTGACATCAGTAGCATCTCC		
CACNB3	57	<i>f</i>	ACTCTGTGCACGCTGCCCAATG	RZPD_TUM-B754	F1796Q2
		<i>r</i>	TTGCCCTGTTCCCACAACTGA		
CYC1	68	<i>f</i>	TGCCACAGCATGGACTATGT	RZPD_TUM-B754	C11198Q2
		<i>r</i>	TGGTTTGGGGAAGTAGTCAGA		
CYC1	63	<i>f</i>	TGCCACAGCATGGACTATGT	RZPD_TUM-B754	B01113Q2
		<i>r</i>	TGGTTTGGGGAAGTAGTCAGA		

Zum Auffinden chromosomaler Fragmente, die wieder zu einer fortlaufenden Sequenz (Contig) zusammengesetzt werden können, wurden BAC-MIDI-Präparationen mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *HindIII* verdaut und anschließend elektrophoretisch getrennt (Abb. 4.4). Alle Klone lieferten Inserts. Aufgrund übereinstimmender Fragmentgrößen der verdauten BAC-MIDI Präparationen konnten für jedes Enzym 2 Contigs zusammengestellt werden (Tab. 4.2 und 4.3). Für den *EcoRI*-Verdau ergaben 6 bzw. 5 Klone einen Contig, für den *HindIII*-Verdau ergaben 7 bzw. 5 Klone einen Contig. Ein sequenzkongruenter Bereich zwischen den BAC-Klonen RZPD-B750K2432Q2 (*CYP11B1*) und RZPD-B754F2141Q2 (*ILSTS039*) wurde anschließend durch Sequenzierung mit T7-Primern bestätigt.

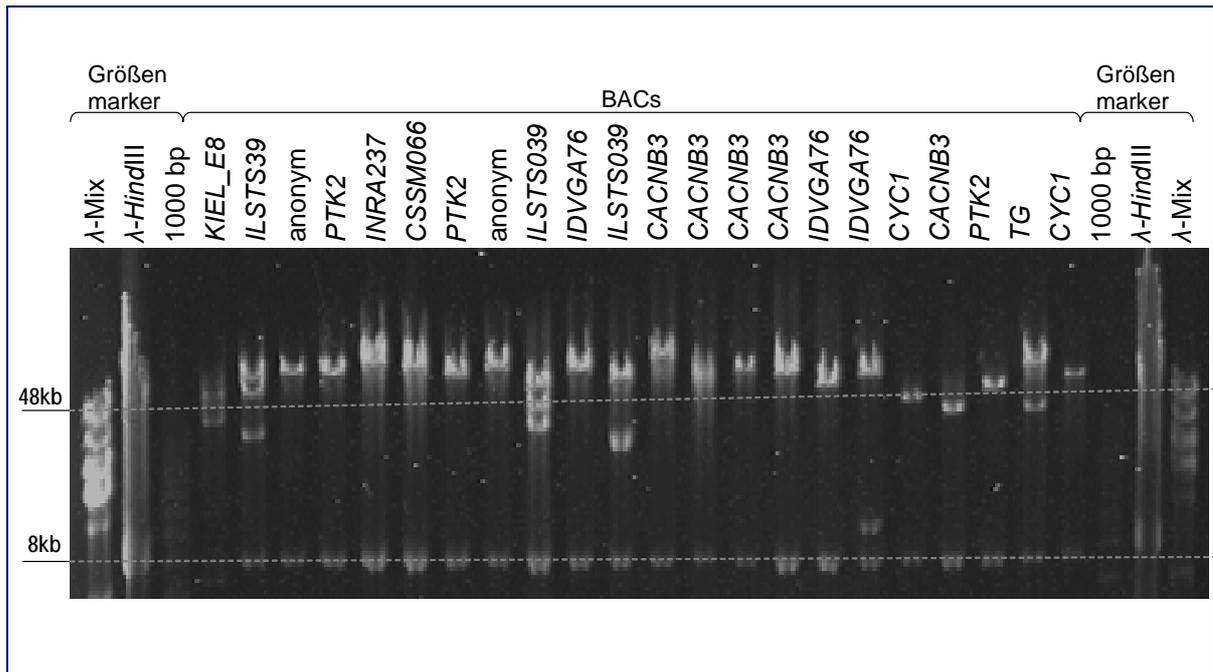


Abbildung 4.3: Elektropherogramm der mit dem Restriktionsenzym *NotI* verdauten BAC-MIDI Präparationen zur Überprüfung von Vektorbande und Inserts. Die Vektorbande (Vektor pBAC3.6e, Frengen *et al.* 2000) ist bei 8 kb sichtbar. Alle größeren Fragmente sind BAC-Inserts. Es treten BAC-Inserts mit und ohne zusätzlichen *NotI*-Schnittstellen auf (ein oder mehrere Fragmente), da *NotI*-Schnittstellen im Säuger genom eine durchschnittliche Häufigkeit von 3000/Genom (Imoto *et al.* 1994) besitzen. Auf den äußeren Spuren des Gels sind DNA-Größenmarker (Lambda-Mix Marker & Lambda-*HindIII* Marker) aufgetragen.

Tabelle 4.2: Der Verdau von BAC-MIDI Präparationen mit Restriktionsenzym *EcoRI* zeigte nach elektrophoretischer Auftrennung auf Agarosegel Fragmente gleicher Größe zwischen den aufgeführten Paaren. Die BAC-Klone sind benannt nach den Genbezeichnungen der PCR-Sonde, mit der sie gefunden wurden. In Klammern tragen sie die JLU-Nummer unter der ihre Glycerolstocks lagern.

Contig 1	Contig 2
<i>CYC1</i> (63) – <i>CYC1</i> (68)	<i>CSSM066</i> (49) – <i>ILSTS039</i> (56)
<i>PTK2</i> (47) – <i>CYC1</i> (68)	<i>CSSM066</i> (49) – <i>ILSTS039</i> (53)
<i>PTK2</i> (66) – <i>CYC1</i> (63)	<i>ILSTS039</i> (56) – <i>ILSTS039</i> (53)
<i>PTK2</i> (50) – <i>CYC1</i> (63)	<i>ILSTS039</i> (45) – <i>ILSTS039</i> (56)
<i>INRA273</i> (48) – <i>CYC1</i> (63)	<i>ILSTS039</i> (45) – <i>ILSTS030</i> (53)
<i>INRA273</i> (48) – <i>PTK2</i> (50)	<i>CYP11B1</i> (9) – <i>ILSTS039</i> (53)
<i>PTK2</i> (47) – <i>PTK2</i> (50)	

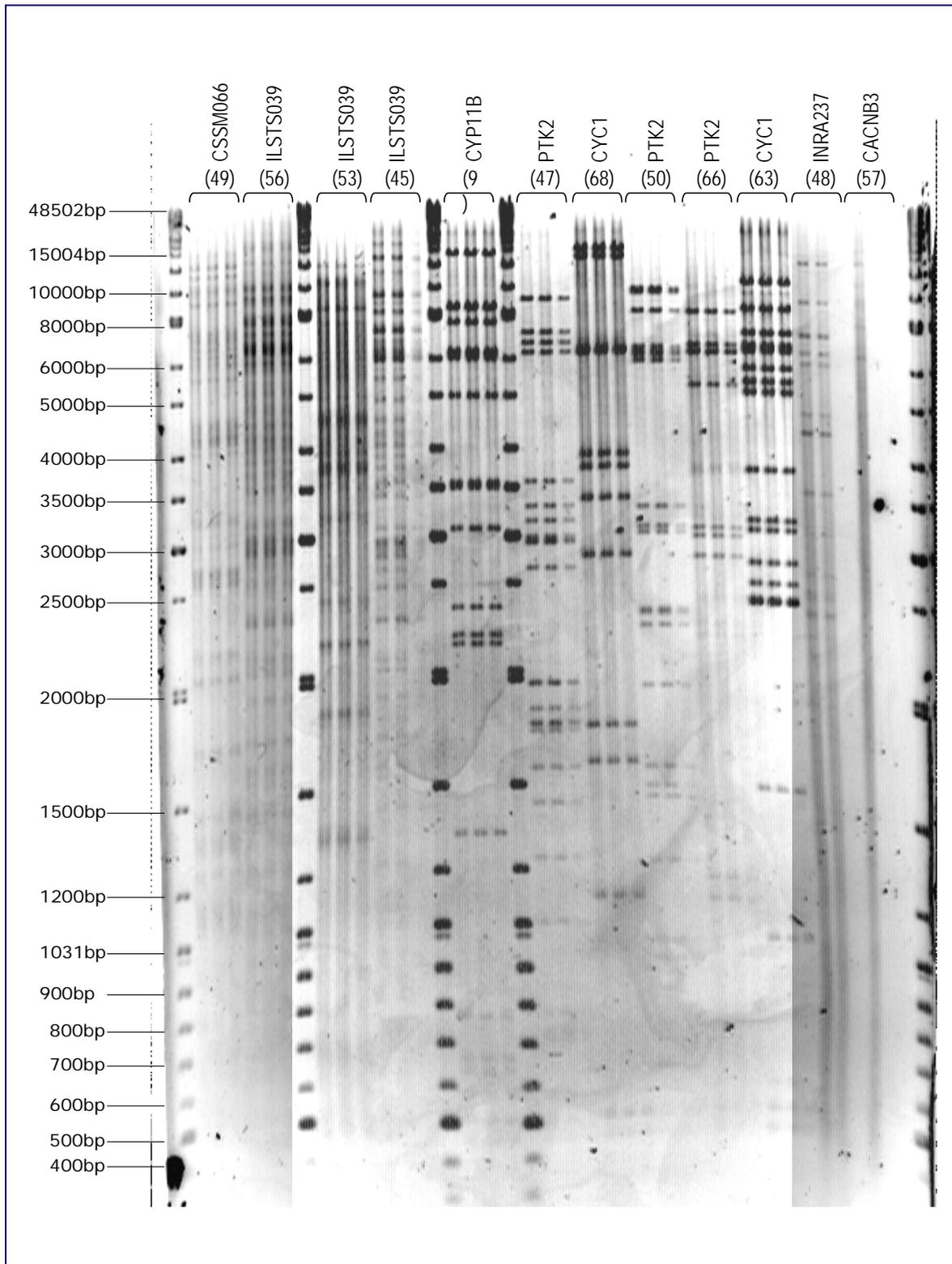


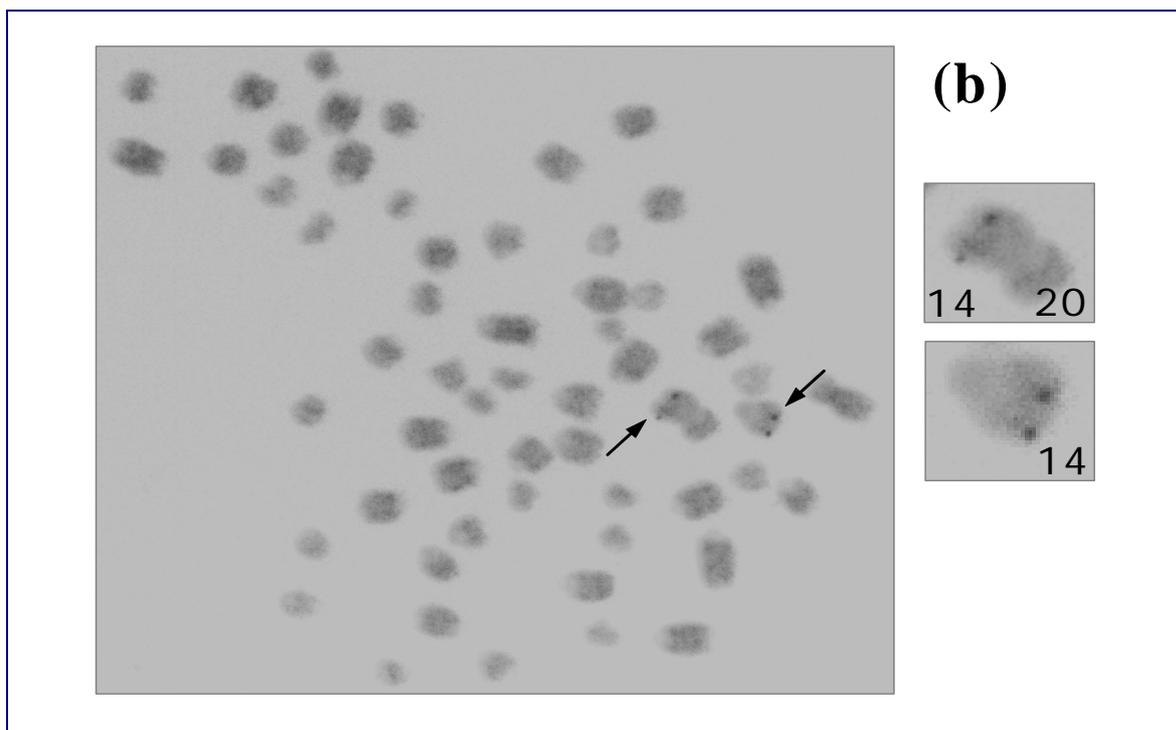
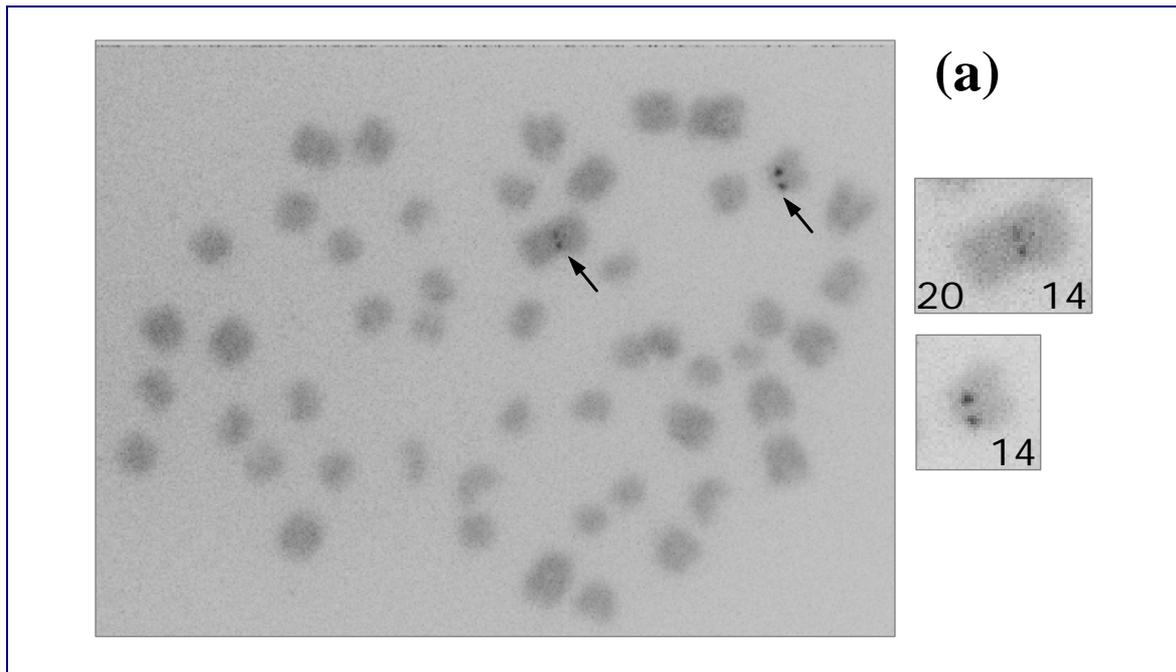
Abbildung 4.4: Elektropherogramm eines 0,8%igen Agarosegels mit elektrophoretisch aufgetrennten Restriktionsfragmenten von BAC-MIDI DNA-Präparation verdaut mit Restriktionsenzym *Hind*III. Pro BAC sind jeweils 3 verdaute Klone aufgetragen. In den außen liegenden Gelbahnen des Fingerprint-Agarosegels, sowie zwischen Verdaus, wurde DNA-Marker-Mix (Lambda-Mix Marker, 19, GeneRuler DNA Ladder Mix) zur Schätzung der gemeinsamen Fragmentgrößen aufgetragen. BAC-MIDI Restriktionsfragmente tragen den Namen der Sonde, mit dem der jeweilige BAC-Klon gefunden wurden (siehe [Tabelle 3.1](#)).

Tabelle 4.3: Der Verdau von BAC-MIDI Präparationen mit Restriktionsenzym *HindIII* zeigte nach elektrophoretischer Auftrennung auf Agarosegel Fragmente gleicher Größe zwischen den aufgeführten Paaren. Die BAC-Klone sind benannt nach der Gen Bezeichnung der PCR-Sonde, mit der sie gescreent wurden. In Klammern tragen sie die JLU-Nummer unter der sie lagern.

Contig 1	Contig 2
<i>PTK2</i> (47) – <i>PTK2</i> (50)	<i>CSSM066</i> (49) – <i>ILSTS039</i> (56)
<i>PTK2</i> (50) – <i>PTK2</i> (66)	<i>CSSM066</i> (49) – <i>ILSTS039</i> (53)
<i>PTK2</i> (47) – <i>PTK2</i> (66)	<i>CSSM066</i> (49) – <i>ILSTS039</i> (45)
<i>PTK2</i> (50) – <i>CYC1</i> (68)	<i>ILSTS039</i> (53) – <i>ILSTS039</i> (45)
<i>PTK2</i> (47) – <i>CYC1</i> (68)	<i>ILSTS039</i> (45) – <i>ILSTS039</i> (56)
<i>PTK2</i> (47) – <i>CYC1</i> (63)	<i>ILSTS039</i> (45) – <i>CYP11B1</i> (9)
<i>CYC1</i> (63) – <i>CYC1</i> (68)	<i>ILSTS030</i> (53) – <i>CYP11B1</i> (9)
<i>PTK2</i> (50) – <i>CYC1</i> (63)	
<i>PTK2</i> (66) – <i>CYC1</i> (63)	
<i>PTK2</i> (66) – <i>CYC1</i> (68)	
<i>PTK2</i> (47) – <i>INRA273</i> (48)	
<i>INRA273</i> (48) – <i>CYC1</i> (63)	
<i>INRA273</i> (48) – <i>CYC1</i> (68)	
<i>INRA273</i> (48) – <i>CACNB3</i> (57)	

4.1.2 Physische Kartierungen des *CYP11B1*-Gens und eines putativen *CYHRI*-Paralogs

Durch PCR-Screening der BAC-Bank BBI-B750 des Deutschen Ressourcenzentrums für Genomforschung (RZPD Berlin) mit den PCR-Primern (forward 5'-GGCCATCCAGTAGTCGTGTC-3' und reverse 3'-CTGTGCTGTTCCATGAGTGC-5'), abgeleitet aus Genbank D00185 Eintrag, wurde der BAC-Klon BBI-B750K2432Q2 identifiziert. Durch Kolonie-PCR und Teilsequenzierungen mit *CYP11B1*-Primern, die aus cDNA Sequenz entwickelt wurden (forward 5'-CCTACTCTATTCCCTGGGTCGAAAC-3'; reverse 3'-CAAGGTTTCATCCCCAGCTCT-5'), konnten *CYP11B1* spezifische Sequenzen in diesem Klon nachgewiesen werden. Durch Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) konnte der BAC-Klon physisch in die QTL-Region am centromerischen Ende von *BTA14* kartiert werden, wie in [Abbildung 4.5](#) (a) gezeigt. Das *CYP11B1* Gen wurde dort der homologen QTL-Region *HSA8q23* des humanen *CYP11B1*-Gens (Taymans *et al.* 1998) der cytogenetischen Region *BTA14q12* zugewiesen.



Abbildungen 4.5a, b: Physische Kartierung der bovinen Gene *CYP11B1* (Abb. 4.5a) und *CYHR1* (Abb. 4.5b) auf Chromosom *BTA14* durch Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH). Zur Hybridisierung wurden Metaphasen-Chromosomen eines Simmental Bullen mit einer 14/20 Robertson'schen Translokation an einer Kopie von *BTA14* und *BTA20* genutzt, um zweifelsfreie Zuordnung der Hybridisierungssignale zu gewährleisten. Hybridisiert wurde der BAC-Klon RZPD_BBI-B750K2432Q2 für das *CYP11B1* Gen und BAC-Klon RZPD_BBI-B754J10135Q2 für das *CYHR1* Gen. Hybridisierungssignale sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Zur besseren Erkennung sind Chromosomenbilder vergrößert auf dem invertierten DAPI-Bild dargestellt. Doppelsignale kennzeichnen Schwesterchromatiden der Metaphase-Chromosomen.

Aus der EST158 (*KIEL_E8*) Sequenz (Genbank AI461432; Karall-Albrecht *et al.* 2000) entwickelte PCR-Primer (forward 5'-AGCGGAGAAGGGACGGAAGC-3'; reverse 3'-CGGTGTGCAGCCCAGAGC-5') wurden zum radioaktiven Filter-Screening der BAC-Bank RZPD_TUM-B754 eingesetzt. Der auf diese Weise identifizierte BAC-Klon TUM-B754J10135Q2 konnte durch Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) wie in [Abbildung 4.5b](#) gezeigt physisch in die telomerische Region von *BTA14* kartiert werden.

4.1.3 Kandidatengene und Kandidatenloci der QTL-Region

Zur Feinkartierung der QTL-Region im ADR-Familienmaterial Deutsche Holstein und Fleckvieh wurde der von Winter *et al.* (2002) beschriebene Aminosäureaustausch K232A im "Diacylglycerol O-acyltransferase homolog 1 (mouse)"-Gen (*DGATI*) in Kombination mit dem von Morohashi *et al.* (1987) beschriebenen Aminosäureaustausch V79A im "Cytochrome P450, subfamily XI B, polypeptide 1"-Gen (*CYP11B1*) genutzt. In einem zum humanen *GML*-Gen paralogen Locus, dem "hypothetical protein MGC134423"-Gen beim Rind wurden mehrere SNP entwickelt, von denen zwei SNP zur Typisierung ausgewählt wurden. Existierende Typisierungen des gleichen ADR-Familienmaterials mit dem SSCP-Marker "Bovine Lambda ZapII Library *Bos taurus* cDNA clone 158" (*KIEL_E8*) sowie den Mikrosatelliten-Markern "UniSTS:32658 BOVILS39" (*ILSTS039*) und "UniSTS:279351 CSSM66" (*CSSM066*) aus der QTL-Region auf *BTA14* konnten als Rohdaten der ADR-Datenbank des Instituts für Tierzucht der Universität Kiel entnommen und für die Feinkartierung zusätzlich herangezogen werden. Übernommene Daten sind als solche in Tabellen und Text gekennzeichnet.

4.1.3.1 *DGAT1*-Genotypisierung und Allelfrequenzen

Die Typisierung der allelischen *DGATI* Variation zeigte eine klare Trennung dreier unterschiedlicher Genotypen (AAAA, AAGC, GCGC), wie in [Abbildung 4.6](#) in einem Elektropherogramm des *Cfr*I-Restriktionsverdau dargestellt.

Tabelle 4.4: Allelfrequenzen der biallelischen SSCP- und RFLP-Marker (*KIEL_E8*¹, *DGATI*^{Cfr1}, *CYP11B1*^{Pst1}, *GML*⁺⁴⁰⁵, *GML*⁺⁵⁷³) im ADR-Familienmaterial ohne Großväter und Väter.

ADR-Familienmaterial	<i>KIEL_E8</i> ¹ SSCP-Allele		<i>DGATI</i> RFLP-Allele		<i>CYP11B1</i> RFLP-Allele		<i>GML</i> ⁺⁴⁰⁵ RFLP-Allele		<i>GML</i> ⁺⁵⁷³ RFLP-Allele			
	Allel 1	Allel 2	Allel 1 (AA) ³ Lysin (K) ⁴	Allel 2 (GC) ³ Alanin(A) ⁴	Allel 1 (T) ³ Valin (V) ⁴	Allel 2 (C) ³ Alanin(A) ⁴	Allel 1 (G) ³	Allel 2 (A) ³	Allel 1 (G) ³	Allel 2 (T) ³		
Rasse	Fam.	Söhne ²										
1 Holstein	AB	32	0.422	0.578	0.625	0.375	0.859	0.141	0.938	0.062	1.000	0.000
2 Holstein	AC	42	0.226	0.774	0.440	0.560	0.631	0.369	0.976	0.024	0.976	0.024
3 Holstein	AD	21	0.238	0.762	0.429	0.571	0.619	0.381	0.952	0.048	1.000	0.000
4 Holstein	AE	51	0.360	0.640	0.500	0.500	0.880	0.120	0.970	0.030	1.000	0.000
5 Holstein	AF	19	0.263	0.737	0.500	0.500	0.868	0.132	0.974	0.026	1.000	0.000
6 Holstein	BC	123	0.533	0.467	0.598	0.402	0.650	0.350	0.976	0.024	0.984	0.016
7 Holstein	BD	259	0.510	0.490	0.589	0.411	0.660	0.340	0.977	0.023	0.990	0.010
8 Holstein	BE	28	0.304	0.696	0.500	0.500	0.804	0.196	0.750	0.250	1.000	0.000
9 Holstein	CD	23	0.370	0.630	0.587	0.413	0.870	0.130	0.978	0.022	1.000	0.000
10 Holstein	CE	31	0.450	0.550	0.633	0.367	0.850	0.150	0.983	0.017	1.000	0.000
11 Holstein	CF	56	0.232	0.768	0.491	0.509	0.750	0.250	0.946	0.054	0.804	0.196
12 Holstein	CG	29	0.569	0.431	0.638	0.362	0.690	0.310	0.897	0.103	1.000	0.000
13 Holstein	CH	19	0.789	0.211	0.789	0.211	0.895	0.105	0.974	0.026	1.000	0.000
14 Holstein	CI	25	0.280	0.720	0.500	0.500	0.880	0.120	1.000	0.000	1.000	0.000
15 Holstein	CK	42	0.476	0.524	0.619	0.381	0.869	0.131	0.929	0.071	0.988	0.012
16 Holstein	DA	352	0.263	0.737	0.432	0.568	0.609	0.391	0.970	0.030	0.987	0.013
17 Holstein	EA	60	0.550	0.450	0.642	0.358	0.750	0.250	0.933	0.067	1.000	0.000
18 Holstein	FA	57	0.544	0.456	0.632	0.368	0.746	0.254	0.965	0.035	1.000	0.000
19 Fleckvieh	GA	80	0.000	1.000	0.500	0.500	0.812	0.188	0.556	0.444	1.000	0.000
20 Fleckvieh	HA	61	0.025	0.975	0.500	0.500	0.910	0.090	0.844	0.156	1.000	0.000
21 Fleckvieh	IA	60	0.033	0.967	0.533	0.467	0.883	0.117	0.633	0.367	1.000	0.000
22 Braunvieh	KA	33	0.000	1.000	0.030	0.970	0.797	0.203	0.859	0.141	1.000	0.000

¹*KIEL_E8* Allelfrequenzen wurden von J. Bennewitz, Kiel (ADR Datenbank) übernommen; ²Söhne pro Familie; ³Nukleotidaustausch; ⁴Aminosäureaustausch

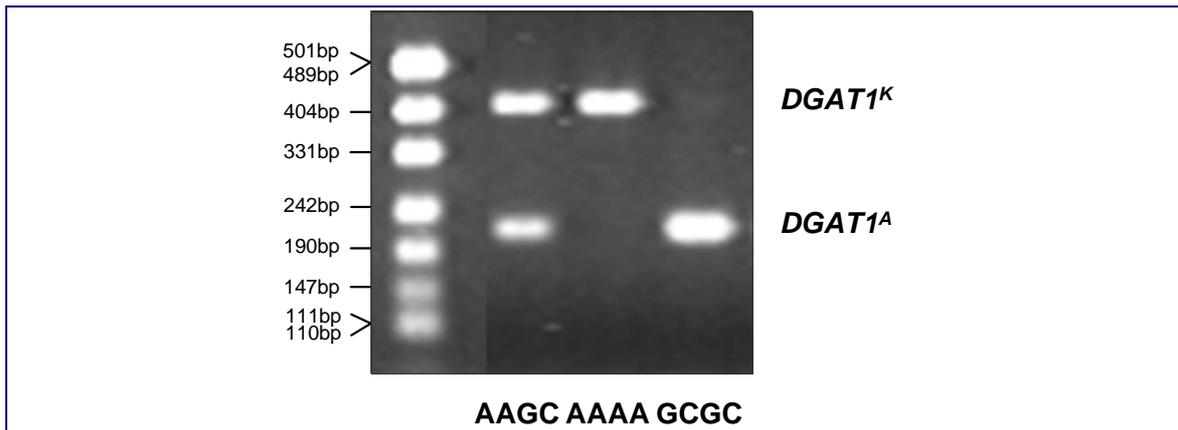


Abbildung 4.6: Elektropherogramm von Genotypen des heterozygoten (AAGC) und homozygoten (AAAA, GCGC) Status beider *DGATI*-Allele.

In 18 Dt. Holstein-Familien (durchschnittlich 73 Söhne/Familie) und 3 Dt. Fleckvieh-Familien (durchschnittlich 68 Söhne/Familie) wurden Allelfrequenzen im mittleren Heterozygotie-Bereich gemessen. Für die Gesamtpopulationen konnte bei Dt. Holstein 0,564 (0,429 - 0,789) für *DGATI*^K und 0,436 (0,211 - 0,571) für *DGATI*^A, sowie bei Dt. Fleckvieh 0,511 (0,500 - 0,533) für *DGATI*^K und 0,489 (0,500 - 0,467) für *DGATI*^A festgestellt werden. Die Dt. Braunvieh-Familie war annähernd homozygot. *DGATI*^K hatte dort eine Frequenz von 0,030 und *DGATI*^A von 0,970. Die *DGATI*-Allelfrequenzen der einzelnen Holstein-, Fleckvieh- und Braunvieh-Familien können Tabelle 4.4 entnommen werden.

Aus 18 Holstein Großvätern waren 9 heterozygot für *DGATI*^{K+A} Allele, 8 homozygot für *DGATI*^A und 1 Großvater homozygot für *DGATI*^K. Die Gesamtpopulation war zu 16 % homozygot für *DGATI*^K, 51 % heterozygot für *DGATI*^{K+A} und 33 % homozygot für *DGATI*^A. Bei Fleckvieh waren aus 3 Großvätern einer heterozygot für *DGATI*^{K+A} und zwei homozygot für *DGATI*^A. Die Gesamtpopulation war zu 2 % homozygot für *DGATI*^K, 18 % heterozygot für *DGATI*^{K+A} und 80 % homozygot für *DGATI*^A. Ein Braunvieh Großvater war homozygot *DGATI*^A. Die Gesamtpopulation war zu 6 % heterozygot für *DGATI*^{K+A} und 94 % homozygot für *DGATI*^A.

Genotypenfrequenzen für *DGATI* in erwarteter (Tabelle 4.5) und beobachteter Frequenz (Tabelle 4.6) waren zwischen Familien unterschiedlich. Differenzen zwischen beobachteten und erwarteten Genotypen können zufällig sein oder ein Hinweis, dass die Population sich nicht im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWG) befindet. Tabelle 4.7 zeigt Signifikanzen der Abweichung der Subpopulationen (ADR-Familien) vom HWG.

Tabelle 4.5: Erwartete Genotypfrequenzen der SSCP- und RFLP-Marker (*KIEL_E8**, *DGAT1*, *CYP11B1*, *GML⁺⁴⁰⁵*, *GML⁺⁵⁷³*) ADR-Familienmaterial ohne Großväter und Väter.

ADR-Familienmaterial Nr Rasse Fam. Söhne	KIEL_E8 ¹		DGAT1		CYP11B1		GML ⁺⁴⁰⁵		GML ⁺⁵⁷³						
	11	12	22	11	12	22	11	12	22	11	12	22			
1 Holstein AB	5.571	15.857	10.571	6.444	16.111	9.444	23.571	7.857	0.571	28.095	3.810	0.095	32.000	0.000	0.000
2 Holstein AC	2.060	14.880	25.060	2.060	14.880	25.060	16.602	19.795	5.602	40.012	1.976	0.012	40.012	1.976	0.012
3 Holstein AD	1.098	7.805	12.098	1.047	7.907	13.047	8.163	10.674	3.163	20.023	1.953	0.023	21.000	0.000	0.000
4 Holstein AE	6.238	23.525	21.238	6.238	23.525	21.238	39.653	10.693	0.653	48.030	2.941	0.030	51.000	0.000	0.000
5 Holstein AF	1.216	7.568	10.216	1.216	7.568	10.216	14.270	4.459	0.270	18.000	1.000	0.000	19.000	0.000	0.000
6 Holstein BC	34.755	61.490	26.755	36.000	64.000	28.000	54.057	58.286	15.357	122.059	5.882	0.059	124.024	3.953	0.024
7 Holstein BD	67.149	129.702	62.149	77.637	137.726	60.637	119.243	124.514	32.243	263.142	12.717	0.142	271.018	4.964	0.018
8 Holstein BE	2.473	12.055	13.473	2.473	12.055	13.473	18.000	9.000	1.000	15.655	10.691	1.655	28.000	0.000	0.000
9 Holstein CD	3.022	10.956	9.022	3.400	11.200	8.400	17.333	5.333	0.333	22.000	1.000	0.000	23.000	0.000	0.000
10 Holstein CE	5.949	15.102	8.949	7.131	15.738	8.131	22.590	7.820	0.590	30.000	1.000	0.000	31.000	0.000	0.000
11 Holstein CF	2.928	20.144	32.928	3.345	21.310	32.345	31.593	21.814	3.593	51.133	5.735	0.133	36.239	18.522	2.239
12 Holstein CG	9.263	14.474	5.263	10.439	14.123	4.439	13.684	12.632	2.684	23.263	5.474	0.263	29.000	0.000	0.000
13 Holstein CH	11.757	6.486	0.757	11.757	6.486	0.757	15.162	3.676	0.162	18.000	1.000	0.000	19.000	0.000	0.000
14 Holstein CI	1.857	10.286	12.857	1.857	10.286	12.857	19.306	5.388	0.306	1.000	0.000	0.000	25.000	0.000	0.000
15 Holstein CK	9.398	21.205	11.398	9.398	21.205	11.398	31.663	9.675	0.663	36.181	5.639	0.181	41.000	1.000	0.000
16 Holstein DA	24.211	136.579	191.211	25.592	139.815	189.592	131.915	169.169	53.915	334.296	20.408	0.296	346.051	8.898	0.051
17 Holstein EA	18.025	29.950	12.025	18.580	29.840	11.580	33.655	22.689	3.655	52.235	7.529	0.235	60.000	0.000	0.000
18 Holstein FA	16.735	28.531	11.735	17.530	28.939	11.530	32.530	21.939	3.530	54.052	3.896	0.052	57.000	0.000	0.000
19 Fleckvieh GA	1.000	0.000	0.000	0.019	2.962	77.019	52.736	24.528	2.736	24.629	39.742	15.629	80.000	0.000	0.000
20 Fleckvieh HA	0.025	2.950	58.025	0.083	4.835	56.083	50.455	10.091	0.455	43.413	16.174	1.413	61.000	0.000	0.000
21 Fleckvieh IA	0.050	3.899	56.050	5.294	25.412	29.294	46.765	12.471	0.765	23.950	28.101	7.950	60.000	0.000	0.000
22 Braunvieh KA	1.000	0.000	0.000	0.015	1.969	31.015	20.400	11.200	1.400	24.554	7.892	0.554	33.000	0.000	0.000

¹KIEL_E8 Allelfrequenzen wurden von J. Bennewitz, Kiel (ADR Datenbank) übernommen

Tatsächlich weichen am *DGATI* Locus 16 Familien höchst signifikant vom HWG ab. F_{IS} -Werte (Weir & Cockerham 1984), die in einem Wertebereich von -1 bis 0 Heterozygotenüberschuss und von 0 bis +1 Homozygotenüberschuss in Subpopulationen beschreiben, werden parallel hierzu in [Tabelle 4.7](#) gezeigt. Die Individuen der ADR-Familien im HWG am *DGATI* Locus (ADR Familien CG, CH), unterscheiden sich auch durch einen F_{IS} -Wert geringfügig näher null von den restlichen Familien. Insgesamt wurden an diesem Locus mehr Heterozygote festgestellt, als unter HWG erwartet werden kann.

4.1.3.2 CYP11B1-Genotypisierungen und Allelfrequenzen

Allelische Variation am *CYP11B1*-Locus zeigte drei klar unterscheidbare Genotypen (TT, TC, CC), wie in [Abbildung 4.7](#) in einem Elektropherogramm eines *PstI*-Restriktionsverdaus dargestellt ist.

Von 18 Holstein Großvätern waren 9 heterozygot für *CYP11B1*^{V+A} und 9 homozygot für *CYP11B1*^V. Drei Fleckvieh Großväter waren homozygot für *CYP11B1*^V, ebenso war der Braunvieh Großvater homozygot für *CYP11B1*^V.

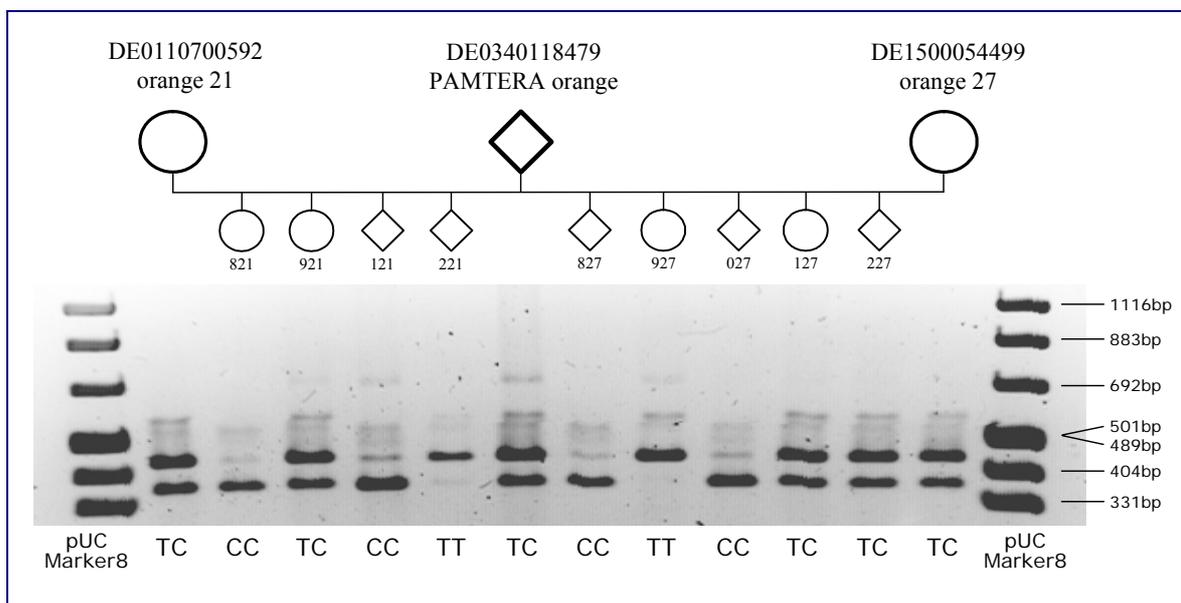


Abbildung 4.7: Segregation beider PCR-RFLP Allele (*PstI*) des Polymorphismus an Position 30 in Exon 1 des bovinen *CYP11B1*-Gens, dargestellt an zwei Halbgeschwister-Familien. Gezeigt ist in der Mitte der Abbildung der Genotyp des Dt. Angus Bullen PAMTERA (orange) und an beiden Enden des Gels die Genotypen der beiden mit ihm angepaarten Dt. Angus Kühe "orange 21" und "orange 27". Dazwischen liegend aufgeführt sind die Genotypen der aus den jeweiligen Anpaarungen resultierenden Kälber der Jahrgänge '98, '99, '01, '02 bzw. '98, '99, '00, '01, '02 zu sehen. Die beiden äußersten Spuren sind mit DNA Größenmarker (pUC Marker 8) belegt.

Tabelle 4.6: Beobachtete Genotypfrequenzen der SSCP- und RFLP-Marker (*KIEL_E8**, *DGAT1*, *CYP11B1*, *GML+405*, *GML+573*) ADR-Familienmaterial ohne Großväter und Väter.

N ^r	ADR-Familienmaterial Rasse Fam. Söhne	KIEL_E8 ¹				DGAT1				CYP11B1				GML ⁺⁴⁰⁵				GML ⁺⁵⁷³			
		11	12	22		11	12	22		11	12	22		11	12	22		11	12	22	
1	Holstein	AB	32	7	13	12	8	13	11	23	9	0	28	4	0	32	0	0	0	0	
2	Holstein	AC	42	0	19	23	0	19	23	16	21	5	40	2	0	40	2	0	0	0	
3	Holstein	AD	21	0	10	11	0	10	11	8	11	3	20	2	0	21	0	0	0	0	
4	Holstein	AE	51	0	36	15	0	36	15	39	12	0	48	3	0	51	0	0	0	0	
5	Holstein	AF	19	0	10	9	0	10	9	14	5	0	18	1	0	19	0	0	0	0	
6	Holstein	BC	123	35	61	27	36	64	28	53	61	14	122	6	0	124	4	0	0	0	
7	Holstein	BD	259	67	130	62	78	137	61	115	133	28	236	13	0	271	5	0	0	0	
8	Holstein	BE	28	0	17	11	0	17	11	17	11	0	15	12	1	28	0	0	0	0	
9	Holstein	CD	23	3	11	9	4	10	9	17	6	0	22	1	0	23	0	0	0	0	
10	Holstein	CE	31	8	11	11	9	12	10	22	9	0	30	1	0	31	0	0	0	0	
11	Holstein	CF	56	0	26	30	0	28	29	29	27	1	51	6	0	34	23	0	0	0	
12	Holstein	CG	29	9	15	5	11	13	5	14	12	3	23	6	0	29	0	0	0	0	
13	Holstein	CH	19	11	8	0	11	8	0	15	4	0	18	1	0	19	0	0	0	0	
14	Holstein	CI	25	0	14	11	0	14	11	19	6	0	25	0	0	25	0	0	0	0	
15	Holstein	CK	42	10	20	12	10	20	12	31	11	0	36	6	0	41	1	0	0	0	
16	Holstein	DA	352	0	185	167	1	189	165	126	181	48	334	21	0	346	9	0	0	0	
17	Holstein	EA	60	18	30	12	19	29	12	32	26	2	52	8	0	60	0	0	0	0	
18	Holstein	FA	57	16	30	11	17	30	11	30	27	1	54	4	0	57	0	0	0	0	
19	Fleckvieh	GA	80	0	0	80	0	3	77	50	30	0	22	45	13	80	0	0	0	0	
20	Fleckvieh	HA	61	0	3	58	0	5	56	50	11	0	43	17	1	61	0	0	0	0	
21	Fleckvieh	IA	60	0	4	56	4	28	28	46	14	0	23	30	7	60	0	0	0	0	
22	Braunvieh	KA	33	0	0	33	0	2	31	19	14	0	24	9	0	33	0	0	0	0	

¹KIEL_E8 Allelfrequenzen wurden von J. Bennewitz, Kiel (ADR Datenbank) übernommen

Tabelle 4.7: Schätzung der Inzuchtkoeffizienten (F_{IS}) und χ^2 -Test auf Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht für SSCP-Marker *KIEL_E8*, RFLP-Marker *DGATI*, *CYP11B1*, *GML⁺⁴⁰⁵*, *GML⁺⁵⁷³* und Mikrosatelliten *ILSTS039*, *CSSM066* in allen ADR-Familien

Locus ADR-Familie	KIEL_E8¹		DGATI		CYP11B1		GML⁺⁴⁰⁵		GML⁺⁵⁷³		ILSTS039		CSSM066	
	F_{IS}	H-W-G	F_{IS}	H-W-G	F_{IS}	H-W-G	F_{IS}	H-W-G	F_{IS}	H-W-G	F_{IS}	H-W-G	F_{IS}	H-W-G
	(W&C ²)	P-value ³	(W&C ²)	P-value ³	(W&C ²)	P-value ³	(W&C ²)	P-value ³	(W&C ²)	P-value ³	(W&C ²)	P-value ³	(W&C ²)	P-value ³
AB	+0.183	0.467	-0.590	0.001***	-0.148	1	-0.051	1	ein Allel	-0.140	1	-0.277	0.014*	
AC	-0.281	0.089	-0.783	0.000***	-0.062	0.748	-0.012	1	-0.012	1	-0.384	0.099		
AD	-0.290	0.286	-0.750	0.001***	-0.031	1	-0.024	1	ein Allel	-0.055	0.654	-0.160	0.281	
AE	-0.538	0.001***	-1.000	0.000***	-0.124	1	-0.020	1	ein Allel	-0.169	0.946	-0.115	0.763	
AF	-0.333	0.265	-1.000	0.000***	-0.125	1	-0.000	---	ein Allel	-0.120	1	-0.038	0.229	
BC	+0.008	1	-0.227	0.012**	-0.047	0.691	-0.020	1	-0.012	1	-0.037	0.283		
BD	-0.002	1	-0.272	0.000***	-0.068	0.277	-0.022	1	-0.007	1	-0.054	0.982		
BE	-0.421	0.030*	-1.000	0.000***	-0.227	0.548	-0.125	0.646	ein Allel	-0.068	0.829	-0.181	0.022*	
CD	-0.004	1	-0.692	0.002**	-0.128	1	-0.000	---	ein Allel	n. t. ⁴	-0.105	0.941		
CE	+0.275	0.156	-0.538	0.005**	-0.154	1	+0.000	---	ein Allel	+0.140	0.311	+0.150	0.160	
CF	-0.294	0.028*	-0.965	0.000***	-0.240	0.084	-0.047	1	-0.244	0.099	-0.051	0.304		
CG	-0.037	1	-0.102	0.698	+0.051	1	-0.098	1	ein Allel	-0.034	0.763	+0.060	0.253	
CH	-0.241	0.539	-0.241	0.541	-0.091	1	-0.000	---	ein Allel	n. t. ⁴	n. t. ⁴	n. t. ⁴		
CI	-0.371	0.127	-1.000	0.000***	-0.116	1	ein Allel	---	ein Allel	-0.091	0.478	+0.072	0.232	
CK	+0.057	0.760	-0.608	0.000***	-0.139	1	-0.065	1	-0.000	---	-0.204	0.950		
DA	-0.355	0.000***	-0.754	0.000***	-0.070	0.225	-0.029	1	-0.011	1	-0.196	0.000***		
EA	-0.002	1	-0.406	0.002**	-0.147	0.322	-0.063	1	ein Allel	-0.096	0.341	-0.077	0.255	
FA	-0.052	0.790	-0.486	0.000***	-0.233	0.089	-0.027	1	ein Allel	-0.009	0.611	-0.167	0.003**	
GA	ein Allel		-1.000	0.000***	-0.226	0.061	-0.133	0.268	ein Allel	-0.201	0.888	n. t. ⁴		
HA	-0.017	1	-1.000	0.000***	-0.091	1	-0.052	1	ein Allel	+0.017	0.842	n. t. ⁴		
IA	-0.026	1	-0.873	0.000***	-0.124	1	-0.068	0.781	ein Allel	-0.198	0.919	-0.203	0.831	
KA	ein Allel		-1.000	0.000***	-0.255	0.295	-0.143	1	ein Allel	-0.366	0.084	-0.055	0.895	

¹ KIEL_E8 Allelfrequenzen wurden von J. Bennewitz, Kiel (ADR Datenbank) übernommen; ² geschätzt nach Weir & Cockerham (1984); ³ signifikante Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht; ⁴ nicht typisiert; *P ≤ 0.05 **P ≤ 0.01 ***P ≤ 0.001

In der ADR Holstein Population war die Häufigkeit der Frequenzen am *CYP11B1* Locus in Richtung des Valin (V) Allels verschoben. Dieser Trend wiederholte sich auch in den Fleckvieh- und Braunvieh-Familien. Über alle Familien wurde in der Holstein Population eine Frequenz für *CYP11B1*^V von 0,771 (0,609 - 0,895) und *CYP11B1*^A von 0,229 (0,105 - 0,391) festgestellt, in der Fleckviehpopulation für *CYP11B1*^V von 0,868 (0,812 - 0,910) und *CYP11B1*^A von 0,132 (0,090 - 0,188), sowie in der Braunvieh Population für *CYP11B1*^V von 0,797 und für *CYP11B1*^A von 0,203. *CYP11B1* Allelfrequenzen der einzelnen Holstein-, Fleckvieh- und Braunvieh-Familie können [Tabelle 4.4](#) entnommen werden.

Die Frequenzen der erwarteten ([Tabelle 4.5](#)) und beobachteten ([Tabelle 4.6](#)) Genotypen des *CYP11B1* Gens waren in der Mehrzahl der Familien in guter Übereinstimmung. Keine der 18 Holstein-, 3 Fleckvieh- und der Braunvieh-Familie wich signifikant vom HWG ([Tabelle 4.7](#)) ab. F_{IS} -Werte (Weir & Cockerham 1984) waren bis auf eine ADR-Familie (CG) an diesem Locus negativ und zeigten einen Heterozygoten Überschuss an. Auch an diesem Locus wurden insgesamt mehr Heterozygote festgestellt, als unter HWG erwartet werden kann.

4.1.3.2.1 Molekulare Analyse des *CYP11B1*-Gens und eines *CYP11B1*-Pseudogens

Das Screening der BAC-Bank RZPD_BBI-B750 identifizierte einen BAC-Klon (RZPD-B750K2432Q2), der durch Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH), wie in [Abbildung 4.5a](#) gezeigt, in die QTL-Region auf *BTA14q12* kartiert werden konnte.

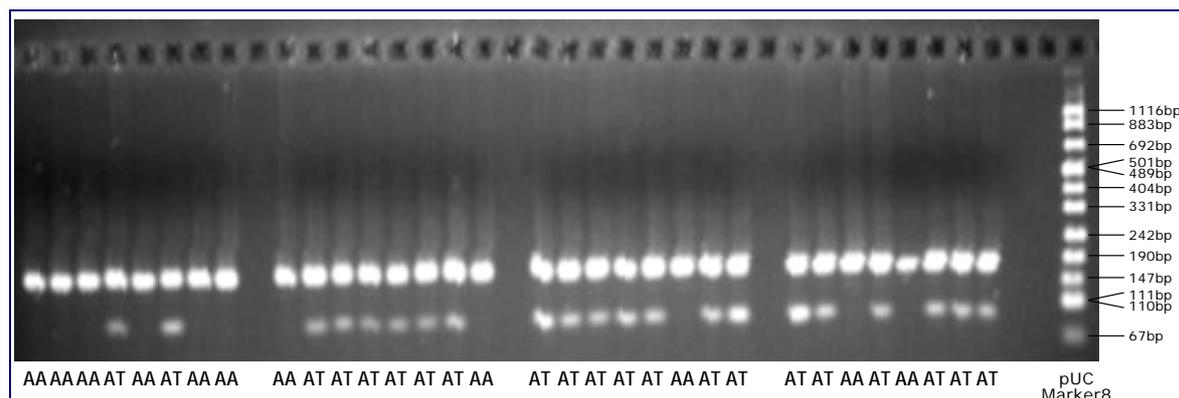


Abbildung 4.8: Elektropherogramm eines mit Restriktionsenzym *DdeI* verdauten Mischamplifikates aus kodierendem *CYP11B1*-Gen und *CYP11B1*-Pseudogen. Aufgrund der Überlagerung von Signalen aus zwei verdauten Amplifikaten (Mischamplifikat) pro DNA-Probe sind nur zwei Genotypen (AA, AT) zu erkennen. "Genotyp AA" liegt in beiden Genen (*CYP11B1*, *CYP11B1P*) vor. Dem "Genotyp AT" kann jedoch eine Signalüberlagerung aus den Kombinationen AA+AT oder AA+TT hinterliegen.

Dieser Klon trägt mindestens zwei Kopien des bovinen *CYP11B1* Gens, wovon eine Kopie für ein Genprodukt kodiert [EC: 1.14.15.4], die andere jedoch ein Pseudogen (*CYP11BIP*) darstellt. Ein erster Ansatz einer Typisierung der polymorphen Nukleotidposition 79 mittels eines PCR-RFLPs führte zu einer Differenzierung von anscheinend lediglich zwei Genotypen (AA, AT), da PCR Primer, aufgrund von Sequenzübereinstimmung der Template von *CYP11B1* und *CYP11BIP* ein Mischamplifikat von kodierendem Gen und Pseudogen erzeugten. Der Verdau mit Restriktionsenzym *DdeI* führte wie in [Abbildung 4.8](#) gezeigt bei der elektrophoretischen Auftrennung in jedem Verdau zu einer Überlagerung und in Folge zu scheinbar zwei Genotypen. Der Polymorphismus befindet sich im Pseudogen, das kodierende *CYP11B1* ist an dieser Position monomorph. Aufgrund dessen liegt der Schluss nahe, dass "Genotyp AA" in beiden Genen (*CYP11B1*, *CYP11BIP*) vorkommt. Dem "Genotyp AT" kann jedoch eine Signalüberlagerung aus den Kombinationen AA+AT oder AA+TT hinterliegen.

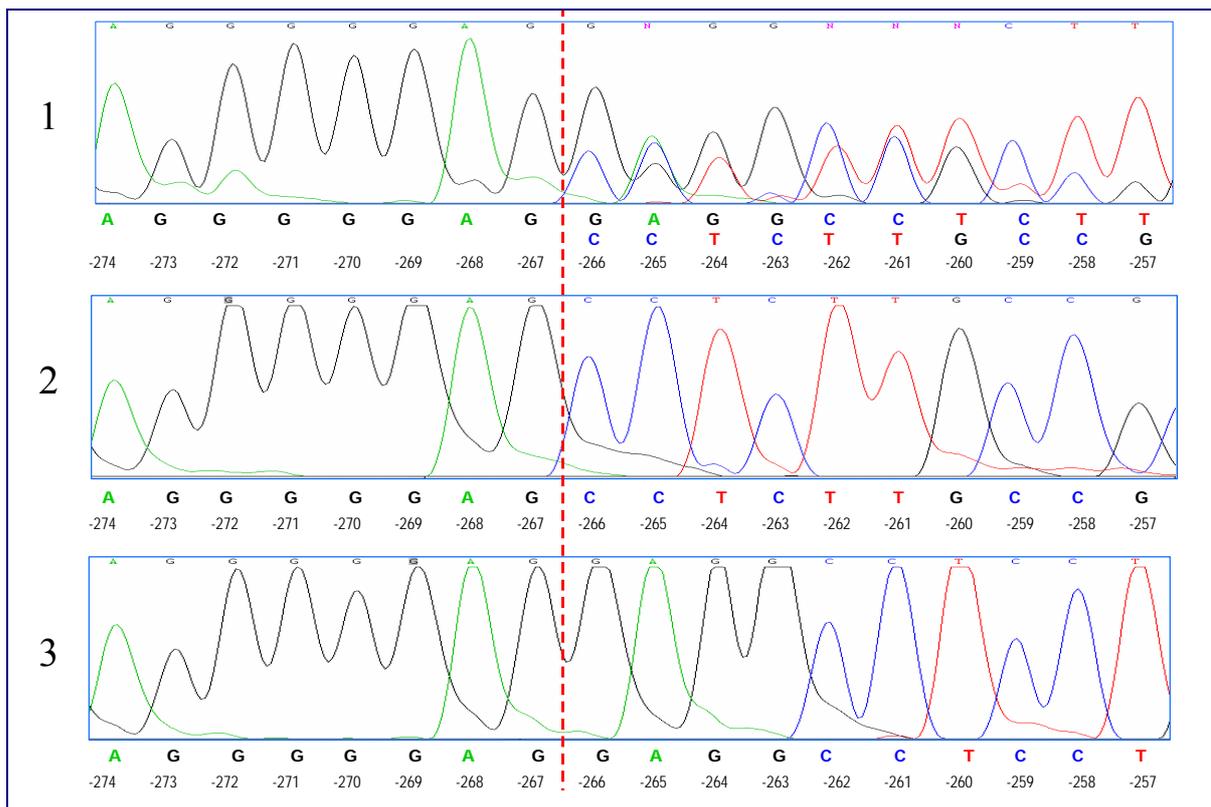


Abbildung 4.9: Detektion einer 4 bp großen Deletion (GAGG) in der Promotorregion des bovinen *CYP11BIP*-Gens durch Sequenzierung. Reihe 1 zeigt die Sequenzierung eines Mischamplifikates aus dem *CYP11B1*-Gen und *CYP11BIP*-Gen. Reihe 2 zeigt die Sequenzierung eines Subklons des bovinen *CYP11BIP*-Gens. Reihe 3 zeigt die Sequenzierung eines Subklons des *CYP11B1*-Gens. Die unterbrochene Linie markiert den Beginn der Doppelsequenz.

Die Sequenzierung eines Mischamplikates aus der 5'-Region von *CYP11B1* (Gen/Pseudogen) von 33 Tieren erbrachte das Ergebnis einer Doppelsequenz ab Sequenzposition -266 wie in **Abbildung 4.9** dargestellt, wobei der Leserahmen um 4 Nukleotide verschoben war. Dieser Befund ließ auf eine Deletion von 4 Basenpaaren in einer der beiden Sequenzen schließen. Sich daraus ergebende Nukleotidsubstitutionen sind in **Tabelle 4.8** dargestellt.

Tabelle 4.8: Nukleotidsubstitutionen zwischen kodierendem *CYP11B1*-Gen und *CYP11B1*-Pseudogen in der Promotorregion und im Exon 1.

Nukleotid Position	(5'-Region und Exon 1)	
	<i>CYP11B1</i>	<i>CYP11B1P</i>
- 266	G	-
- 265	A	-
- 264	G	-
- 263	G	-
- 212	C	T
- 211	A	G
- 157	G	C
- 62	C	T
+ 59	A	G
+ 65	G	A
+ 68	T	C
+ 89	T	C
+ 114	C	T
+ 180	T	C

(-) Richtung 3' → 5'

(+) Richtung 5' → 3'; A (ATG) = 1

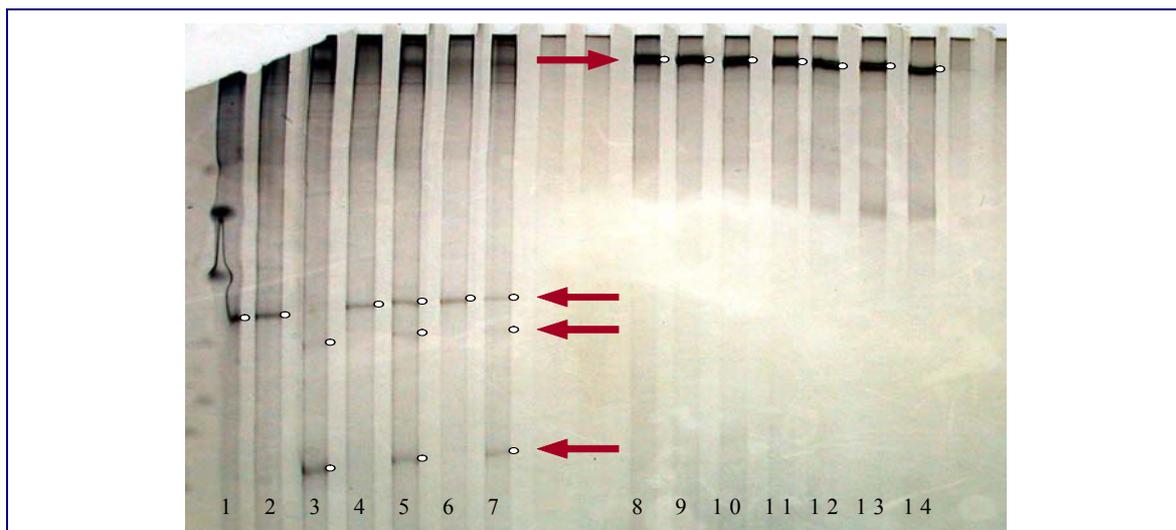


Abbildung 4.10: Darstellung eines PCR-RFLPs auf SSCP Gel (DSCN3034). Beide PCRs wurden identisch durchgeführt, jedoch mit unterschiedlichen forward Primern (links Primer 245, rechts Primer 256) die dazu entworfen waren, allelspezifisch zwischen kodierendem und pseudo bovinem *CYP11B1* Gen zu differenzieren. Anschliessend wurden

beide PCR-Produkte ü.N. mit dem Restriktionsenzym *BccI* verdaut und auf SSCP Gel unter identischen Bedingungen (10% PA37, 1% GLE, 650V, 5h, 5°C) aufgetrennt. Die linke Gelhälfte zeigt Genotypen (←) AA, BB, AA, AB, AA, AB (Spuren 2-7) unabhängige Segregation von zwei Allelen. In der rechten Gelhälfte (Spur 8-14) ist keine Segregation (→) zu beobachten. Die dargestellten Bandenkombinationen bestätigen die Typisierung des PCR-RFLPs auf Agarosegel, sowie die Unterschiedlichkeit beider Amplifikate.

4.1.3.2 Allelspezifische PCR

Durch Subklonierung der PCR Produkte und anschließender Sequenzierung der MINI-DNA-Präparationen konnte eine Deletion von 4 Basen (GAGG) in der Promotorregion des *CYP11B1*-Pseudogens nachgewiesen werden. Auf der Grundlage dieser Sequenzen und unter Nutzung der Deletion wurden sechs Primerpaare (245/195, 251/195, 252/195, 253/195, 255/195, 256/195) entworfen, wie in [Abbildung 4.11](#) gezeigt. Die Sequenzierung der Subklone mit M13 Primern forward und reverse erbrachten die in [Tabelle 4.8](#) aufgeführten Sequenzunterschiede.

Mit differenzierenden Primersystemen hergestellte PCR-Amplifikate konnten in der SSCP-Gelelektrophorese aufgrund unterschiedlicher Migration im elektrischen Feld durch Tertiärstrukturunterschiede klar differenziert werden ([Abbildung 4.10](#)). Dazu wurden mit 2 mal 2 Paaren der in [Abbildung 4.11](#) dargestellten Primersysteme (245+195, 251+195, 255+195, 256+195) vier verschiedene PCR-Produkte amplifiziert. Zwei PCR amplifizierten ca. 570 bp des kodierenden und zwei PCR amplifizierten den homologen Abschnitt des Pseudogens. Diese PCR-Produkte wurden nach einem Verdau mit Restriktionsenzym *BccI* durch eine SSCP-Polyacrylamidgel-Elektrophorese nachweislich als für beide Genvarianten spezifisch amplifizierende Primersysteme bestätigt.

	Primer forward▶	Deletion im <i>CYP11B1</i> - Pseudogen	◀ reverse Primer	
245	ATACTGGAGGGGGAGGAGG	GAGG AACACCCTCACGTTCTGTCC	195
251	CCATACTGGAGGGGGAGGAG	GAGG AACACCCTCACGTTCTGTCC	195
252	CCCATACTGGAGGGGGAGGA	GAGG AACACCCTCACGTTCTGTCC	195
253	TCCATACTGGAGGGGGAGG	GAGG AACACCCTCACGTTCTGTCC	195
*255	CATACTGGAGGGGGAG	GAGG CCTC..... AACACCCTCACGTTCTGTCC	195
*256	ACTGGAGGGGGAG	GAGG CCTCTTG..... AACACCCTCACGTTCTGTCC	195

Abbildung 4.11: Entwicklung selektiver PCR-Primer. Die Primersequenzen wurden derart gelegt, das Primer 245, 251, 252, 253 mit ihrem 3'-Ende genau in der Deletion lagen und somit nicht im Pseudogen amplifizieren konnten. Pseudogen-PCR-Primer *255 und *256 enthielten nicht die deletierten Nukleotide und konnten somit nicht im kodierenden Gen amplifizieren.

Validierung des PCR-RFLP: Zur weiteren Absicherung der Spezifität wurde der zur Typisierung des ADR-Familienmaterials entwickelte PCR-RFLP Assay des V30A Polymorphismus im bovinen *CYP11B1*-Gen an unabhängigem Deutsch Angus Familienmaterial des Instituts für Tierzucht und Haustiergenetik überprüft. In [Abbildung 4.7](#) ist der elektrophoretisch getrennte *Pst*I-Verdau eines PCR-Produktes mit SNP an Nukleotidposition 79 (V30A) des unreifen *CYP11B1*-Proteins dargestellt. Die vollständige Segregation der elterlichen Allele in zwei unterschiedlichen Anpaarungen mit Kälbern mehrerer Jahrgänge kann beobachtet werden.

4.1.3.3 Genotypisierung und Allelfrequenzen des GML Gens

Durch Analyse des zur bovinen QTL-Region homologen humanen genomischen Kontexts auf *HSA8*, sowie durch unterstützende Information der "Interactive Bovine In Silico SNP" Datenbank (IBISS), konnte auf *BTA14* das nächstgelegene Gen in telomerischer Richtung des *CYP11B1*-Gens lokalisiert werden. Mit Hilfe der Sequenz des "Homo sapiens GPI anchored molecule like protein (*GML*)" (Genbank Acc.: NM_002066) wurden bovine ESTs lokalisiert. An Hand von EST-Primern (forward 5'-GGGATGATGCTCCTCTTTGC-3', reverse 3'-CGCATGGAGACAGTAAAACAGC-5') konnte ein 760bp großes PCR-Fragment amplifiziert werden. PCR-Direktsequenzierung erbrachte eine Teilsequenz des bovinen "hypothetical protein MGC134423"-Gen (bovines *GML* Paralogon, Genbank MGC134423, NCBI GeneID: 767955) beginnend mit dem Transkriptionsstart. Sequenziert wurden Exon 1 (58 bp), Intron 1 (593 bp) und Exon 2 (107bp partiell). Ein Sequenz-Alignment von 23 PCR-Direktsequenzierungen aus DNA von Vätern des ADR-Familienmaterials, sowie einer BAC-MIDI-Präparation (BAC-Klon RZPD-B750K2432Q2) ergab mehrere Nukleotidabweichungen zwischen den Sequenzen, von denen sich 2 SNP an Basenpaarpositionen +405 und +573 zu typisierbaren PCR-RFLPs mit den Restriktionsenzymen *Bcc*I (+405) und *Hinf*I (+573) entwickeln ließen.

Validierung des PCR-RFLPs: Die zur Typisierung des ADR-Familienmaterials entwickelten PCR-RFLPs aus Sequenzunterschieden des bovinen *GML*-Gens (Genbank MGC134423) wurden an unabhängigem Deutsch Angus Familienmaterial überprüft. In [Abbildung 4.12](#) ist der SNP (Position +405) durch Restriktionsverdau (*Bcc*I) dargestellt. Die vollständige Segregation der elterlichen Allele in zwei unterschiedlichen Anpaarungen mit Kälbern aus mehreren Jahrgängen kann beobachtet werden.

GML-Genotypisierungen und Allelfrequenzen: Allelische Variation am bovinen *GML* Locus zeigte drei klar unterscheidbare Genotypen, wie in **Abbildung 4.13** in einem Elektropherogramm eines *PstI*-Restriktionsverdaus dargestellt. Die drei möglichen Genotypen sind jeweils, für die Transition (SNP) an Nukleotidposition +405: GG, GA, AA und für die Transversion (SNP) an Nukleotidposition +573: GG, GT, TT.

NCBI Genbank Accession Number AY950682

```

.....:.....:.....:.....:.....:.....:      60
ATGCTCCTCTTTGCCTTCCTCCTCTTCATGGGATTGCCACTGGGCTTCGTCGAGCCCTGT
.....:.....:.....:.....:.....:.....:      120
GAGTATCAGTGCTTCTGTTTCTTGAAGAGGATGAGACTTGACTTTATTGGGGTCATTTTA
.....:.....:.....:.....:.....:.....:      180
AGGGTCTGAATGGAATTTTCACCATTTTAGCCAGCTGAGATCTCCATCTTAGCAATTGTG
.....:.....:.....:.....:.....:.....:      240
CAGTTGGTGAGCACAGGGTGTCCAGGAACATGGGGAGGGTCAGGATGGAGGGAAGCCCT
.....:.....:.....:.....:.....:.....:      300
CTAAGGACCAGTGGATGCACGGCCGCACGGTGGGCACGGGGGAGTCTCTGGCTGTGGCCC
.....:.....:.....:.....:.....:.....:      360
TTCCTCTTTGGAACAGGCGGGCATGGCTGGGTGCAGGGAACTCAGGGAGGCTTTGGTCCC
.....:.....:.....:.....:.....:.....:      420
TTATGACTACATAAGGGACCTGTGAAAAGGTGGGTCCATCAACA GAGCAGAGGCTCACAG
.....:.....:.....:.....:.....:.....:      480
TCCTGACAGCTGGGAGCTTTCCTGAGAACCTGTCTCTGAGAAGAAAAAACTCCTGGGTGT
.....:.....:.....:.....:.....:.....:      540
ACCTGGCGTCCTGGTGTCCAGGAAGCTCATGCTGCCAGGCTCGGATCCCCTGATGACT
.....:.....:.....:.....:.....:.....:      600
GAGCTGTGTAACCTCATGGAGTCCTTGACGCT GAAGGAAGGGGCACGGCTGCTGGGCATA
.....:.....:.....:.....:.....:.....:      660
TGCAATGAGTGGCAATGAACGTGGAGTCTGACTCTGTTCTCTTTTATCTAGGGACCTTTA
.....:.....:.....:.....:.....:.....:      720
ACGTACAATGCCATGAGTGTATCTTGGAAAAACCTTCCATTGTACACTTAATAGAACGT
.....:.....:.....:.....:.....:.....:      780
GTCCTTATGACATTAGGCGCTGTTTTACTGTCTCCATGCG

```

Abbildung 4.12: Genomische Sequenz des bovinen *GML*-Paralogons (Genbank MGC134423). Die Abbildung zeigt Exon 1 (58bp), Intron 1 (593bp) und Teilsequenz Exon 2 (107bp). Exonische Sequenz ist unterstrichen. **G** an Nukleotidpositionen +405 (Transition G → A) und **G** +573 (Transversion G → T) kennzeichnen SNPs im Intron 1. Die dargestellte Sequenz wurde unter Genbank AY950682 beim NCBI hinterlegt: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=nucore&cmd=&term=AY950682&go=Go>)

Von 18 Holstein Großvätern war 1 Großvater heterozygot für $GML^{+405G+405A}$ und 17 homozygot für GML^{+405G} . Von 3 Fleckvieh Großvätern waren 2 heterozygot für $GML^{+405G+405A}$ und 1 Großvater homozygot für GML^{+405G} . Ein Braunvieh Großvater war homozygot GML^{+405G} .

Tabelle 4.9: Allelfrequenzen der multiallelischen Mikrosatelliten-Marker (*ILSTS039*¹, *CSSM066*²)¹ im ADR-Familienmaterial. Familien ohne Großväter und Väter.

Nr	Rasse	Fam.	Söhne	ILSTS039 Allele										CSSM066 Allele										
				217	219	221	223	225	227	229	231	178	180	182	184	186	188	190	192	194	196	198	200	202
1	Holstein	AB	15	0.000	0.813	0.031	0.000	0.031	0.094	0.031	0.000	0.000	0.281	0.094	0.031	0.000	0.281	0.000	0.031	0.000	0.031	0.000	0.000	0.000
2	Holstein	AC	41	0.012	0.250	0.012	0.000	0.619	0.024	0.060	0.024	0.000	0.012	0.000	0.107	0.357	0.071	0.155	0.000	0.286	0.000	0.012	0.000	0.000
3	Holstein	AD	15	0.000	0.500	0.000	0.000	0.438	0.031	0.031	0.000	0.000	0.000	0.250	0.031	0.375	0.000	0.125	0.031	0.188	0.000	0.000	0.000	0.000
4	Holstein	AE	47	0.000	0.792	0.021	0.000	0.052	0.031	0.104	0.000	0.000	0.000	0.292	0.083	0.052	0.063	0.448	0.000	0.063	0.000	0.000	0.000	0.000
5	Holstein	AF	19	0.000	0.825	0.025	0.000	0.100	0.025	0.025	0.000	0.000	0.050	0.325	0.050	0.025	0.025	0.500	0.000	0.000	0.000	0.025	0.000	0.000
6	Holstein	BC	112	0.004	0.584	0.018	0.004	0.310	0.018	0.044	0.018	0.004	0.013	0.004	0.071	0.292	0.049	0.509	0.000	0.044	0.009	0.004	0.000	0.000
7	Holstein	BD	112	0.000	0.571	0.027	0.000	0.301	0.031	0.066	0.004	0.004	0.000	0.009	0.115	0.292	0.022	0.487	0.000	0.071	0.000	0.000	0.000	0.000
8	Holstein	BE	26	0.000	0.537	0.000	0.000	0.148	0.259	0.056	0.000	0.000	0.000	0.130	0.296	0.019	0.222	0.000	0.056	0.000	0.000	0.278	0.000	0.000
9	Holstein	CD	23	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	0.000	0.000	0.038	0.077	0.058	0.038	0.327	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
10	Holstein	CE	29	0.000	0.467	0.033	0.000	0.433	0.017	0.033	0.017	0.000	0.000	0.000	0.033	0.067	0.083	0.433	0.383	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
11	Holstein	CF	24	0.000	0.580	0.040	0.000	0.080	0.080	0.060	0.160	0.000	0.000	0.020	0.040	0.040	0.060	0.720	0.000	0.120	0.000	0.000	0.000	0.000
12	Holstein	CG	28	0.000	0.535	0.035	0.000	0.310	0.086	0.035	0.000	0.000	0.000	0.017	0.259	0.103	0.121	0.448	0.000	0.052	0.000	0.000	0.000	0.000
13	Holstein	CH	19	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
14	Holstein	CI	25	0.000	0.635	0.192	0.000	0.115	0.000	0.058	0.000	0.000	0.000	0.077	0.096	0.000	0.596	0.019	0.192	0.000	0.000	0.019	0.000	0.000
15	Holstein	CK	41	0.000	0.738	0.036	0.000	0.119	0.071	0.024	0.012	0.000	0.000	0.000	0.071	0.083	0.333	0.405	0.000	0.107	0.000	0.000	0.000	0.000
16	Holstein	DA	111	0.005	0.304	0.255	0.000	0.366	0.013	0.054	0.005	0.005	0.013	0.027	0.049	0.348	0.036	0.219	0.005	0.295	0.000	0.000	0.005	0.000
17	Holstein	EA	59	0.000	0.575	0.067	0.000	0.233	0.067	0.050	0.008	0.000	0.000	0.017	0.108	0.258	0.075	0.475	0.000	0.067	0.000	0.000	0.000	0.000
18	Holstein	FA	55	0.000	0.652	0.027	0.000	0.268	0.027	0.027	0.000	0.000	0.009	0.018	0.250	0.098	0.214	0.000	0.375	0.000	0.018	0.000	0.000	0.000
19	Fleckvieh	GA	79	0.013	0.019	0.038	0.095	0.728	0.089	0.019	0.000	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
20	Fleckvieh	HA	61	0.008	0.033	0.312	0.049	0.541	0.049	0.008	0.000	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
21	Fleckvieh	IA	56	0.000	0.079	0.035	0.000	0.026	0.746	0.097	0.018	0.000	0.018	0.035	0.009	0.553	0.018	0.263	0.000	0.018	0.018	0.070	0.000	0.000
22	Braunvieh	KA	32	0.000	0.621	0.030	0.000	0.197	0.136	0.015	0.000	0.015	0.000	0.061	0.030	0.500	0.000	0.030	0.000	0.303	0.000	0.015	0.030	0.015

¹ ILSTS039¹ & CSSM066² Allelfrequenzen wurden von J. Bennewitz¹ bzw. C. Kühn² (ADR Datenbank) übernommen; n.t. = nicht typisiert

Von 18 Holstein Großvätern war 1 Großvater heterozygot für $GML^{+573G+573T}$ und 17 homozygot für GML^{+573G} . Drei Fleckvieh Großväter waren homozygot für GML^{+573G} . Ein Brown-Swiss Großvater war homozygot GML^{+573G} .

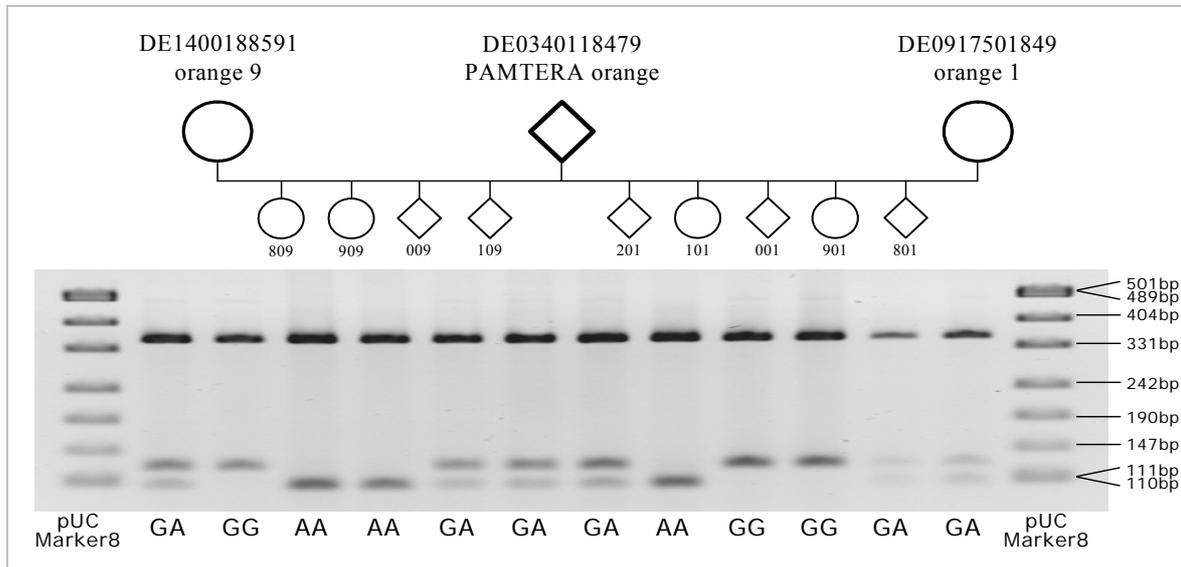


Abbildung 4.13: Segregation beider PCR-RFLP Allele (*BccI*) des Polymorphismus an Position +405 in Intron 1 des bovinen *GML*-Gens, dargestellt an zwei Halbgeschwister-Familien. Gezeigt ist in der Mitte der Abbildung der verdaute Genotyp des Deutsch Angus Bullen PAMTERA (orange) und an beiden Enden des Gels die Genotypen der beiden mit ihm angepaarten Deutsch Angus Kühe "orange 9" und "orange 1". Dazwischen liegend aufgeführt befinden sich die Genotypen der aus den jeweiligen Anpaarungen resultierenden Kälber der Jahrgänge '98, '99, '00, '01 bzw. '98, '99, '00, '01, '02. Die beiden äußeren Spuren sind mit DNA Größenmarker (pUC Marker 8) belegt.

In der ADR Holstein Population war die Häufigkeit der Frequenzen am GML^{+405} Locus sowie am GML^{+573} Locus extrem in Richtung eines Allels verschoben. Dieser Trend wiederholte sich am GML^{+405} Locus in der Braunvieh Familie in abgeschwächter Form, jedoch nicht in den Fleckvieh Familien. Hier waren die Frequenzen annähernd ausgeglichen. Für den GML^{+405} Locus wurde über alle Familien in der Holstein Population eine Frequenz für GML^{+405G} von 0,949 (0,750 - 1,000) und GML^{+405A} von 0,051 (0,250 - 0) festgestellt, in der Fleckviehpopulation für GML^{+405G} von 0,678 (0,556 - 0,844) und GML^{+405A} von 0,322 (0,444 - 0,156), sowie in der Braunvieh Population für GML^{+405G} von 0,859 und GML^{+405A} von 0,141. Für den GML^{+573} Locus wurde über alle Familien in der Holstein Population eine Frequenz für GML^{+573G} von 0,985 (0,804 - 1,000) und GML^{+573T} eine Frequenz von 0,015 (0,196 - 0,000) festgestellt, die Fleckvieh- und Braunvieh-Populationen waren homozygot für GML^{+573G} . $GML^{+405G+405A}$ und $GML^{+573G+573T}$ Allelfrequenzen der einzelnen Holstein-, Fleckvieh- und Braunvieh-Familie können [Tabelle 4.4](#) entnommen werden.

Tabelle 4.10: Genotypfrequenzen (in absolutem & relativem Vorkommen) der multiallelischen Mikrosatelliten-Marker (*ILSTS039*¹, *CSSM066*²)¹ im ADR-Familienmaterial Holstein und Fleckvieh. Populationen ohne Großväter und Väter.

		ILSTS039 ¹																						
Allel 1	217	219	217	219	221	219	217	219	221	223	225	217	219	221	225	227	219	221	225	227	229	227		
	219	219	221	221	221	225	225	225	225	225	225	227	227	227	227	227	229	229	229	229	229	229		
Holstein	1	303	1	125	12	3	1	386	47	2	91	0	42	7	39	1	59	24	50	1	59	24	50	
	0,1%	23,5%	0,1%	9,7%	0,9%	0,2%	0,1%	29,9%	3,6%	0,2%	7,0%	0	3,3%	0,5%	3,0%	0,1%	4,6%	1,9%	3,9%	0,1%	4,6%	1,9%	3,9%	
Fleckvieh	0	0	1	2	5	0	0	0	4	0	0	2	14	28	21	83	0	2	0	31	0	2	0	
	0	0	0,5%	1,0%	2,5%	0	0	0	2,0%	0	0	1,0%	7,0%	13,9%	10,4%	41,3%	0	1,0%	0	15,4%	0	1,0%	0	
		CSSM066 ²																						
Allel 1	219	221	225	227	229																			
	231	231	231	231	231																			
Holstein	16	6	18	4	3																			
	1,2%	0,5%	1,4%	0,3%	0,2%																			
Fleckvieh	0	0	0	6	0																			
	0	0	0	3,0%	0																			
Allel 1	180	182	180	182	184	186	182	184	186	188	182	184	186	188	178	180	182	184	186	188	184	186	188	
	182	182	184	184	184	186	186	186	186	188	190													
Holstein	3	2	3	6	2	1	7	15	43	35	2	5	35	2	1	4	28	49	137	42	4	28	49	137
	0,4%	0,3%	0,4%	0,8%	0,3%	0,1%	0,9%	1,9%	5,4%	4,4%	0,3%	0,6%	4,4%	0,3%	0,1%	0,5%	3,5%	6,2%	17,3%	5,3%	0,5%	3,5%	6,2%	17,3%
Fleckvieh	0	0	0	0	0	0	2	3	0	13	0	0	2	0	0	0	1	1	21	0	0	1	1	21
	0	0	0	0	0	0	3,8%	5,4%	0	23,2%	0	0	3,8%	0	0	0	1,8%	1,8%	37,5%	0	0	1,8%	1,8%	37,5%
Allel 1	190	182	186	178	180	182	184	186	188	190	192	194	182	186	190	184	186	190	194	194	198	190	194	194
	190	192	192	194	196	198	198	198	200															
Holstein	125	1	1	1	13	14	49	16	101	2	24	1	1	1	1	4	2	10	3	2	4	2	10	3
	15,7%	0,1%	0,1%	0,1%	1,6%	1,8%	6,2%	2,0%	12,7%	0,3%	3,0%	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%	0,5%	0,3%	1,3%	0,4%	0,3%	0,5%	0,3%	1,3%	0,4%
Fleckvieh	1	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	1	1	0	5	3	0	0	0	3	0	0
	1,8%	0	0	0	0	0	3,8%	0	0	0	0	0	1,8%	1,8%	0	8,9%	5,4%	0	0	0	8,9%	5,4%	0	0

¹ ILSTS039¹ & CSSM066² Allelfrequenzen wurden von J. Bennewitz¹ bzw. C. Kühn² (ADR Datenbank) übernommen

Die Frequenzen der erwarteten (Tabelle 4.5) und beobachteten (Tabelle 4.6) Genotypen der GML^{+405} und GML^{+573} Loci waren in allen Familien in sehr guter Übereinstimmung. Keine der 18 Holstein-, 3 Fleckvieh- und der Braunvieh-Familie mit heterozygoten Söhnen wich signifikant vom HWG (Tabelle 4.7) ab. F_{IS} -Werte (Weir & Cockerham 1984) waren bis auf eine ADR-Familie (CE) an diesem Locus negativ und zeigten einen Heterozygoten Überschuss an, wenn auch nur in geringer Anzahl. Dadurch wurden auch an diesen Loci insgesamt mehr Heterozygote festgestellt, als unter HWG erwartet werden können.

4.1.3.4 Genotypenfrequenzen und Allelfrequenzen der Mikrosatellitenmarker

ILSTS039 und *CSSM066*

Allelfrequenzen der Mikrosatellitenmarker *ILSTS039* und *CSSM066* wurden von J. Bennowitz bzw. C. Kühn aus der ADR-Datenbank (Kiel) übernommen. Mit *ILSTS039* waren 1501 Bullen, davon 16 Holstein-Familien (1248 Söhne), 3 Fleckvieh-Familien (199 Söhne) und 1 Braunvieh-Familie (32 Söhne), sowie 3 Great- und 22 Grandsires typisiert. Mit *CSSM066* waren 911 Bullen, davon 17 Holstein Familien (797 Söhne), 1 Fleckvieh-Familie (56 Söhne) und 1 Braunvieh-Familie (33 Söhne), sowie 3 Great- und 22 Grandsires typisiert.

Wie aus Tabelle 4.9 ersichtlich, kamen von *ILSTS039* alle 8 Allele in unterschiedlichen Frequenzen im ADR-Familienmaterial vor. In den Holstein Familien waren die vorkommenden Allele mit ihren Frequenzen: 217 (0,001), 219 (0,624), 221 (0,055), 223 (0,000), 225 (0,262), 227 (0,058), 229 (0,051), 231 (0,017), in den Fleckviehfamilien waren die vorkommenden Allele mit ihren Frequenzen: 217 (0,007), 219 (0,044), 221 (0,128), 223 (0,048), 225 (0,432), 227 (0,295), 229 (0,041), 231 (0,006) und in den Braunvieh-Familien waren die vorkommenden Allele mit ihren Frequenzen: 219 (0,621), 221 (0,030), 225 (0,197), 227 (0,136), 229 (0,015). Von *CSSM066* kamen von 13 Allelen maximal 12 Allele (Holstein) im ADR-Familienmaterial in unterschiedlichen Frequenzen vor. In den Holstein Familien waren die vorkommenden Allele mit ihren Frequenzen: 178 (0,001), 180 (0,024), 182 (0,081), 184 (0,088), 186 (0,189), 188 (0,068), 190 (0,410), 192 (0,049), 194 (0,122), 196 (0,002), 198 (0,020), 200 (0,002), in den Fleckvieh Familien waren die vorkommenden Allele mit ihren Frequenzen: 180 (0,018), 182 (0,035), 184 (0,009), 186 (0,553), 188 (0,018), 190 (0,263), 194 (0,018), 196 (0,018), 198 (0,070) und in den Braunvieh Familien waren die vorkommenden Allele mit ihren Frequenzen: 178 (0,015),

182 (0,061), 184 (0,030), 186 (0,500), 190 (0,030), 194 (0,303), 198 (0,015), 200 (0,030), 202 (0,015). Allelfrequenzen beider Marker können [Tabelle 4.9](#) entnommen werden.

Tabelle 4.10 zeigt die Genotypfrequenzen in absoluter und relativer Menge der multiallelischen Mikrosatelliten-Marker (*ILSTS039*, *CSSM066*) im ADR-Familienmaterial Holstein und Fleckvieh. Die Anzahl der Genotypen von *ILSTS039* und *CSSM066* variierten stark zwischen den Markern. Im ADR-Familienmaterial kamen von *ILSTS039* 25 unterschiedliche Genotypen (aus 8 Allelen) und von *CSSM066* 40 unterschiedliche Genotypen (aus 12 Allelen) vor, jedoch von beiden Markern insgesamt weniger in Fleckvieh als in Holstein. *ILSTS039* hatte in Holstein 24 und in Fleckvieh 12 Genotypen. *CSSM066* hatte in Holstein 40 und in Fleckvieh 13 Genotypen. Die Genotypen mit den höchsten Frequenzen in der Population sind zwischen den Rassen unterschiedlich. Holstein besitzt mit den Genotypen *ILSTS030*^{219/219} (23,5%), *ILSTS039*^{219/221} (9,7%) und *ILSTS039*^{219/225} (29,9%), sowie *CSSM066*^{190/190} (15,7%) und *CSSM066*^{190/194} (12,7%) weniger Variation an diesen Loci als Fleckvieh. Hier finden sich die Genotypen *ILSTS039*^{221/227} (13,9%), *ILSTS039*^{225/227} (10,4%), *ILSTS039*^{227/227} (41,3%), *ILSTS039*^{227/229} (15,4%), sowie *CSSM066*^{186/186} (23,2%) und *CSSM066*^{186/190} (37,5%).

4.2 Ergebnisse der Datenanalyse

4.2.1 Genetische Kartierung der Marker

Die genetischen Karten der ADR-Holstein-Population (1314 Bullen) und Fleckviehpopulation (205 Bullen) wurde aus den in dieser Arbeit neu entwickelten Markern *CYP11B1*, *GML*⁺⁴⁰⁵ und *GML*⁺⁵⁷³, dem im Rahmen dieser Arbeit typisierten Marker *DGATI*, sowie weiterer Typisierungsdaten von einem SSCP-Marker und 11 Mikrosatelliten aus dem ADR I Projekt (Thomsen *et al.* 2000) errechnet ([Abbildung 4.15](#)). Die neue geschlechtsspezifische (männliche) Karte von *BTA14* umfasst eine Größe von 156,2 cM (Kosambi) in Dt. Holsteins und 148,1 cM (Kosambi) in Dt. Fleckvieh. Durch die Typisierungsdaten von 16 Loci in Holstein und 11 Loci in Fleckvieh waren insgesamt 4609 informative Meiosen für Holstein, und 443 für Fleckvieh repräsentiert ([Tabelle 4.11](#)). Die kleinsten Abstände in einem Markerpaar waren <1 cM (*KIEL_E8-DGATI*), die größten Abstände betragen 25,9 cM (Holstein) bzw. 46,0 cM (Fleckvieh). Die durchschnittlichen Intervalle lagen bei 11,1 cM bzw. 14,8 cM.

Tabelle 4.11: Beobachtete Heterozygotie der Markerloci, Polymorphismus-Informations-Gehalt (PIC) und informative Meiosen für 16 Marker auf *BTA14* zwischen Dt. Holstein und Dt. Fleckvieh Populationen.

Marker- loci	Heterozygotie ¹		PIC ²		informative Meiosen	
	Dt.Holstein	Dt.Fleckvieh	Dt.Holstein	Dt.Fleckvieh	Dt.Holstein	Dt.Fleckvieh
<i>KIEL_E8</i>	0.510	0.034	0.364	0.033	341	0
<i>DGAT1</i>	0.505	0.181	0.367	0.177	362	32
<i>CYP11B1</i>	0.443	0.270	0.332	0.206	550	0
<i>GML</i> ⁺⁴⁰⁵	0.075	0.461	0.071	0.346	16	65
<i>GML</i> ⁺⁵⁷³	0.034	0.000	0.033	0	33	0
<i>ILSTS039</i>	0.672	0.554	0.601	0.492	800	42
<i>CSSM066</i>	0.763	0.729	0.725	0.559	627	35
<i>RM180</i>	0.585	<i>n.t.</i>	0.575	<i>n.t.</i>	306	<i>n.t.</i>
<i>RM11</i>	0.583	0.712	0.514	0.612	229	77
<i>BM4630</i>	0.276	0.232	0.262	0.203	83	0
<i>RM192</i>	0.672	0.425	0.610	0.376	316	33
<i>BMS1899</i>	0.772	<i>n.t.</i>	0.584	<i>n.t.</i>	96	<i>n.t.</i>
<i>BM4513</i>	0.718	<i>n.t.</i>	0.729	<i>n.t.</i>	192	<i>n.t.</i>
<i>BL1036</i>	0.827	0.890	0.787	0.801	516	159
<i>INRA092</i>	0.552	<i>n.t.</i>	0.511	<i>n.t.</i>	85	<i>n.t.</i>
<i>INRA100</i>	0.477	<i>n.t.</i>	0.470	<i>n.t.</i>	57	<i>n.t.</i>
<i>ü. a. Loci</i>	0.529	0.408	0.471	0.238	288	40

¹Heterozygotie wie in Nei (1973)

²PIC = Polymorphism Information Content wie in Bostein et al. (1980)

n.t. = nicht typisiert

ü. a. Loci = über alle Loci

Zwischen den Rassen folgten die beobachtete Heterozygotie, der Polymorphismus-Informations-Gehalt (PIC) und die Anzahl der informativen Meiosen keinem gemeinsamen Trend und unterschieden sich an einzelnen Loci erheblich. Die durchschnittliche beobachtete Heterozygotie aller Marker innerhalb der 1291 Söhne der Holstein-Familien betrug 0,529 und der 201 Söhne der Fleckvieh-Familien 0,408. Der PIC, gemessen in einem Bereich von 0 bis 1, war für Holstein in 56,2% aller polymorphen Marker > 0,5 und für Fleckvieh in 30% der polymorphen Marker > 0,5. Der PIC variierte in einem Bereich von 0,033 bis 0,787 in Holstein und von 0 bis 0,801 in Fleckvieh. Der durchschnittliche PIC-Wert betrug 0,471 in Holstein und 0,238 in Fleckvieh. In Holstein befanden sich 62,5% der Marker über dem PIC-Populationsmittel, bei Fleckvieh 60%. Alle 16 Marker zeigten in Holstein im Durchschnitt 288 informative Meiosen und in Fleckvieh 40. Hier lagen in Holstein 56,3% der Marker über dem Populationsmittel und in Fleckvieh 36,4%.

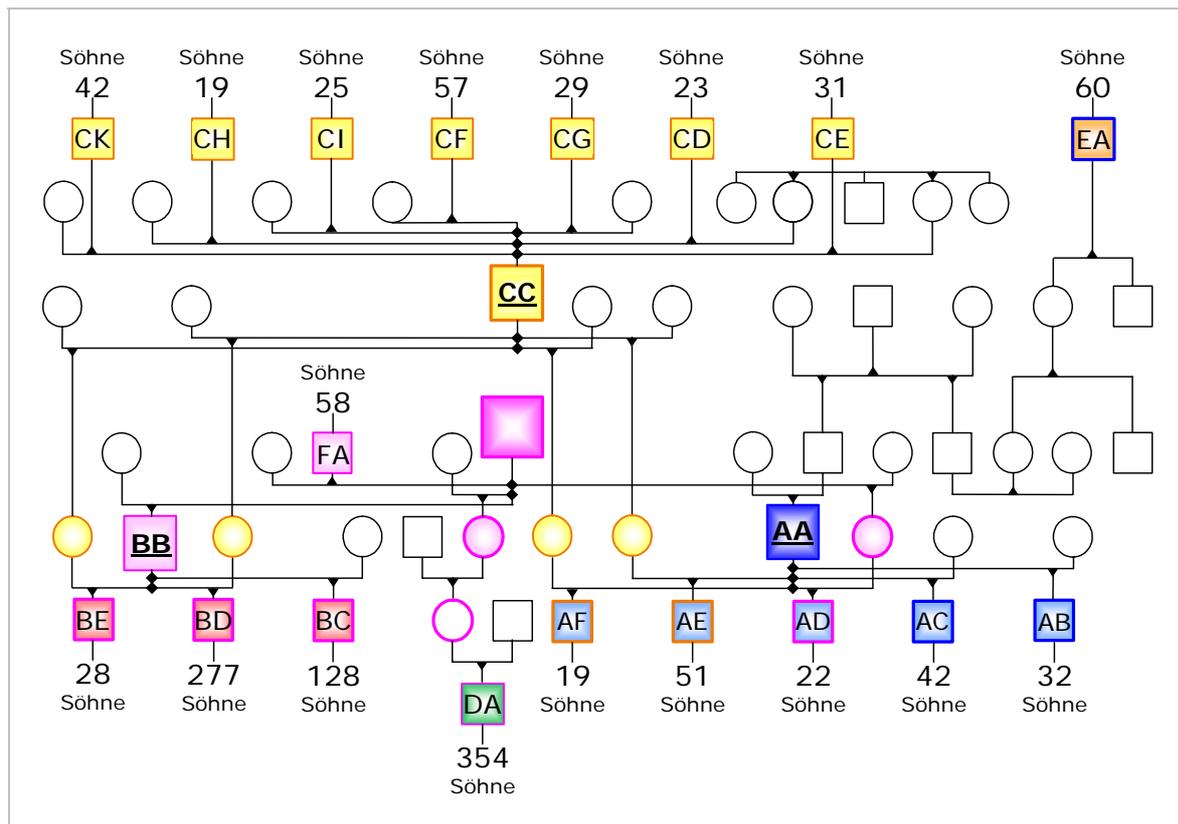


Abbildung 4.14: Das schematisierte Holstein-Familienmaterial der Arbeitsgemeinschaft Deutscher Rinderzüchter (ADR) zeigt Verwandtschaftsverhältnisse als Ergebnis einer Auswertung von Pedigree-Informationen mit Hilfe der Pedigree-Datenbank der Holstein-Association USA (URL 50) der in dieser Arbeit untersuchten Halbgeschwisterfamilien. Die Nutzung der kompletten Verwandtschaftsinformation ermöglicht genauere Kartierungsergebnisse. Quadrate (\square) kennzeichnen Bullen (Väter/Söhne) und Kreise (\circ) kennzeichnen Kühe (Mütter/Töchter). Leere und unbeschriftete Quadrate und Kreise kennzeichnen nicht im Familienmaterial enthaltene Tiere, die zur Vollständigkeit der Verwandtschaftsverhältnisse eingezeichnet sind. Unmarkierte Linienkreuzungen ($+ \perp$) sind ohne Informationsgehalt, markierte Linienkreuzungen führen zum Vater ($\blacklozenge + \perp$) oder zeigen Nachkommen ($\blacktriangledown + \perp$). AA, BB, CC sind Ur-Großväter (Great Grandsires). AB, AC, AD, AE, AF, BC, BD, BE, CD, CE, CF, CG, CH, CI und CK sind Großväter (Grandsires). Zusätzlich werden DA, EA und FA als unabhängige Großväter (Grandsires) geführt. Die Familiengrößen sind uneinheitlich. Jeder Großvater besitzt die in der Abbildung als Zahlen angegebene Menge von Söhnen (Sons). Wiederum deren weibliche Nachkommen (nicht im Schema enthalten) werden im Familienmaterial als Enkelinnen (Granddaughters) phänotypisch ausgewertet (Weller *et al.* 1990). Die farbliche Gestaltung verdeutlicht reziproke verwandtschaftliche Einflüsse der drei Ur-Großväter AA (blau), BB (rosa) und CC (gelb).

Das zum Errechnen der genetischen Karten genutzte CRI-MAP Programm (Green *et al.* 1990) berücksichtigt Pedigreedaten zur Abstammungskontrolle und Überprüfung der Typisierungen. Darüber hinaus ermöglicht die bekannte Stellung gemeinsamer Vorfahren im Stammbaum eine höhere Genauigkeit genetischer Karten (Green *et al.* 1990). Aus

diesem Grund wurde, wie in [Abbildung 4.14](#) gezeigt, die Verwandtschaft der Holstein Familien des ADR Familienmaterials anhand der Pedigrees der Holstein Association, USA untersucht und reziproke Verwandtschaftsverhältnisse dargestellt. Der Great-Grandsire AA wurde teilweise mit Töchtern des Great-Grandsires CC angepaart, sowie mit einer Tochter eines gemeinsamen Vorfahren der B-Familien. Der Grossvater des Bullen AA ist der Ur-Ur-Grossvater des Bullen EA. Great-Grandsire BB wurde ebenfalls mit Töchtern des Great-Grandsires CC angepaart und ist seinerseits, durch einen gemeinsamen Vater, Halbbruder zu FA. Der Great-Grandsire CC ist nicht durch gemeinsame Vorfahren, jedoch durch seine Töchter mit den A-Familien und B-Familien verwandt. Söhne CD und CE sind väterliche Habgeschwister wie alle anderen Söhne auch, ihre Mütter jedoch hatten ebenfalls einen gemeinsamen Vater. DA ist über seine mütterlichen Vorfahren mit BB und FA verwandt, denn der Vater von BB und FA ist sein Ur-Grossvater.

Im Einzelnen kartierten 16 Marker in der Dt. Holstein Population: *KIEL_E8* (0,0 cM), *DGAT1* (0,9 cM), *CYP11B1* (4,4 cM), *GML*⁺⁴⁰⁵ (5,7 cM), *GML*⁺⁵⁷³ (5,9 cM), *ILSTS039* (6,0 cM), *CSSM066* (15,7 cM), *RM180* (48,8 cM), *RM11* (63,2 cM), *BM4630* (64,6 cM), *RM192* (82,8 cM), *BMS1899* (93,5 cM), *BM4513* (125,4 cM), *BL1036* (154,9 cM), *INRA092* (156,2 cM), *INRA100* (156,2 cM).

In Dt. Fleckvieh Population kartierten 11 Marker: *KIEL_E8* (0,0 cM), *DGAT1* (0,0 cM), *CYP11B1* (11,6 cM), *GML*⁺⁴⁰⁵ (23,2 cM), *GML*⁺⁵⁷³ (24,5 cM), *ILSTS039* (25,7 cM), *CSSM066* (27,1 cM), *RM11* (73,2 cM), *BM4630* (92,8 cM), *RM192* (112,5 cM), *BL1036* (148,1 cM).

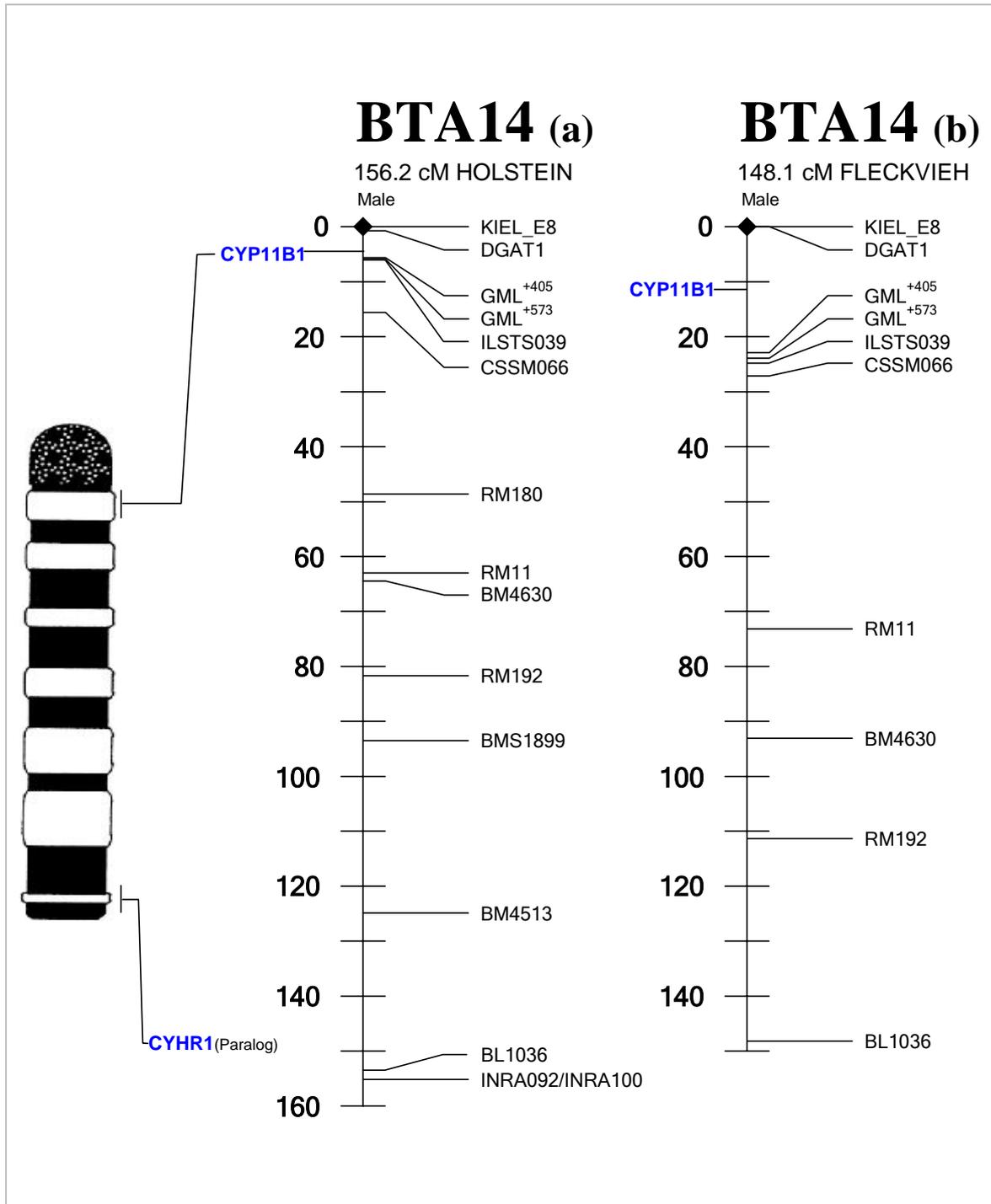


Abbildung 4.15a, b: Geschlechtsspezifische (männliche) genetische Karte des bovines Chromosoms 14 (*BTA14* a, b), sowie cytogenetische Karte (*BTA14*). Dargestellt sind die mit CRI-MAP (URL 44) gerechneten genetischen Karten der Holstein Population (a), sowie der Fleckviehpopulation (b) des ADR-Familienmaterials in Kosambi cM. Durch unterschiedliche Rekombinationsfrequenzen zwischen den Rassen unterscheiden sich die Karten in Größe, wie auch die Abstände zwischen den Markern variieren.

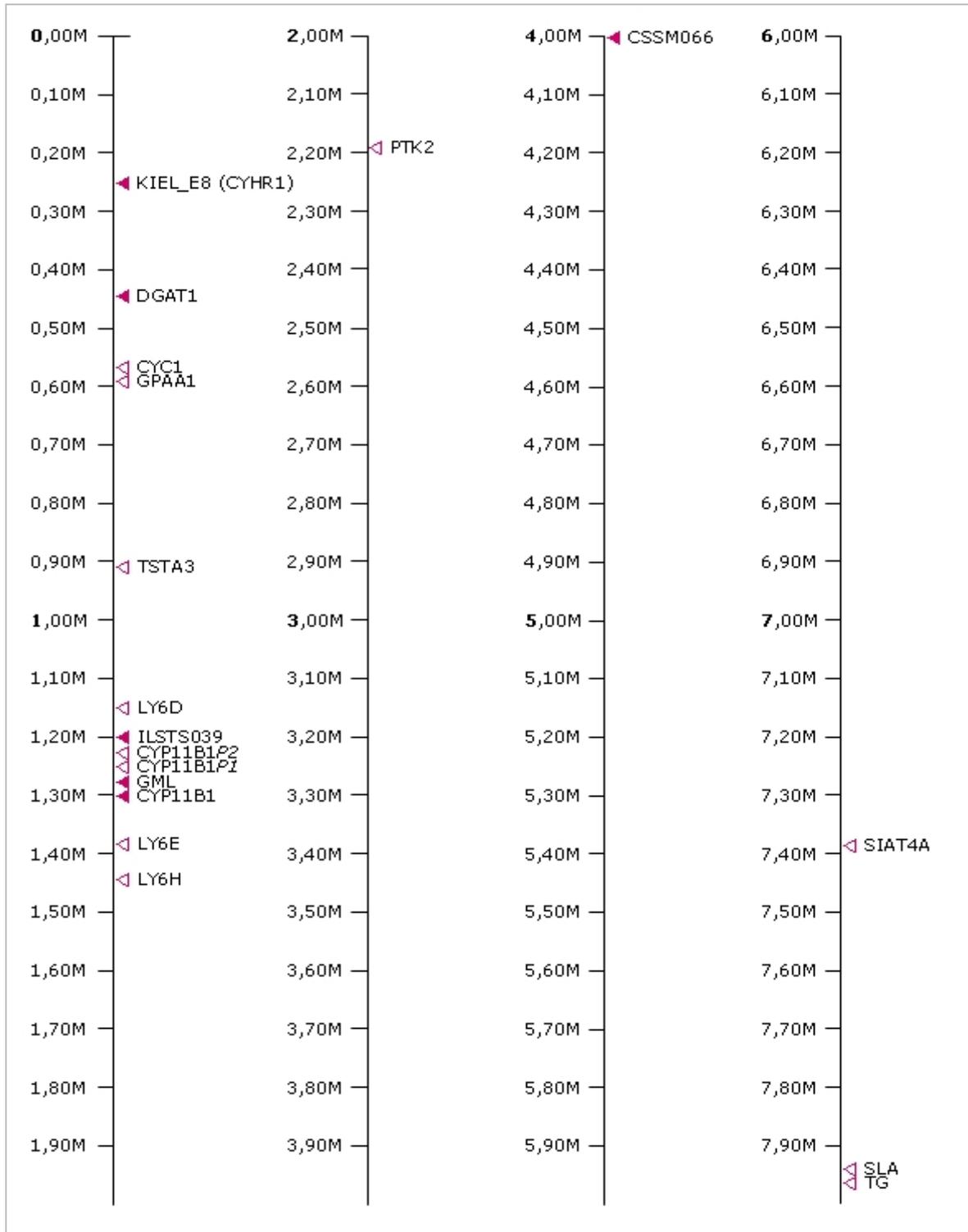


Abbildung 4.15c: Physische Karte des proximalen Endes von Chromosom 14 des Rindes, nach NCBI Bos taurus Build 4.0 (2009.06.09), verändert. Eingezeichnet sind 18 TypI- und TypII-Marker mit ihren jeweiligen chromosomalen Positionen in Basenpaaren:

◀ *KIEL_E8* (257K), ▶ *DGAT1* (445K), TSTA3 (909K), LY6D (1,2M), ▶ *ILSTS039* (1,2M), *CYP11B1P2* (1,2M), *CYP11B1P1* (1,3M), ▶ *GML* (1,3M), ▶ *CYP11B1* (1,3M), LY6E (1,4M), LY6H (1,5M), PTK2 (2,2M), ▶ *CSSM066* (4,0M), TG (8,04M).

◀ typisierte Marker, ◁ nicht typisierte Marker zur Orientierung in der QTL Region.

4.2.2 Analyse des Kopplungsungleichgewichts (LD) zwischen Markern

Mit Hilfe des Online Programms GENESPOP (URL 17, Weir & Cockerham, 1984) konnte das Kopplungsungleichgewicht zwischen den Genotypen der Marker der QTL-Region paarweise berechnet werden. Tabelle 4.12 zeigt die Ergebnisse des Fisher Test auf Unabhängigkeit. P-Werte wurden für jedes Marker-Marker-Paar über alle Holstein Populationen errechnet. Bis auf drei Kombinationen bei durchschnittlich 25,9 Freiheitsgraden (12-36) standen 12 Markerpaare in einem höchst signifikanten (**P), 2 Markerpaare in einem hoch signifikanten (*P) und 3 Markerpaare in einem signifikanten (*P) Kopplungsungleichgewicht.

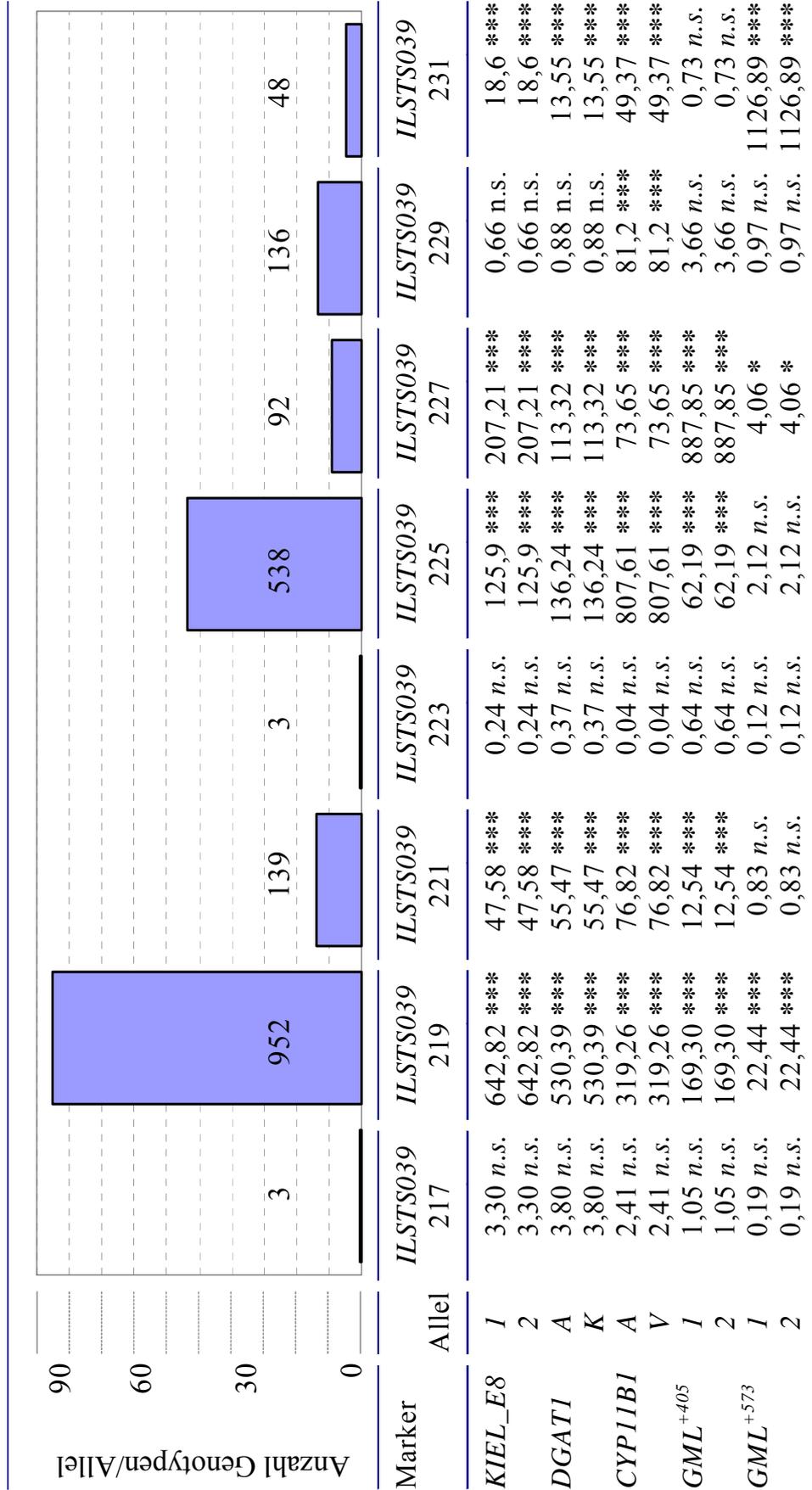
Tabelle 4.12: Fisher's Test auf Unabhängigkeit für jedes Marker-Marker-Paar über alle Holstein Populationen. Signifikanzen kennzeichnen Kopplungsungleichgewichte. (0 - Hypothese = "keine Kopplung"; geringes χ^2 = Annahme der 0 - Hypothese)

Markerpaare	χ^2	FG	P-Wert
<i>KIEL-E8</i> & <i>DGATI</i>	unendlich	28	<0.0001 ***
<i>KIEL-E8</i> & <i>CYP11B1</i>	unendlich	36	<0.0001 ***
<i>DGATI</i> & <i>CYP11B1</i>	unendlich	28	<0.0001 ***
<i>KIEL-E8</i> & <i>GML</i> ⁺⁴⁰⁵	58.833	34	0.005 *
<i>DGATI</i> & <i>GML</i> ⁺⁴⁰⁵	25.045	28	0.625 <i>n.s.</i>
<i>CYP11B1</i> & <i>GML</i> ⁺⁴⁰⁵	20.605	34	0.966 <i>n.s.</i>
<i>KIEL_E8</i> & <i>GML</i> ⁺⁵⁷³	31.716	12	0.002 *
<i>DGATI</i> & <i>GML</i> ⁺⁵⁷³	32.353	12	0.001 **
<i>CYP11B1</i> & <i>GML</i> ⁺⁵⁷³	unendlich	12	<0.0001 ***
<i>GML</i> ⁺⁴⁰⁵ & <i>GML</i> ⁺⁵⁷³	3.153	12	0.994 <i>n.s.</i>
<i>KIEL_E8</i> & <i>ILSTS039</i>	unendlich	32	<0.0001 ***
<i>DGATI</i> & <i>ILSTS039</i>	unendlich	24	<0.0001 ***
<i>CYP11B1</i> & <i>ILSTS039</i>	unendlich	32	<0.0001 ***
<i>GML</i> ⁺⁴⁰⁵ & <i>ILSTS039</i>	unendlich	30	<0.0001 ***
<i>GML</i> ⁺⁵⁷³ & <i>ILSTS039</i>	unendlich	12	<0.0001 ***
<i>KIEL_E8</i> & <i>CSSM066</i>	unendlich	34	<0.0001 ***
<i>DGATI</i> & <i>CSSM066</i>	unendlich	24	<0.0001 ***
<i>CYP11B1</i> & <i>CSSM066</i>	unendlich	34	<0.0001 ***
<i>GML</i> ⁺⁴⁰⁵ & <i>CSSM066</i>	unendlich	32	0.001 **
<i>GML</i> ⁺⁵⁷³ & <i>CSSM066</i>	unendlich	12	0.049 *
<i>ILSTS039</i> & <i>CSSM066</i>	unendlich	32	<0.0001 ***

*P = 0.05, **P = 0.001, ***P = 0.0001, FG = Freiheitsgrade, *n.s.* = nicht signifikant

Zur Charakterisierung des Kopplungsungleichgewichtes in der QTL-Region unter besonderer Berücksichtigung des Mikrosatellitenmarkers *ILSTS039*, wurde zwischen jedem einzelnen der 8 Allele (217 - 231) des Mikrosatelliten und jedem Allel *KIEL_E8*⁽¹⁺²⁾, *DGATI*^(A+K), *CYP11B1*^(A+V), *GML*⁺⁴⁰⁵⁽¹⁺²⁾ und *GML*⁺⁵⁷³⁽¹⁺²⁾ der Grad der

Tabelle 4.13: a: Diskrete Klassen (Anzahl Genotypen pro Allel) der acht *ILSTS039* Allele in der ADR Holstein Population.
 b: χ^2 -Test auf Signifikanz der Kopplung zwischen jedem Allel des Mikrosatelliten-Markers *ILSTS039* und 5 weiteren Markern in der QTL-Region. χ^2 -Werte bei 8 Freiheitsgraden. Signifikanzkennzeichen Kopplungsungleichgewichte.
 (0 - Hypothese = "keine Kopplung"; geringes χ^2 = Annahme der 0 - Hypothese)



Marker	<i>ILSTS039</i> 217	<i>ILSTS039</i> 219	<i>ILSTS039</i> 221	<i>ILSTS039</i> 223	<i>ILSTS039</i> 225	<i>ILSTS039</i> 227	<i>ILSTS039</i> 229	<i>ILSTS039</i> 231
<i>KIEL_E8</i>	3,30 n.s.	642,82 ***	47,58 ***	0,24 n.s.	125,9 ***	207,21 ***	0,66 n.s.	18,6 ***
	3,30 n.s.	642,82 ***	47,58 ***	0,24 n.s.	125,9 ***	207,21 ***	0,66 n.s.	18,6 ***
<i>DGATI</i>	3,80 n.s.	530,39 ***	55,47 ***	0,37 n.s.	136,24 ***	113,32 ***	0,88 n.s.	13,55 ***
	3,80 n.s.	530,39 ***	55,47 ***	0,37 n.s.	136,24 ***	113,32 ***	0,88 n.s.	13,55 ***
<i>CYP11B1</i>	2,41 n.s.	319,26 ***	76,82 ***	0,04 n.s.	807,61 ***	73,65 ***	81,2 ***	49,37 ***
	2,41 n.s.	319,26 ***	76,82 ***	0,04 n.s.	807,61 ***	73,65 ***	81,2 ***	49,37 ***
<i>GML⁺⁴⁰⁵</i>	1,05 n.s.	169,30 ***	12,54 ***	0,64 n.s.	62,19 ***	887,85 ***	3,66 n.s.	0,73 n.s.
	1,05 n.s.	169,30 ***	12,54 ***	0,64 n.s.	62,19 ***	887,85 ***	3,66 n.s.	0,73 n.s.
<i>GML⁺⁵⁷³</i>	0,19 n.s.	22,44 ***	0,83 n.s.	0,12 n.s.	2,12 n.s.	4,06 *	0,97 n.s.	1126,89 ***
	0,19 n.s.	22,44 ***	0,83 n.s.	0,12 n.s.	2,12 n.s.	4,06 *	0,97 n.s.	1126,89 ***

¹ *ILSTS039* Allelfrequenzen, * $P = <0,05$, ** $P = <0,001$, *** $P = <0,0001$, n.s. = nicht signifikant

Assoziation berechnet, wie in [Tabelle 4.13](#) gezeigt. Dabei ergab sich, dass nicht alle Allele des *ILSTS039* mit den Markern der Region gekoppelt sind.

Zwei Allele (*ILSTS039*²¹⁷⁺²²³) standen mit keinem anderen Markerallel in einer signifikanten Kopplung, ein Allel (*ILSTS039*²¹⁹) stand mit allen anderen Markerallelen in hoch signifikanter Kopplung. Vier Allele (*ILSTS039*^{221, 225, 227, 229}) standen mit den *GML*⁺⁵⁷³ Allelen in keinem signifikanten Kopplungsverhältnis, ebenso zwei Allele (*ILSTS039*^{229, 231}) mit keinem *GML*⁺⁴⁰⁵ Allel.

Die Verteilung der Anzahl typisierter Genotypen pro Allel geht proportional konform mit Allelfrequenzen des Markers *ILSTS039*. [Tabelle 4.13](#) zeigt die Anzahl Genotypen pro Allel, die im Signifikanztest (χ^2) auf Marker - Marker Kopplung berücksichtigt wurden. Nicht signifikante Kopplungsverhältnisse gehen hierbei auf jeweils drei Genotypen zurück.

4.2.3 Regressionsanalyse des Einflusses genetischer Variation der *CYP11B1*- und *DGATI*-Gene auf Leistungs- und Nutzungsmerkmale in Deutschen Holstein Rindern

Mit der *GML*-Procedure der Statistik-Software-Suite SAS wurden drei Regressionsmodelle (*CYP11B1*, *DGATI*, *CYP11B1* & *DGATI*) gerechnet.

• Deskriptive Statistik deregressierter Zuchtwerte (DRZW)

Anzahl Söhne (n), Mittelwerte, Standardabweichungen (SD), Minima und Maxima der deregressierten Zuchtwerte (DRZW), Heritabilitäten (h^2) und durchschnittliche Sicherheiten (d. S.) für Milchproduktions-, Fruchtbarkeits-, und Exterieurmerkmale, der in dieser Auswertung berücksichtigten 1291 Holstein Söhne werden in [Tabelle 4.14](#) vorgestellt. Durchschnittliche DRZW für Mengenmerkmale und somatische Zellzahl waren positiv, wogegen Prozentmerkmale negative Werte zeigten. Heritabilitäten wurden der Zuchtwerteöffentlichung (VIT, Verden) entnommen, die online (URL 43) konsultiert werden kann. Sicherheiten lagen, im Durchschnitt aller Merkmale, über 84 %.

• Allel- und Genotypfrequenzen

Allelfrequenzen und Genotypfrequenzen des gesamten ADR-Familienmaterials für *DGATI* und *CYP11B1* des ADR-Familienmaterials wurden in den Kapiteln 4.1.3.1 und 4.1.3.2 beschrieben. Wie in [Tabelle 4.15](#) gezeigt, waren von 18 Holstein Vätern 9 heterozygot für *CYP11B1*^{V+A} und 9 Väter heterozygot für *DGATI*^{K+A} Allele. Nur 5 Väter waren heterozygot für beide Polymorphismen. Neun Holstein Väter waren homozygot für *CYP11B1*^V; keiner war homozygot für *CYP11B1*^A; acht waren homozygot für *DGATI*^A

Tabelle 4.14: Anzahl Söhne (n), Mittelwerte, Standardabweichungen (SD), Minima und Maxima der deregressierten Zuchtwerte (DRZW), Heritabilitäten (h^2) und durchschnittliche Sicherheiten (d. S.) für Milchproduktions-, Fruchtbarkeits-, und Exterieurmerkmale.

DRZW	n	Mittelwert	SD	Minimum	Maximum	h^2	d. S.
Milchmenge (kg)	1290	+273	553	-3237	+1998	0,35	96,0
Fettmenge (kg)	1290	+5,92	20,62	-79,23	+73,65	0,36	96,0
Proteinmenge (kg)	1290	+6,87	15,62	-85,46	+59,39	0,38	96,0
Fettgehalt (%)	1291	-0,06	0,30	-0,98	+1,37	0,35	96,0
Proteingehalt (%)	1291	-0,03	0,12	-0,59	+0,35	0,35	96,0
Somatische Zellzahl	1288	+0,04	0,51	-0,41	+2,60	0,16	92,5
Kalbeverlauf (paternal)	1267	0,00	0,05	-0,40	+0,22	0,05	85,6
Kalbeverlauf (maternal)	1287	-0,01	0,06	-0,30	+0,21	0,05	72,7
Totgeburten (paternal)	1267	-1,00	2,40	-15,15	+8,00	0,05	n.v.
Totgeburten (maternal)	1267	+0,78	2,94	-11,50	+10,53	0,05	n.v.
NRR 90 (paternal)	1193	-1,18	6,01	-39,85	+22,54	0,02	66,1
NRR 90 (maternal)	1283	-1,15	6,00	-20,59	+18,91	0,02	62,1
Nutzungsdauer	1286	+39,85	192,92	-162,20	+773,49	0,16	84,4
Milchcharakter	1279	+95,12	16,42	-21,42	+198,36	0,24	83,9
Größe	1283	+93,71	14,33	+41,55	+152,83	0,41	89,4
Körpertiefe	1283	+97,74	16,01	+38,00	+150,20	0,24	84,0
Stärke	1279	+97,42	18,74	-38,24	+238,79	0,18	81,1
Beckenneigung	1283	+97,71	16,31	+34,65	+153,34	0,26	85,1
Beckenbreite	1283	+97,64	15,28	+30,68	+144,81	0,28	85,6
Hinterbeinwinkelung	1283	+99,90	20,21	-86,64	+223,46	0,15	79,7
Klauen	1282	+96,16	21,90	-40,46	+192,13	0,12	77,1
Hinterreuter	1283	+95,56	17,07	+32,43	+170,28	0,22	83,2
Zentralband	1283	+100,21	22,73	-160,57	+176,09	0,13	78,2
Strichplazierung	1285	+94,92	17,72	0,00	+150,31	0,22	83,4
Vordereuteraufhängung	1282	+96,71	17,10	+8,00	+150,76	0,21	82,8
Eutertiefe	1285	+101,04	15,70	0,00	+147,18	0,26	85,1
Strichlänge	1283	+100,46	16,17	+50,58	+166,37	0,25	84,7

n.v. = nicht verfügbar

und ein Vater war homozygot für *DGATI*^K. Von 1291 Deutsche Holstein Söhnen, waren 48 % homozygot für *CYP11B1*^V, 44 % heterozygot für *CYP11B1*^{A+V} und 8 % homozygot für *CYP11B1*^A. 16 % waren homozygot für *DGATI*^K, 51 % waren heterozygot für *DGATI*^{A+K} und 33 % homozygot für *DGATI*^A.

Tabelle 4.15: Anzahl der Söhne pro Grandsire und die Verteilung der Valin-Alanin Substitution (V30A) Genotypen im 11 β -hydroxylase [EC1.14.15.4] kodierenden *CYP11B1* Gen, sowie der Lysin-Alanin Substitution (K232A) Genotypen in dem für diacylglycerol O-acyltransferase [EC2.3.1.20] kodierenden *DGATI* Gen innerhalb jeder Grandsire (Großvater) Familie des Deutschen Holstein Granddaughter-Design.

Familie ^c	n	Genotypen <i>DGATI</i> ^a			Genotypen <i>CYP11B1</i> ^b		
		KK	KA	AA	VV	VA	AA
01	32	8	13	11	23	9	0
02	42	0	19	23	16	21	5
03	22	0	10	12	8	11	3
04	51	0	36	15	39	12	0
05	18	0	10	8	13	5	0
06	128	38	60	30	53	61	14
07	275	78	137	60	115	133	27
08	28	0	17	11	17	11	0
09	23	4	10	9	17	6	0
10	31	9	12	10	22	9	0
11	56	0	27	29	29	26	1
12	29	11	13	5	14	12	3
13	19	11	8	0	15	4	0
14	25	0	14	11	19	6	0
15	42	10	20	12	31	11	0
16	352	0	188	164	123	181	48
17	60	19	29	12	32	26	2
18	58	17	30	11	30	27	1

^a *DGATI* Allelvariante (K = Lysin; A = Alanin)

^b *CYP11B1* Allelvariante (V = Valin; A = Alanin)

^c Genotypfrequenzen Söhne heterozygoter (KA/VA) Väter im Fettdruck dargestellt

• Sicherheiten der Zuchtwerte

Holstein Bullen, die in die vorliegenden statistischen Auswertungen eingingen wurden zwischen 1986 und 1993 geboren. Die Sicherheiten ihrer Zuchtwerte betragen für fünf Milchproduktionsmerkmale durchschnittlich 96,0 % (54,0-99,0 %), für somatische Zellzahl durchschnittlich 92,5 % (54,0-99,0 %), für paternalen Kalbeverlauf durchschnittlich 85,6 % (54,0-99,0 %), für maternalen Kalbeverlauf durchschnittlich 72,7 % (30,0-99,0 %), für paternale Non-return-Rate durchschnittlich 66,1 % (50,0-83,0 %), für maternale Non-return-Rate durchschnittlich 62,1 % (33,0-99,0 %) und für Nutzungsdauer durchschnittlich 84,4 % (38,0-99,0 %).

Tabelle 4.16: Regressionskoeffizienten der Anzahl Lysin Allele ($DGATI^K$) und Valin Allele ($CYP11BI^V$), die die Hälfte des Allelsubstitutionseffektes (α) darstellen, sowie Standardfehler (SE) und Bestimmtheitsmaß (R^2) für Milchproduktions- und Fruchtbarkeitsmerkmale in Deutschen Holstein Rindern; in Einzel- und Gemeinschaftsanalyse geschätzt.

DRZW	Einzelgenanalyse				Gemeinschaftsanalyse			
	$CYP11BI^V$		$DGATI^K$		$CYP11BI^V$		$DGATI^K$	
	$\alpha/2 \pm SE$	R^2	$\alpha/2 \pm SE$	R^2	$\alpha/2 \pm SE$	R^2	$\alpha/2 \pm SE$	R^2
<i>Milchproduktionsmerkmale</i>								
Milchmenge (kg)	-182 ± 23***	0.14	-288 ± 22***	0.20	-82 ± 24***	0.21	-258 ± 24***	0.21
Fettmenge (kg)	3.66 ± 0.88***	0.15	10.64 ± 0.81***	0.24	-0.51 ± 0.90	0.24	10.83 ± 0.87***	0.24
Proteinmenge (kg)	-3.36 ± 0.66***	0.15	-4.48 ± 0.64***	0.16	-1.89 ± 0.71**	0.17	-3.79 ± 0.69***	0.17
Fettgehalt (%)	0.15 ± 0.01***	0.20	0.29 ± 0.01***	0.50	0.04 ± 0.01***	0.50	0.28 ± 0.01***	0.50
Proteingehalt (%)	0.04 ± 0.01***	0.15	0.07 ± 0.01***	0.24	0.01 ± 0.01*	0.24	0.06 ± 0.01***	0.24
Somatische Zellzahl	0.05 ± 0.02*	0.19	0.03 ± 0.02	0.19	0.04 ± 0.02	0.19	0.01 ± 0.02	0.19
<i>Fruchtbarkeitsmerkmale</i>								
Kalbverlauf (paternal)	5.10E-3 ± 2.30E-3*	0.08	-1.23E-3 ± 2.20E-3	0.08	6.49E-3 ± 2.43E-3**	0.08	-3.60E-3 ± 2.36E-3	0.08
Kalbverlauf (maternal)	3.89E-3 ± 2.69E-3	0.04	0.62E-3 ± 2.60E-3	0.04	-4.79E-3 ± 2.90E-3	0.04	2.35E-3 ± 2.81E-3	0.04
Totgeburten (paternal)	-0.09 ± 0.11	0.05	-0.11 ± 0.11	0.05	-0.06 ± 0.12	0.05	-0.09 ± 0.11	0.05
Totgeburten (maternal)	0.09 ± 0.13	0.10	0.08 ± 0.13	0.10	0.07 ± 0.14	0.10	0.06 ± 0.14	0.10
NRR 90 (paternal)	-0.23 ± 0.29	0.03	-0.30 ± 0.28	0.03	-0.13 ± 0.31	0.03	-0.25 ± 0.30	0.03
NRR 90 (maternal)	-0.05 ± 0.26	0.09	-0.53 ± 0.26*	0.09	0.18 ± 0.29	0.09	-0.59 ± 0.28*	0.09
<i>Funktionale Merkmale</i>								
Nutzungsdauer	$\alpha/2 \pm SE$	R^2	$\alpha/2 \pm SE$	R^2	$\alpha/2 \pm SE$	R^2	$\alpha/2 \pm SE$	R^2
	-3.85 ± 8.55	0.10	-2.63 ± 8.30	0.10	-3.30 ± 9.22	0.10	-1.43 ± 8.95	0.10

¹ α wie in Falconer & Mackay (1996), NRR 90 = Non-return Rate 90, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

- Effekte von *CYP11B1^V* und *DGATI^K*

In allen angewendeten Regressionsmodellen, um Effekte für *CYP11B1^V* und *DGATI^K* Allele zu schätzen, war der fixe Effekt für Sire (Vater) signifikant. [Tabelle 4.16](#) zeigt geschätzte Effekte ($\alpha/2$), wie in Falconer & Mackay, 1996, von *CYP11B1^V* und *DGATI^K* mit ihren jeweiligen Standardfehlern (SE) für Milchproduktions- und Fruchtbarkeitsmerkmale, sowie dem Bestimmtheitsmaß (R^2).

Die Effekte von *CYP11B1^V* und *DGATI^K* für Milchproduktionsmerkmale waren alle hoch signifikant ($P < 0,01$). *CYP11B1^V* war signifikant ($P < 0,05$) für somatische Zellzahl, wenn Regressionskoeffizienten für jedes Allel separat errechnet wurden. Jedoch in einer gemeinsamen Analyse, mit beiden Allelen als abhängige Variablen in einem statistischen Modell, änderten sich Werte für *CYP11B1^V*, doch *DGATI^K* blieb hoch signifikant ($P < 0,01$) für alle fünf Produktionsmerkmale. *CYP11B1^V* Effekte für Milchmenge ($P < 0,01$), Fettgehalt ($P < 0,01$) und Proteinmenge ($P < 0,01$) waren weiterhin hoch signifikant und Effekte für Proteingehalt ($P < 0,05$) signifikant. Der Effekt für Fettmenge verlor Signifikanz.

Die Analyse für Fruchtbarkeitsmerkmale zeigte signifikante Effekte für *CYP11B1^V* bei paternalem Kalbeverlauf ($P < 0,05$) und für *DGATI^K* bei maternaler Non-Return-Rate 90 ($P < 0,05$) im Einzelmodell. Im gemeinsamen Modell blieb *DGATI^K* signifikant ($P < 0,05$) für maternale Non-Return-Rate 90, jedoch *CYP11B1^V* war hoch signifikant ($P < 0,01$) für paternalen Kalbeverlauf.

Bei der Anwendung der Einzelmodelle auf Exterieurmerkmale ([Tabelle 4.17](#)) zeigten sich keine signifikanten *CYP11B1^V* Effekte. Das *DGATI^K* Allel hatte hoch signifikante Effekte für Stärke ($P < 0,01$) und signifikante Effekte für Beckenbreite ($P < 0,05$). Die Wiederholung der Schätzung im gemeinsamen Modell erbrachte fast identische $\alpha/2$ Werte für *DGATI^K*. *CYP11B1^V* Effekte blieben jedoch auch hier ohne Signifikanz.

- Korrelationen zwischen deregressierten Zuchtwerten

Korrelationen der DRZW wurden zwischen Milchproduktionsmerkmalen, sowie somatischer Zellzahl und Zuchtleistungsmerkmalen, sowie Nutzungsdauer geschätzt ([Tabelle 4.18](#)). Paternaler Kalbeverlauf war negativ korreliert mit Milchmenge ($P < 0,05$), Fettmenge ($P < 0,01$), Proteinmenge ($P < 0,05$) und SCS ($P < 0,01$). Maternaler Kalbeverlauf war positiv korreliert mit Proteinmenge ($P < 0,01$) und negativ mit

Tabelle 4.17: Regressionskoeffizienten der Anzahl Lysin Allele ($DGATI^K$) und Valin Allele ($CYPIBI^V$), die die Hälfte des Allelsubstitutionseffektes (α) darstellen, sowie Standardfehler (SE) und Bestimmtheitsmaß (R^2) für Exterieur-Merkmale in Deutschen Holstein Rindern; in Einzel- und Gemeinschaftsanalyse geschätzt.

DRZW	Einzelgenanalyse			Gemeinschaftsanalyse		
	$CYPIBI^V$	$DGATI^K$	R^2	$CYPIBI^V$	$DGATI^K$	R^2
	$\alpha/2 \pm SE$	$\alpha/2 \pm SE$		$\alpha/2 \pm SE$	$\alpha/2 \pm SE$	
Exterieurmerkmale	-0.04 ± 0.68	0.86 ± 0.66	0.10	-0.43 ± 0.74	1.02 ± 0.72	0.10
Milchcharakter						
<i>Körper</i>						
Größe	-0.23 ± 0.64	-0.54 ± 0.62	0.07	-0.02 ± 0.69	-0.53 ± 0.67	0.08
Körpertiefe	-0.34 ± 0.66	-0.75 ± 0.64	0.18	-0.06 ± 0.71	-0.73 ± 0.69	0.18
Stärke	-0.41 ± 0.76	-2.07 ± 0.74**	0.08	0.45 ± 0.81	-2.23 ± 0.79**	0.08
Beckenneigung	-0.95 ± 0.68	-0.98 ± 0.66	0.16	-0.67 ± 0.74	-0.74 ± 0.72	0.16
Beckenbreite	0.27 ± 0.65	-1.34 ± 0.63*	0.12	0.91 ± 0.70	-1.67 ± 0.68*	0.13
<i>Fundament</i>						
Hinterbeinwinkelung	0.86 ± 0.84	0.07 ± 0.81	0.05	0.96 ± 0.90	-0.27 ± 0.88	0.05
Klauen	-0.91 ± 0.89	1.06 ± 0.87	0.10	-1.52 ± 0.96	1.61 ± 0.93	0.11
<i>Euter</i>						
Hintereuter	0.69 ± 0.74	0.22 ± 0.72	0.08	0.71 ± 0.80	-0.04 ± 0.77	0.08
Zentralband	0.60 ± 0.88	0.47 ± 0.86	0.16	0.48 ± 0.95	0.30 ± 0.92	0.16
Strichplazierung	-0.29 ± 0.72	0.71 ± 0.70	0.16	-0.65 ± 0.78	0.95 ± 0.76	0.16
Vordereuteraufhängung	0.33 ± 0.74	0.58 ± 0.72	0.09	0.13 ± 0.80	0.53 ± 0.77	0.09
Eutertiefe	0.53 ± 0.68	0.72 ± 0.66	0.05	0.30 ± 0.73	0.61 ± 0.71	0.05
Strichlänge	0.59 ± 0.70	-0.33 ± 0.68	0.12	0.84 ± 0.75	-0.63 ± 0.73	0.12

¹ α wie in Falconer & Mackay (1996), NRR 90 = Non-return Rate 90, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

SCS ($P < 0,01$). Maternale Non-Return-Rate 90 war negativ korreliert mit Milchmenge ($P < 0,05$), Fettmenge ($P < 0,01$), Proteinmenge ($P < 0,01$) und Fettgehalt ($P < 0,05$). Nutzungsdauer war negativ korreliert mit Fettmenge ($P < 0,01$), Fettgehalt ($P < 0,01$) und SCS ($P < 0,01$). Obwohl diese Korrelationen aufgrund großer Tierzahlen nominal signifikant oder auch hoch signifikant geschätzt wurden, waren sie real jedoch nur gering.

Tabelle 4.18: Phänotypische Korrelationen zwischen deregressierten Zuchtwerten (DRZW) von fünf Milchproduktionsmerkmalen, somatischer Zellzahl und Fruchtbarkeitsmerkmalen mit Nutzungsdauer bei Deutschen Holstein Rindern

Merkmale DRZW	Milch kg	Fett kg	Protein kg	Fett %	Protein %	Somatische Zellzahl
Kalbeverlauf paternal	-0.07*	-0.10***	-0.06*	-0.02	0.05	-0.09**
Kalbeverlauf maternal	0.05	0.02	0.08**	-0.02	0.04	-0.08**
Totgeburt paternal	0.03	0.03	0.03	-0.01	-0.01	-0.02
Totgeburt maternal	-0.03	-0.03	-0.03	0.00	0.01	-0.03
Non return rate 90 paternal	0.05	0.02	0.05	-0.04	-0.02	-0.01
Non return rate 90 maternal	-0.06*	-0.12***	-0.09***	-0.06*	-0.04	0.02
Nutzungsdauer	-0.03	-0.12***	-0.03	-0.08**	0.01	-0.52***

DRZW = deregressierter Zuchtwert, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Table 4.19: STEPWISE-Procedure (SAS) Ergebnis der Varianzanalyse (ANOVA) zwischen Markerallelen *DGATI*^K, *CYP11BI*^V, *GML*⁺⁴⁰⁵, *GML*⁺⁵⁷³ und fünf Milchleistungsmerkmalen und Somatischer Zellzahl in deutschen Holstein Rindern.

Allel	Step1			Step2			Step3			Step4		
	PE	SE	part. R ²	PE	SE	part. R ²	PE	SE	part. R ²	PE	SE	part. R ²
Milch kg												
<i>DGATI</i> ^K	-240 ±	20.42***	0.10	-214 ±	21.77***	0.10	-211 ±	21.82***	0.10			
<i>CYP11BI</i> ^V				-80 ±	23.41***	0.01	-74 ±	23.69**	0.01			
<i>GML</i> ⁺⁵⁷³							-113 ±	77.88	0.01			
Fett kg												
<i>DGATI</i> ^K	8.82 ±	0.75***	0.10	9.14 ±	0.75***	0.10						
<i>GML</i> ⁺⁵⁷³				-8.91 ±	2.81**	0.01						
Protein kg												
<i>DGATI</i> ^K	-3.76 ±	0.59***	0.03	-3.16 ±	0.63***	0.03	-3.07 ±	0.63***	0.03			
<i>CYP11BI</i> ^V				-1.82 ±	0.67**	0.01	-1.62 ±	0.68*	0.01			
<i>GML</i> ⁺⁵⁷³							-4.22 ±	2.24	0.01			
Fett %												
<i>DGATI</i> ^K	0.24 ±	0.01***	0.35	0.23 ±	0.01***	0.35	0.23 ±	0.01***	0.35	0.23 ±	0.01***	0.35
<i>CYP11BI</i> ^V				0.04 ±	0.01***	0.01	0.04 ±	0.01***	0.01	0.05 ±	0.01***	0.01
<i>GML</i> ⁺⁴⁰⁵							0.05 ±	0.02*	0.01	0.05 ±	0.02*	0.01
<i>GML</i> ⁺⁵⁷³										-0.06 ±	0.03	0.01
Protein %												
<i>DGATI</i> ^K	0.056 ±	0.01***	0.11	0.052 ±	0.01***	0.11	0.050 ±	0.01***	0.11			
<i>CYP11BI</i> ^V				0.011 ±	0.01*	0.01	0.013 ±	0.01**	0.01			
<i>GML</i> ⁺⁴⁰⁵							0.029 ±	0.01*	0.01			
SCS												
<i>CYP11BI</i> ^V	0.042 ±	0.02*	0.01									

SCS = somatische Zellzahl, SE = Standardfehler, PE = Parameter Schätzmaß, part. R² = partiales Bestimmtheitsmaß

4.2.4 Varianzanalyse und Multiple Regressionsanalyse des Einflusses genetischer Variation der Marker (Typ I+II) *KIEL_E8, DGATI, CYP11B1, GML⁺⁴⁰⁵, GML⁺⁵⁷³, ILSTS039, CSSM066* auf Milchleistungsmerkmale in Deutschen Holstein Rindern

Mit der STEPWISE-Procedure und der GLM-Procedure der Statistik-Software-Suite SAS (SAS Institute, Cary, NC, USA) wurden drei Varianzanalysen (ANOVA) mit unterschiedlichen Markerallelen, sowie in einer multiplen Regressionsanalyse die Allelsubstitutionskoeffizienten ($\alpha/2$) berechnet. Die Varianzanalysen sind in einem Überblick in [Tabelle 4.20](#) zusammengefasst. [Tabellen 4.19, 4.21 und 4.22](#) zeigen Ergebnisse schrittweise und in unterschiedlicher Schrittzahl. Im Überblick erkennt man die Persistenz einiger Markerallele (Pos. 02, 08, 14) für einzelne Merkmale, bzw. ihren Austausch durch die Hereinnahme weiterer Marker in das Modell (Pos. 05, 11, 17).

Tabelle 4.20: Überblick der Markerkombinationen zur Auswahl der größtmöglichen Erklärlichkeit (R^2) durch SAS STEPWISE-Procedure Modul.

1. Varianzanalyse	Markerkombination: <i>DGATI, CYP11B1, GML⁺⁴⁰⁵, GML⁺⁵⁷³</i>
Pos. Nr. Merkmal	Markerselektion
Pos. 01 Milch kg	: <i>DGATI, CYP11B1, GML⁺⁵⁷³</i>
Pos. 02 Fett kg	: <i>DGATI, GML⁺⁵⁷³</i>
Pos. 03 Protein kg	: <i>DGATI, CYP11B1, GML⁺⁵⁷³</i>
Pos. 04 Fett %	: <i>DGATI, CYP11B1, GML⁺⁴⁰⁵, GML⁺⁵⁷³</i>
Pos. 05 Protein %	: <i>DGATI, CYP11B1, GML⁺⁴⁰⁵</i>
Pos. 06 SCS	: <i>CYP11B1</i>
2. Varianzanalyse	Markerkombination: <i>DGATI, CYP11B1, GML⁺⁴⁰⁵, GML⁺⁵⁷³, KIEL_E8</i>
Pos. Nr. Merkmal	Markerselektion
Pos. 07 Milch kg	: <i>DGATI, CYP11B1, KIEL_E8</i>
Pos. 08 Fett kg	: <i>DGATI, GML⁺⁵⁷³</i>
Pos. 09 Protein kg	: <i>DGATI, CYP11B1, GML⁺⁵⁷³</i>
Pos. 10 Fett %	: <i>DGATI, CYP11B1, KIEL_E8, GML⁺⁴⁰⁵, GML⁺⁵⁷³</i>
Pos. 11 Protein %	: <i>DGATI, CYP11B1, GML⁺⁴⁰⁵</i>
Pos. 12 SCS	: <i>CYP11B1</i>
3. Varianzanalyse	Markerkombination: <i>DGATI, CYP11B1, GML⁺⁴⁰⁵, GML⁺⁵⁷³, KIEL_E8, ILSTS039, CSSM066</i>
Pos. Nr. Merkmal	Markerselektion
Pos. 13 Milch kg	: <i>DGATI, ILSTS039²¹⁹</i>
Pos. 14 Fett kg	: <i>DGATI, CSSM066¹⁹⁴, GML⁺⁵⁷³</i>
Pos. 15 Protein kg	: <i>DGATI, ILSTS039²¹⁹, GML⁺⁴⁰⁵</i>
Pos. 16 Fett %	: <i>DGATI, ILSTS039²²⁵, ILSTS039²¹⁹, CSSM066¹⁹⁴</i>
Pos. 17 Protein %	: <i>DGATI, ILSTS039²¹⁹, CSSM066¹⁹⁴, CSSM066¹⁸⁶, ILSTS039²²⁵</i>
Pos. 18 SCS	: <i>ILSTS039²¹⁹, GML⁺⁵⁷³</i>

Tabelle 4.21: STEPWISE-Procedure (SAS) Ergebnis der Varianzanalyse (ANOVA) zwischen Markerallelen *DGAT1^K*, *CYP11B^V*, *GML⁺⁴⁰⁵*, *GML⁺⁵⁷³*, *KIEL_E8^I* sowie fünf Milchleistungsmerkmalen und Somatischer Zellzahl in deutschen Holstein Rindern. Der partielle R²-Wert kennzeichnet den Anteil der Erklärlichkeit an der Gesamtvarianz.

Allel	Step1			Step2			Step3			Step4			Step5			
	PE	SE	part. R ²	PE	SE	part. R ²	PE	SE	part. R ²	PE	SE	part. R ²	PE	SE	part. R ²	
Milch kg																
<i>DGAT1^K</i>	-240 ±	20.42***	0.100	-213 ±	21.77***	0.100	-143 ±	48.20**	0.100							
<i>CYP11B^V</i>				-80 ±	23.41***	0.008	-75 ±	23.54**	0.008							
<i>KIEL_E8^I</i>							-79 ±	48.84	0.002							
Fett kg																
<i>DGAT1^K</i>	8.82 ±	0.75***	0.098	9.14 ±	0.75***	0.098										
<i>GML⁺⁵⁷³</i>				-8.90 ±	2.81**	0.007										
Protein kg																
<i>DGAT1^K</i>	-3.76 ±	0.59***	0.031	-3.16 ±	0.63***	0.031	-3.07 ±	0.63***	0.031							
<i>CYP11B^V</i>				-1.82 ±	0.67**	0.005	-1.62 ±	0.68*	0.005							
<i>GML⁺⁵⁷³</i>							-4.22 ±	2.24	0.003							
Fett %																
<i>DGAT1^K</i>	0.24 ±	0.01***	0.355	0.23 ±	0.01***	0.355	0.18 ±	0.02***	0.355	0.19 ±	0.02***	0.355	0.19 ±	0.02***	0.355	
<i>CYP11B^V</i>				0.04 ±	0.01***	0.007	0.04 ±	0.01***	0.007	0.04 ±	0.01***	0.007	0.04 ±	0.01***	0.007	
<i>KIEL_E8^I</i>							0.05 ±	0.02*	0.003	0.05 ±	0.02*	0.003	0.05 ±	0.02*	0.003	
<i>GML⁺⁴⁰⁵</i>										0.05 ±	0.02*	0.002	0.05 ±	0.02*	0.002	
<i>GML⁺⁵⁷³</i>										-0.06 ±	0.03	0.002	-0.06 ±	0.03	0.002	
Protein %																
<i>DGAT1^K</i>	0.06 ±	0.00***	0.111	0.05 ±	0.00***	0.111	0.05 ±	0.00***	0.111							
<i>CYP11B^V</i>				0.01 ±	0.00*	0.004	0.01 ±	0.01**	0.004							
<i>GML⁺⁴⁰⁵</i>							0.03 ±	0.01*	0.004							
SCS																
<i>CYP11B^V</i>	0.041 ±	0.02*	0.01													

PE = Parameter Schätzmaß, SE = Standardfehler, part. R² = partiales Bestimmtheitsmaß, SCS = somatische Zellzahl
 *P = 0.05 **P = 0.01 ***P = 0.001

Tabelle 4.22: STEPWISE-Procedure (SAS) Varianzanalyse (ANOVA) mit den Markerallelen *DGATI^K*, *GML⁺⁴⁰⁵*, *GML⁺⁵⁷³*, *ILSTS039²¹⁹*, *ILSTS039²²⁵*, *CSSM066¹⁹⁴*, *CSSM066¹⁸⁶* sowie fünf Milchleistungsmerkmalen und Somatischer Zellzahl in deutschen Holstein Rindern. Der partielle R²-Wert kennzeichnet den Anteil der Erklärlichkeit an der Gesamtvarianz.

Allel	Step1			Step2			Step3			Step4			Step5			
	PE	SE	part. R ²	PE	SE	part. R ²	PE	SE	part. R ²	PE	SE	part. R ²	PE	SE	part. R ²	
Milch kg																
<i>DGATI^K</i>	-240 ± 25.35***		0.11	-174 ± 32.19***		0.11										
<i>ILSTS039²¹⁹</i>				-104 ± 31.52***		0.01										
Fett kg																
<i>DGATI^K</i>	9.21 ± 0.93***		0.11	9.49 ± 0.93***		0.11	9.73 ± 0.94***		0.11							
<i>CSSM066¹⁹⁴</i>				2.85 ± 1.25*		0.01	2.87 ± 1.25*		0.01							
<i>GML⁺⁵⁷³</i>							-9.79 ± 4.66*		0.01							
Protein kg																
<i>DGATI^K</i>	-3.71 ± 0.73***		0.03	-2.30 ± 0.93*		0.03	-2.30 ± 0.93*		0.03							
<i>ILSTS039²¹⁹</i>				-2.23 ± 0.91*		0.01	-2.49 ± 0.93**		0.01							
<i>GML⁺⁴⁰⁵</i>							2.89 ± 1.83		0.01							
Fett %																
<i>DGATI^K</i>	0.251 ± 0.01***		0.38	0.219 ± 0.01***		0.38	0.204 ± 0.01***		0.38	0.205 ± 0.01***		0.38	0.205 ± 0.01***		0.38	
<i>ILSTS039²²⁵</i>				-0.072 ± 0.02***		0.02	-0.048 ± 0.02**		0.02	-0.043 ± 0.02*		0.02	-0.043 ± 0.02*		0.02	
<i>ILSTS039²¹⁹</i>							0.041 ± 0.02*		0.01	0.048 ± 0.02**		0.01	0.048 ± 0.02**		0.01	
<i>CSSM066¹⁹⁴</i>										0.034 ± 0.02*		0.01	0.034 ± 0.02*		0.01	
Protein %																
<i>DGATI^K</i>	0.057 ± 0.01***		0.12	0.046 ± 0.01***		0.12	0.046 ± 0.01***		0.12	0.047 ± 0.01***		0.12	0.046 ± 0.01***		0.12	
<i>ILSTS039²¹⁹</i>				0.017 ± 0.01*		0.01	0.019 ± 0.01*		0.01	0.026 ± 0.01**		0.01	0.018 ± 0.01*		0.01	
<i>CSSM066¹⁹⁴</i>							0.014 ± 0.01		0.01	0.021 ± 0.01*		0.01	0.022 ± 0.01**		0.01	
<i>CSSM066¹⁸⁶</i>										0.016 ± 0.01		0.01	0.023 ± 0.01**		0.01	
<i>ILSTS039²²⁵</i>													-0.019 ± 0.01		0.01	
SCS																
<i>ILSTS039²¹⁹</i>	0.055 ± 0.02*		0.01	0.062 ± 0.02**		0.01	0.062 ± 0.02**		0.01	0.062 ± 0.02**		0.01	0.062 ± 0.02**		0.01	
<i>GML⁺⁵⁷³</i>				-0.176 ± 0.12*		0.01	-0.176 ± 0.12*		0.01							

PE = Parameter Schätzmaß, SE = Standardfehler, part. R² = partiales Bestimmtheitsmaß, SCS = somatische Zellzahl
 *P = 0.05 **P = 0.01 ***P = 0.001

Tabelle 4.23: Allelsubstitutionskoeffizienten ($\alpha/2$) der STEPWISE Selektion aus Markerkombination 1 (*DGATI*^K, *CYP11BI*^V, *GML*⁺⁴⁰⁵, *GML*⁺⁵⁷³), Markerkombination 2 (*DGATI*^K, *CYP11BI*^V, *GML*⁺⁴⁰⁵, *GML*⁺⁵⁷³, *KIEL_E8*), Markerkombination 3 (*DGATI*^K, *CYP11BI*^V, *GML*⁺⁴⁰⁵, *GML*⁺⁵⁷³, *KIEL_E8*, *ILSTS039*²¹⁹, *ILSTS039*²²⁵, *CSSM066*¹⁸⁶, *CSSM066*¹⁹⁴) für Milchleistungsmerkmale in Deutschen Holsteins.

Markerkombination 1				Markerkombination 2				Markerkombination 3			
Allel	$\alpha/2$	SE	mult. R ²	Allel	$\alpha/2$	SE	mult. R ²	Allel	$\alpha/2$	SE	mult. R ²
Milch kg				Milch kg				Milch kg			
<i>DGATI</i> ^K	-246 ± 22.38***		0.22	<i>DGATI</i> ^K	-177 ± 45.98***		0.22	<i>DGATI</i> ^K	-183 ± 26.46***		0.23
<i>CYP11BI</i> ^V	-66 ± 23.61**			<i>CYP11BI</i> ^V	-74 ± 23.26**			<i>ILSTS039</i> ²¹⁹	-145 ± 26.43***		
<i>GML</i> ⁺⁵⁷³	-210 ± 81.57**			<i>KIEL_E8</i> ^I	-80 ± 45.86						
Fett kg				Fett kg				Fett kg			
<i>DGATI</i> ^K	10.48 ± 0.77***		0.25	<i>DGATI</i> ^K	10.48 ± 0.77***		0.25	<i>DGATI</i> ^K	10.96 ± 0.96***		0.31
<i>GML</i> ⁺⁵⁷³	-9.52 ± 2.94**			<i>GML</i> ⁺⁵⁷³	-9.52 ± 2.94**			<i>CSSM066</i> ¹⁹⁴	2.37 ± 1.32		
								<i>GML</i> ⁺⁵⁷³	-8.81 ± 4.80		
Protein kg				Protein kg				Protein kg			
<i>DGATI</i> ^K	-3.62 ± 0.65***		0.18	<i>DGATI</i> ^K	-3.62 ± 0.65***		0.18	<i>DGATI</i> ^K	-2.24 ± 0.77**		0.18
<i>CYP11BI</i> ^V	-1.43 ± 0.69*			<i>CYP11BI</i> ^V	-1.43 ± 0.69*			<i>ILSTS039</i> ²¹⁹	-3.58 ± 0.79***		
<i>GML</i> ⁺⁵⁷³	-6.58 ± 2.37**			<i>GML</i> ⁺⁵⁷³	-6.58 ± 2.37**			<i>GML</i> ⁺⁴⁰⁵	3.31 ± 1.53*		
Fett %				Fett %				Fett %			
<i>DGATI</i> ^K	-0.27 ± 0.01***		0.51	<i>DGATI</i> ^K	0.22 ± 0.02***		0.51	<i>DGATI</i> ^K	0.24 ± 0.02***		0.54
<i>CYP11BI</i> ^V	0.04 ± 0.01***			<i>CYP11BI</i> ^V	0.04 ± 0.01***			<i>ILSTS039</i> ²²⁵	-0.02 ± 0.02		
<i>GML</i> ⁺⁴⁰⁵	0.04 ± 0.02			<i>KIEL_E8</i> ^I	0.05 ± 0.02**			<i>ILSTS039</i> ²¹⁹	0.06 ± 0.02***		
<i>GML</i> ⁺⁵⁷³	-0.02 ± 0.04			<i>GML</i> ⁺⁴⁰⁵	0.03 ± 0.02			<i>CSSM066</i> ¹⁹⁴	0.01 ± 0.02		
				<i>GML</i> ⁺⁵⁷³	-0.02 ± 0.04						
Protein %				Protein %				Protein %			
<i>DGATI</i> ^K	0.06 ± 0.01***		0.25	<i>DGATI</i> ^K	0.06 ± 0.01***		0.25	<i>DGATI</i> ^K	0.05 ± 0.01***		0.23
<i>CYP11BI</i> ^V	0.01 ± 0.01*			<i>CYP11BI</i> ^V	0.01 ± 0.01*			<i>ILSTS039</i> ²¹⁹	0.02 ± 0.01**		
<i>GML</i> ⁺⁴⁰⁵	0.03 ± 0.01*			<i>GML</i> ⁺⁴⁰⁵	0.03 ± 0.01*			<i>CSSM066</i> ¹⁹⁴	0.02 ± 0.01		
								<i>CSSM066</i> ¹⁸⁶	0.02 ± 0.01*		
								<i>ILSTS039</i> ²²⁵	-0.01 ± 0.01		
SCS				SCS				SCS			
<i>CYP11BI</i> ^V	0.04 ± 0.02*		0.19	<i>CYP11BI</i> ^V	0.04 ± 0.02*		0.19	<i>ILSTS039</i> ²¹⁹	0.06 ± 0.02**		0.20
								<i>GML</i> ⁺⁵⁷³	-0.10 ± 0.07		

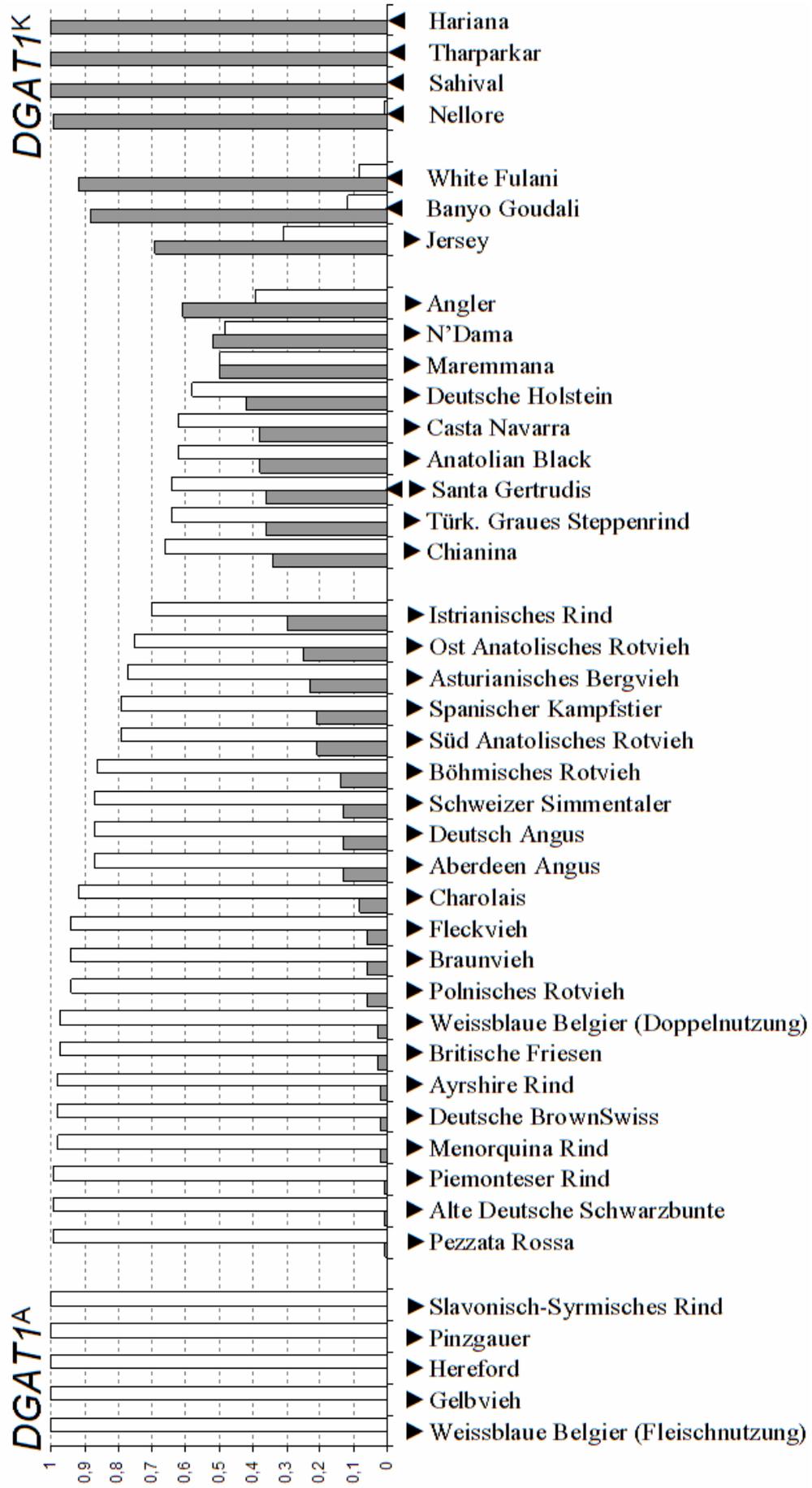
^a α definiert wie in Falconer & Mackay (1996), SE = Standardfehler, mult. R² = multiples Bestimmtheitsmaß, SCS = somatische Zellzahl, *P<0.05 **P<0.01 ***P<0.001

Die Ergebnisse der drei Varianzanalysen aus unterschiedlichen Markerkombinationen zeigten abweichende Werte für Parameterschätzwerte (PE) und deren Bestimmtheitsmaße (R^2) zwischen den Modellen für identische Marker. Ebenso veränderten sich Werte innerhalb der Modelle zwischen den Rechenschritten (Steps), sowie zwischen den Milchleistungsmerkmalen die Kombinationen der Markerauswahl mit der höchsten Erklärlichkeit. Wie in [Tabelle 4.19](#) gezeigt, war der PE für *DGATI*^K beim 1. Schritt immer am größten, bevor weitere Marker in den nachfolgenden Rechnungsschritten in das Modell aufgenommen wurden. Mit jedem weiteren Marker reduzierte sich der PE, obwohl R^2 für *DGATI* unverändert blieb. R^2 aller weiterer Marker war nie größer als 1%.

Effekte von *KIEL_E8*, *DGATI*, *CYP11B1*, *GML*⁺⁴⁰⁵, *GML*⁺⁵⁷³, *ILSTS039* & *CSSM066*: [Tabelle 4.23](#) zeigt die Ergebnisse der Berechnung der Allelsubstitutionseffekte mit der SAS GLM-Procedure nach der "STEPWISE-Auswahl" aus [Tabellen 4.19](#), [4.21](#) und [4.22](#). Die Markerzusammenstellung des jeweils letzten Selektionsschrittes wurde in das Regressions-Modell aufgenommen.

DGATI war bis auf das Merkmal Proteinmenge in Markerkombination 3 in allen Leistungsmerkmalen außer SCS höchstsignifikant (***). Neben *DGATI* waren in allen drei Kombinationen weitere Marker in signifikanter (*) bis höchstsignifikanter (***) Weise an der Erklärlichkeit der QTL-Wirkung beteiligt. Im Einzelnen variierten Erklärlichkeiten (R^2) für Milchmenge (kg) zwischen 0,22 – 0,23, für Fettmenge (kg) zwischen 0,25 – 0,31, waren konstant für Proteinmenge (kg) 0,18, variierten für Fettgehalt (%) zwischen 0,51 – 0,54, für Proteingehalt (%) zwischen 0,25 – 0,23 und somatische Zellen zwischen 0,19 – 0,20. Die absoluten Summen der Substitutionsgrößeneinheiten variierten am stärksten zwischen den Markerkombinationen 1 - 3 für Milchmenge (kg). Hier errechneten sich die Werte -522 kg, -331 kg und -328 kg. Die weiteren Substitutionssummenwerte betragen für Fettmenge (kg) 0,96 kg, 0,96 kg und 4,52 kg, für Proteinmenge (kg) 11,63 kg, 11,63 kg und 2,51 kg, für Fettgehalt (%) 0,21 %, 0,32 % und 0,29 %, für Proteingehalt (%) 0,1 % und somatische Zellen 0,04, 0,04 und -0,04. Die Markerauswahl zwischen den Kombinationen 1 und 2 änderte sich nicht wesentlich, sondern führte durch die Hereinnahme des Markers *KIEL_E8* in Kombination 2 bei den Leistungsmerkmalen Milchmenge (kg) zu einem Austausch und bei Fettgehalt (%) zu einer Ergänzung. Kombination 3 hatte zusätzlich jeweils 2 Allele der STS-Marker *ILSTS039* und *CSSM066* zur Auswahl, was einen nachhaltigen Einfluss auf die Markerzusammenstellung zur Folge hatte. Die Marker *CYP11B1* und *KIEL_E8*

Abbildung 4.16: DGATI Allelfrequenzen in 42 internationalen Rinderrassen unterschiedlicher Nutzungsrichtung. (weiße Säulen = Allel DGATI^A, graue Säulen = Allel DGATI^K, ► = *Bos taurus*, ◄ = *Bos indicus*)



verliessen komplett die Auswahl. Die Marker GML^{+405} und GML^{+573} verliessen das Modell für Fettgehalt (%) und Proteingehalt (%), erhielten jedoch eine erklärende Wirkung bei Fettmenge (kg) und Proteinmenge (kg) und zusätzlich bei somatischer Zellzahl. Die QTL-Wirkung für Milchmenge (kg) wird in Markerkombination 3 nur noch mit der Wirkung von $DGAT1$ und $ILSTS039^{219}$, das jedoch in höchst signifikanter Weise erklärt.

4.2.5 Datenanalyse der Allelfrequenzen des $DGAT1$ -Polymorphismus in *Bos taurus* und *Bos indicus* Rinderrassen

Abbildung 4.16 zeigt die Ergebnisse der Charakterisierung von 1848 *Bos taurus* und *Bos indicus* Rindern aus 42 internationalen Rassen (Nutzungsrichtungen Milch, Fleisch, Doppelnutzung). Es konnten eindeutige Unterschiede im Vorkommen und der Frequenz beider $DGAT1$ -Allele ($DGAT1^K$, $DGAT1^A$) festgestellt werden. Alle Rassen befanden sich im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

Neun Populationen zeigten mittlere Allelfrequenzen (0,33 – 0,66) für $DGAT1^K$. Diese Gruppe umfasste Rassen aus dem im Nahen Osten gelegenen Domestikationszentrum von *Bos taurus* ebenso, wie Rassen ohne systematischen Zuchthintergrund und afrikanische N'Dama Rinder, aber auch hoch selektierte *Bos taurus* Milch- und Fleischrassen. Rassen mit einem fixierten $DGAT1^A$ gehörten ausschließlich zur *Bos taurus* Population, wohingegen Rassen mit fixiertem $DGAT1^K$ ausschließlich der *Bos indicus* Population angehörten. Fünf Rassen waren homozygot für $DGAT1^A$ und vier Rassen homozygot für $DGAT1^K$. Zehn Rassen stimmten in erwartetem und beobachtetem Heterozygotiegrad überein ($F_{IS} \pm 0.02$), während 14 Rassen höhere und neun Rassen niedrigere als erwartete Frequenzen für den heterozygoten Genotyp zeigten (Tabellen 4.25a, b).

Wie in Abbildung 4.16 dargestellt, wurde $DGAT1^K$ nicht in Weißblauen-Belgiern (Fleischrasse), Gelbvieh, Hereford, Pinzgauer und Slavonisch Syrmischem Vieh gefunden. Die Nellore Population (46 Tiere) war homozygot für $DGAT1^K$ bis auf ein heterozygotes Tier, was untypischer Introgression zugeschrieben wurde; Sahival, Tharparkar und Haryana waren homozygot für $DGAT1^K$. In allen weiteren typisierten Rassen traten $DGAT1^A$ und $DGAT1^K$ in unterschiedlichen Frequenzen auf. *Bos taurus* Rinder zeigten geringere $DGAT1^K$ Frequenzen als *Bos indicus* Rinder: die geringste $DGAT1^K$ Frequenz besaßen Pezzata Rossa und Piemonteser Rinder über Deutsche Brown-Swiss und Ayrshire bis Fleckvieh und Charolais (0.01-0.08). Die geringsten $DGAT1^A$ Frequenzen wurden in afrikanischen Zeburassen Banyo Goudali und White Fulani (0,08 – 0,12) gefunden.

Tabelle 4.25a: Allelfrequenzen des *DGATI* Gens in 38 internationalen Rinderrassen unterschiedlicher Nutzungsrichtung, sowie ihre erwartete und beobachtete Homo- und Heterozygotie und F_{IS} -Werte pro Rasse.

Rasse	n^2	Allelfrequenzen		Homozygotie ¹		Heterozygotie ¹		F_{IS} ³
		DGATI ^K	DGATI ^A	erwartet	beobachtet	erwartet	beobachtet	
01 (ABA) Aberdeen Angus	86	0.128	0.872	33.2941	34	9.7059	9	+0.0735
02 (ANB) Anatolian Black	146	0.377	0.623	38.4828	38	34.5172	35	-0.0141
03 (ANG) Angler	96	0.615	0.385	25.0211	19	22.9789	29	-0.2656
04 (ASM) Asturian Mountain	100	0.230	0.770	32.1111	37	17.8889	13	+0.2753
05 (AYS) Ayrshire	82	0.024	0.976	39.0247	39	1.9753	2	-0.0127
06 (BAG) Banyo Goudali	144	0.861	0.139	54.6573	56	17.3427	16	+0.0779
07 (BBB) Belgian Blue Beef	30	---	1.000	-	-	-	-	-
08 (BBM) Belgian Blue Mixed	30	0.033	0.967	14.0000	14	1.0000	1	-0.0000
09 (BOR) Bohemian Red	88	0.136	0.864	33.5172	32	10.4828	12	-0.1467
10 (BRF) British Frisian	98	0.031	0.969	46.0619	46	2.9381	3	-0.0213
11 (CAN) Casta Navarra	84	0.381	0.619	21.9518	24	20.0482	18	+0.1033
12 (CHA) Charolaise	62	0.081	0.919	26.3279	26	4.6721	5	-0.0714
13 (CHI) Chianina	88	0.341	0.659	24.0000	28	20.0000	16	+0.2019
14 (EAR) East Anatolian Red	100	0.250	0.750	31.0606	35	18.9394	15	+0.2097
15 (GEV) Gelbvieh	30	---	1.000	-	-	-	-	-
16 (GEA) German Angus	106	0.132	0.868	40.7333	39	12.2667	14	-0.1429
17 (GBP) German Black Pied	86	0.012	0.988	42.0000	42	1.0000	1	+0.0000
18 (GEB) German Brown	16	0.062	0.938	7.0000	7	1.0000	1	+0.0000
19 (GBS) German Brown Swiss	96	0.021	0.979	46.0211	46	1.9789	2	-0.0108
20 (GEH) German Holstein	158	0.449	0.551	39.6560	34	39.3439	45	-0.1448
21 (GES) German Simmental	252	0.063	0.937	110.9562	112	15.0438	14	+0.0696

¹Erwartete Anzahl homozygoter und heterozygoter Tiere geschätzt unter Berücksichtigung von Levene's Korrektur (**Levene 1949**)

²Anzahl Tiere pro Rasse

³ F_{IS} wie in Weir & Cockerham (1984)

Zweinutzungsrassen hatten den engsten $DGATI^K$ Frequenz Bereich (0,01 – 0,23, Pezzata Rossa bis Asturian Mountain). Fleischrassen belegten den mittleren $DGATI^K$ Frequenz Bereich (0,01 – 0,34, Piemonteser bis Chianina Rinder), gefolgt von Milchrassen mit dem weitesten $DGATI^K$ Frequenz Bereich (0,02 – 0,69, Deutschem Braunvieh über Deutsche Holstein bis Jersey).

Innerhalb der Schwarzbunten Milchrinder Populationen konnten Unterschiede zwischen Deutschen Schwarzbunten alter Zuchtrichtung (Genreserve) gemeinsam mit Britischem Schwarzbunten Friesenrind und modernen Schwarzbunten Deutschen Holsteins gefunden werden. Britische Schwarzbunte Friesenrinder und Alte-Deutsche-Schwarzbunte waren annähernd homozygot für $DGATI^A$ (0,97 – 0,99), im Unterschied zu Deutschen Holsteins mit einer ausgeglichenen $DGATI^K$ Frequenz von 0,58. Eine eventuelle Analogie zwischen Deutschem Braunvieh und Deutschen Brown-Swiss bestand nicht, da beide Rassen nur geringe $DGATI^K$ Frequenzen (0,02 – 0,06) aufwiesen.

Seltene Rassen, wie türkisch-anatolisches Schwarzvieh, südanatolisches Rotvieh und Podolisches-Steppenrind, sowie afrikanische N'Dama Rinder zeigten mittlere $DGATI^K$ Frequenzen (0,21 – 0,52).

Tabelle 4.24: Paarweise berechnete F_{ST} -Werte (Weir & Cockerham 1984) zeigen genetische Differenzierung zwischen Rinderrassen (Nummerierung wie in Tabellen 4.25a, b) gepoolt in drei willkürlich festgelegten Fettgehaltsklassen (Fettgehalte nach Jensen 1995) und einer *Bos indicus* Rassengruppe.

Rassengruppen:		F_{ST} Werte ¹ (paarweise)			
		1	2	3	4
Gruppe 1	3,4 – 3,8% Milchfett	1			
Gruppe 2	3,9 – 4,4% Milchfett	2	0.0041		
Gruppe 3	4,5 – 6,3% Milchfett	3	0.0682	0.0404	
Gruppe 4	<i>Bos indicus</i>	4	0.7450	0.6814	0.5223
Gruppe 1	Rassen: 4, 7, 8, 11, 12, 15, 16, 23, 29, 31				
Gruppe 2	Rassen: 1, 5, 9, 10, 13, 14, 17, 18, 19, 20, 25, 26, 30, 32, 36				
Gruppe 3	Rassen: 2, 3, 21, 22, 24, 27, 33, 34, 35, 37, 39				
Gruppe 4	Rassen: 6, 28, 38, 40, 41, 42				

¹ F_{ST} nach Weir & Cockerham (1984);

Wie in Tabelle 4.24 gezeigt, konnten in Abhängigkeit ihres Milchfettgehaltes (Jensen 1995) gepoolte Subpopulationen gruppiert werden. Dabei zeigten “geringer” (3,4-3,8%), “mittlerer” (3,9-4,4%) und “hoher” (4,5-6,3%) Milchfettgehalt Differenzierung in

Tabelle 4.25b: Allelfrequenzen des *DGATI* Gens in 38 internationalen Rindrassen unterschiedlicher Nutzungsrichtung, sowie ihre erwartete und beobachtete Homo- und Heterozygotie und F_{IS} -Werte pro Rasse.

Rasse	n ²	Allelfrequenzen		Homozygotie ¹		Heterozygotie ¹		F_{IS} ³
		DGAT1 ^K	DGAT1 ^A	erwartet	beobachtet	erwartet	beobachtet	
22 (HER) Hereford	50	0.000	1.000	-	-	-	-	-
23 (IST) Istrian	98	0.296	0.704	28.3711	28	20.6289	21	-0.0184
24 (JER) Jersey	108	0.694	0.306	30.8692	35	23.1308	19	+0.1820
25 (MAR) Maremmana	96	0.500	0.500	23.7474	18	24.2526	30	-0.2420
26 (MEN) Menorquina	100	0.020	0.980	48.0202	48	1.9798	2	-0.0104
27 (NDA) N'Dama	50	0.520	0.480	12.2653	11	12.7347	14	-0.1035
28 (NEL) Nellore	94	0.968	0.032	44.0645	46	2.9355	1	+0.6737
29 (PER) Pezzata Rossa	94	0.011	0.989	46.0000	46	1.0000	1	+0.0000
30 (PIM) Piemontese	80	0.013	0.988	39.0000	39	1.0000	1	+0.0000
31 (PIZ) Pinzgauer	42	0.000	1.000	-	-	-	-	-
32 (POR) Polish Red	88	0.057	0.943	39.2299	39	4.7701	5	-0.0493
33 (SAG) Santa Gertrudis	96	0.375	0.625	25.2632	22	22.7368	26	-0.1466
34 (SLS) Slavonian Syrmian	6	0.000	1.000	-	-	-	-	-
35 (SAR) South Anatolian Red	96	0.208	0.792	32.0000	30	16.0000	18	-0.1277
36 (TDL) Toro De Lidia	94	0.213	0.787	31.0860	31	15.9140	16	-0.0055
37 (TGS) Turkish Grey Steppe	98	0.357	0.643	26.2680	32	22.7320	17	+0.2574
38 (WHF) White Fulani	88	0.920	0.080	37.4828	37	6.5172	7	-0.0758
39 (SWS) Swiss Simmental	70	0.129	0.871	27.0435	26	7.9565	9	-0.1350
40 (SAH) Sahival	5	1.000	0.000	-	-	-	-	-
41 (THA) Tharparkar	4	1.000	0.000	-	-	-	-	-
42 (HAR) Hariana	7	1.000	0.000	-	-	-	-	-

¹Erwartete Anzahl homozygoter und heterozygoter Tiere geschätzt unter Berücksichtigung von Levene's Korrektur (**Levene 1949**)

²Anzahl Tiere pro Rasse

³ F_{IS} wie in Weir & Cockerham (1984)

Allelfrequenzen am *DGATI* Locus. F_{ST} - Werte (Weir & Cockerham 1984) zwischen gepoolten Populationen waren alle von Null verschieden und ergaben die geringste Unterscheidung zwischen Rassengruppen 1 und 2, sowie die größte Differenzierung zwischen Rassengruppen 1 und 4. Ein χ^2 -Test (χ^2 mit 2 Freiheitsgraden) zwischen Populationen zeigte hohe Signifikanz für eine Differenzierung der Populationen.

5 Diskussion

Das bovine Chromosom 14 ist seit geraumer Zeit Gegenstand intensiver Untersuchungen nach Assoziationen zwischen genetischen Markern und QTL, die ökonomisch wichtige Merkmale in Fleisch- und Milchrindern betreffen. Bislang wurde in der Literatur von 30 QTL mit Auswirkung auf „Fettmerkmale“, die über das gesamte Chromosom verteilt sind berichtet (Wibowo *et al.* 2007). Die engere QTL-Region der vorliegenden Untersuchung scheint das gesamte proximale Ende von Chromosom *BTA14* zu bevölkern. Hier wurden in einem Bereich von ca. 4000 Kb (NCBI *BTAU*-Build 4.0) bzw. 18-24 cM mindestens 2 Milchleistungs-QTL entdeckt (Grisart *et al.* 2001, Winter *et al.* 2001, Bennewitz *et al.* 2004). Distal dieses Bereiches konnten keine signifikanten Assoziationen zwischen Kandidatengen und Fettleistungsmerkmalen festgestellt werden (Moore *et al.* 2003, Khatib *et al.* 2007).

5.1 Auswahl der Kandidatengene und Kandidatenloci

Vor der Kartierung des *DGATI*-Genes, war im verfügbaren Kartenmaterial der centromerische Bereich von *BTA14* lediglich mit zwei Markern charakterisiert, entweder MS-Marker *ILSTS039* (Kemp *et al.* 1995) oder *CSSM066* (Barendse *et al.* 1997). Aus Mangel einer weiter ins Detail gehenden Charakterisierung dieser Region bestanden unterschiedliche Ansichten über die Lage und Größe des QTL-Bereichs am centromerischen Ende von *BTA14* (Coppieters *et al.* 1998, Ron *et al.* 1998, Zhang *et al.* 1998, Heyen *et al.* 1999, Riquet *et al.* 1999). Genomische Rindersequenz oder homologe Sequenzen anderer Nutztiere waren nicht verfügbar. Aus diesem Grund wurden zum Generieren weiterer Marker im Rahmen dieser Arbeit homologe menschliche (*HSA8*), homologe murine (*MMUS15*) Sequenzen oder bovine EST (*BTA14*) herangezogen. Daraus abgeleitete Primer-Systeme, PCR-Systeme und Testsequenzierungen in unterschiedlichen bovinen Genen (*CYCL1*, *GPAA1*, *TSTA3*, *PTP4A3*, *SQLE*) konnten in der DNA diverser *Bos taurus* und *Bos indicus* Rinderrassen sehr wohl Sequenzvarianz aufdecken, jedoch waren die Dt. Holstein Bullen des ADR-Familienmaterials an diesen untersuchten Genabschnitten ausschließlich monomorph und dadurch nicht informativ.

Das *DGATI*-Gen wurde im Rahmen der Forschungsarbeiten "Genomanalyse-Rind ADRII" am Lehrstuhl für Tierzucht der TU-München kartiert (Winter *et al.* 2002). Es konnte als ein funktionelles Kandidatengen in Betracht gezogen werden, nachdem Literaturinformation über Knockout-Strains in Labormäusen für diesen Locus verfügbar wurde (Smith *et al.* 2000), wonach in weiblichen Mäusen ohne ein funktionsfähiges

DGATI-Gen (*DGATI*^{-/-}) eine Laktation nicht möglich ist. Als ein positionelles Kandidatengen qualifizierte es sich durch seine Kartierung auf *HSA8q24.3* (Cases *et al.* 1998), dem entsprechenden Bereich der QTL-Region auf dem homologen humanen Chromosom. Nach einer initialen Annahme, mit dem *DGATI* K232A Polymorphismus in Exon 8 den QTL für Milchleistungsmerkmale im centromerischen Bereich von *BTA14* aufgeklärt zu haben (Grisart *et al.* 2002, Winter *et al.* 2002), wurde deutlich, dass mit der genetischen Variation des *DGATI*-Gens alleine nicht die gesamte QTL-Wirkung zu erklären war. Durch die Anwendung von statistischen Modellen mit Regressionen auf mehr als eine Variable zeigte sich, dass mindestens für Fett- und Proteinmenge aber auch für Fett- und Proteinprozent eine weitere Quelle für Varianz im centromerischen Bereich existiert (Bennewitz *et al.* 2004). Einen entsprechenden Hinweis in die gleiche Richtung gab der in Fleischrindern kartierte QTL für "backfat" im Markerintervall *ILSTS039 - CSSM066* (Moore *et al.* 2003).

Kühn *et al.* (2004) untersuchten die Effekte von VNTR-Allelen in der Promotorregion des *DGATI* Gens auf Variation im Merkmal Milchfettprozent und konnten bei einigen ADR Holstein-Familien, die für die vorliegende Arbeit nicht verfügbar waren, zusätzliche Variation finden. In gleichen Untersuchungen bei drei französischen Milchrinderrassen (Montbelliarde, Holstein, Normande) konnten diese Ergebnisse jedoch nicht bestätigt werden (Gautier *et al.* 2007).

Broad *et al.* (1995) ordneten durch homologe physische Kartierung von Schaf (*OAR9*) nach Rind das *CYP11B1*-Gen dem bovinen Chromosom 14 (*BTA14*) zu. Genetisch kartiert war das *CYP11B1*-Gen bei Nutztieren jedoch nur in der Ziege (*CHI14*) (Schibler *et al.* 1998). Aufgrund seiner Lage bei Ziege und Mensch erschien *CYP11B1* als ein positionelles Kandidatengen und konnte im Laufe der vorliegenden Untersuchungen beim Rind erfolgreich in die QTL-Region kartiert werden (*BTA14q12*). Weil dieses Gen über den Weg des Kohlenhydrat- sowie Aminosäuren-Metabolismus Einfluss auf den Energiehaushalt eines Organismus ausübt (Wierda *et al.* 1987, Friedman *et al.* 1993, Shpigel *et al.* 1996), konnte es ebenso als ein funktionales Kandidatengen für Milchproduktion betrachtet werden. Entwicklungsgeschichtlich lassen sich Hinweise über Genvervielfältigungen des ancestralen *CYP11B1*-Gens in Entwicklungsstufen von vor der Ausbreitung der Säugetiere finden (Bülow & Bernhardt, 2002), die zu unterschiedlichen Kopien dieses Gens in den verschiedenen Arten führten. Nicht alle *CYP11B1*-Gene konnten ihre Funktionalität über die Zeit erhalten oder aber besitzen heute einen veränderten Substratbereich. Von der Ratte ist bekannt, dass sie drei (Mellon *et al.* 1995),

der Mensch zwei (Zhang & Miller, 1996) und Rind, Schaf und Schwein jeweils ein funktionales *CYP11B1*-Gen (Rind: Genbank: D00185) besitzen (Kirita *et al.* 1990, Okamoto *et al.* 1995, Sun *et al.* 1995, Bülow *et al.* 1996, Boon *et al.* 1997, Muller 1998). Nichtfunktionale *CYP11B1*-Gene (Kirita *et al.* 1990, Bülow & Bernhardt 2002), aus einer initialen oder auch sekundären Duplikation stammend, wurden in vielen Arten und ebenso beim Rind gefunden. Aus diesem Grund können PCR-Ergebnisse durch Mischamplifikate von zusätzlichen, außer dem beabsichtigten Sequenzabschnitt verfälscht werden. Zur Sequenzanalyse dieses Gens mussten daher Primersysteme entwickelt werden, die selektiv jeweils in einem Gen amplifizieren. Aufgrund von hohen Sequenzübereinstimmungen (D00185 vs. XR_028391 = 97%; D00185 vs. XR_028395 = 96%) in Genbereichen von Interesse kann die Primerselektivität jedoch beeinträchtigt werden. In der vorliegenden Arbeit konnte eine Deletion von 4 Nukleotiden (Pos. -263, -264, -265, -266) in den Promotorregionen der Pseudogene, verglichen mit dem kodierenden Gen, genutzt werden, um entsprechende Primersysteme zu etablieren. Deren spezifische Amplifikate konnten durch DNA-Sequenzierung und SSCP-Gelelektrophorese in ihrer Authentizität bestätigt werden.

Es ergaben sich Hinweise, dass die engere Region um das *CYP11B1*-Gen mit einer erhöhten Rekombinationshäufigkeit behaftet zu sein scheint. Deshalb wurde das *GML*-Gen als das benachbarte Gen typisiert, um eventuell Hinweise auf diesen Sachverhalt zu erhalten. Dieses Gen liegt auf *BTA14* in centromerischer Richtung (NCBI BT-Build 4.0) und zwei SNP (Pos. 405, Pos. 573) im Intron 1 konnten zur Typisierung genutzt werden. Von 18 Familienvätern segregierten diese SNP in zwei Familienvätern, deren Söhne im Whole Genome Scan des ADR I Projektes für Milchmenge / Proteinmenge (CF) und Fettmenge (BE) segregierten. Zusätzliche Bedeutung für das Merkmal SCS konnte auch deshalb vermutet werden, da dieses Gen in der Literatur mit Auswirkung auf Apoptosis beschrieben wird (Ueda *et al.* 1999).

Der Mikrosatellit *CSSM066* (Barendse *et al.* 1997) war in einigen Publikationen als der nächstgelegene Marker zu einem QTL für Milchmenge (Coppieters *et al.* 1998, Chamberlain *et al.* 2002, Boichard *et al.* 2003) und Milchinhaltstoffe genannt (Coppieters *et al.* 1998, Ron *et al.* 1998, Chamberlain *et al.* 2002, Boichard *et al.* 2003) und für diesen Marker waren vorhandene Typisierungen am gleichen Familienmaterial verfügbar (ADR Datenbank, Kiel). Die Eignung dieses Markers zur Feinkartierung bekräftigten Ergebnisse von Kantanen *et al.* (2000), die im Rahmen einer Diversitätsstudie an finnischen Milchrindpopulationen zeigen konnten, dass dieser Marker nicht neutral war und unter

Selektion stand. Aber auch in Fleischrinderpopulationen konnte dieser Marker genutzt werden. In einer QTL-Feinkartierungsstudie für Rückenfettstärke auf *BTA14* stellte sich heraus, dass weder der K232A Polymorphismus des *DGATI* Gens (Grisart *et al.* 2002, Winter *et al.* 2002) noch ein SNP in der 5'-Region des *TG* Gens (Barendse 1999) eine signifikante Assoziation zeigten, jedoch Mikrosatellit *CSSM066* in einer starken Assoziation mit einem QTL für Rückenfettstärke stand (Moore *et al.* 2003).

Der Mikrosatellit *ILSTS039* (Kemp *et al.* 1995) war in mehreren Publikationen ebenso als der nächstgelegene Marker zu einem QTL für Milchmenge (Looft *et al.* 2001) und Milchinhaltstoffe genannt (Heyen *et al.* 1999, Riquet *et al.* 1999, Looft *et al.* 2001, Ashwell *et al.* 2004). Innerhalb des Forschungsverbundes vorhandene Typisierungen für diesen Marker (ADR Datenbank, Kiel) am gleichen Familienmaterial konnten für die vorliegende Arbeit genutzt werden. Weller *et al.* (2003) fanden in israelischen Holsteins auf *BTA14* ein populationsweites Kopplungsungleichgewicht zwischen Mikrosatellit *ILSTS039* und *DGATI* und vermuteten damit einen zweiten QTL für Milchleistungsmerkmale lokalisiert zu haben.

5.2 Physische Kartierungen (*CYHRI*-Paralogen, *CYP11B1*-Gen)

Der EST1581 (Genbank Acc. AI461432) kodiert für einen Teil des Cysteine- und Histidine-rich cytoplasmic Protein. Der entsprechende Locus *CYHRI* wurde einem centromerischen Contig auf *BTA14.3* zugewiesen (Looft *et al.* 2001), einer Position, die der telomerischen humanen Position *HSA8q24.3* homolog ist und dort das Gen *CYHRI* beinhaltet. Das Screening der BAC-Bibliothek TUM_B754 mit EST1581-Primern führte zu BAC-Klon TUM_B754J10135Q2, der durch Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) der telomerischen Region auf *BTA14* zugewiesen werden konnte, die mit der centromerischen Region auf *HSA8* korrespondiert. Dieses menschliche Chromosom trägt insgesamt drei *CYHRI*-Paralogen, die sich auf Positionen *HSA8p23.2* sowie *HSA8q24.3* und *HSA8q11.1* verteilen. Da *BTA14* das Homologon des invertierten q-Arms von *HSA8* darstellt, besteht die Möglichkeit, dass wenigsten zwei paraloge *CYHRI*-Gene auf diesem bovinen Chromosom existieren.

Der BAC-Klon BBI_B750K2432Q2 wurde durch Screening der BAC-Bibliothek BBI_B750 mit Primern gefunden, die aus dem Genbank Acc. D00185 abgeleitet waren. *CYP11B1* spezifische Sequenzen wurden in diesem BAC-Klon durch Kolonie-PCR sowie durch Sequenzierung mit Primern, die aus cDNA-Sequenzen dieses Gens abgeleitet waren, nachgewiesen. *CYP11B1* konnte der Position *BTA14q12* durch FISH zugewiesen werden.

Diese Region korrespondiert mit der telomerischen Region auf *HSA8*, der Position des humanen Gens *CYP11B1* (*HSA8q23*).

5.3 Allelfrequenzen

Die Genfrequenz beschreibt die genetische Vielfalt einer Population und wird durch Selektion und Drift (Zufall) beeinflusst. So fanden kürzlich Näslund *et al.* (2008) unterschiedliche *DGATI*^K Frequenzen in zwei schwedischen Rotbunt Linien, die bis 1985 einem Genpool angehörten, jedoch seitdem in getrennten Populationen divergent auf hohen und niedrigen Milchfettgehalt selektioniert werden.

5.3.1 Frequenzen *DGATI* in *Bos taurus* & *Bos indicus* Rinderrassen

Die Auswahl der Rinderrassen (Tabelle 4.25 a-b), die im Rahmen der vorliegenden Arbeit für den *DGATI* (K232A) Polymorphismus charakterisiert wurden zeigte eine komplette Verteilung beider Allele, begonnen mit Fixierung von *DGATI*^A, über mittlere Frequenzen bis hin zu einer Fixierung von *DGATI*^K.

Zwischen den Milchrindrassen fiel auf, dass bei solchen, die für fettreichere Milch bekannt sind auch höhere Frequenzen von *DGATI*^K festgestellt werden konnte (Abb. 4.16). Dieses Ergebnis legte, aufgrund der Funktion dieses Gens, eine mögliche Ursächlichkeit nahe. Mit Hilfe der F_{ST} -Statistik (Weir & Cockerham 1984) wurde der Grad der Differenzierung von drei willkürlich definierten Phänotypen (Milchfettklassen 'niedrig', 'mittel' und 'hoch') beurteilt. Zusätzlich wurde eine reine *Bos indicus* Subpopulation als vierte Gruppe hinzugefügt. Die Zuordnung der 42 Rinderrassen zu den Milchfettklassen erfolgte nach Literaturangaben (Jensen 1995). Paarweise geschätzte F_{ST} -Werte zeigten eine klare Differenzierung der Subpopulationen in Abhängigkeit ihrer Phänotypen, und eine durch Selektion auf Milchmenge mit abnehmendem Fettgehalt wachsende genetische Divergenz vom *DGATI*-Wildallel. Dieses Ergebnis konnte durch einen Chi-Quadrat Test bestätigt werden.

Eine weitere Möglichkeit der Charakterisierung der ausgewählten Rassen anhand ihrer *DGATI*^K Allelfrequenzen ergab sich durch die Schätzung der F_{IS} -Werte, die eine Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht aufgrund mangelnder Heterozygotie darstellen. Auf diese Weise zeigen F_{IS} -Werte die Abweichung von zufälliger Paarung bzw. die Folge gezielter Selektion. Im Ergebnis, über ein breites Spektrum von Nutzungsrichtungen (Fleisch, Zweinutzung, Milch) hinweg, war zwischen den Rassen die Abweichung von Null mit $\pm 0,25$ jedoch unerwartet gering.

Nach Literaturangaben (Grisart *et al.* 2002, Winter *et al.* 2002) scheint $DGATI^K$ das anzestrale Allel zu sein und die K232A Substitution ereignete sich entwicklungs-geschichtlich mit großer Wahrscheinlich erst nach der Trennung der *Bos indicus* und *Bos taurus* Linien von einem gemeinsamen Vorfahren, vor 250000 Jahren (Burt 2009). Die Verteilung der Allelfrequenzen über 42 Rinderrassen zeigt eine Tendenz zu hohen Frequenzen für $DGATI^A$ in heutigen *Bos taurus* Rassen und $DGATI^K$ in *Bos indicus* Rassen. Dementsprechend wurde eine Fixierung von $DGATI^A$ lediglich in taurinen und $DGATI^K$ in indicinen Rinderrassen nachgewiesen. Die Tatsache, dass $DGATI^A$ ebenso in afrikanischen N'Dama Rindern gefunden wurde lässt es möglich erscheinen, dass die K232A Substitution zwar nach der Trennung der taurinen/indicinen Linien erfolgte, jedoch vor der Trennung der europäischen und afrikanischen *Bos taurus* Linien. Ein derartiges Ergebnis bestätigt die Annahme, dass die N'Dama Rasse unabhängig und im Rahmen eines weiteren Domestikationsereignisses eines taurinen Wildrindes in Nordafrika domestiziert wurde (MacHugh *et al.* 1997, Loftus *et al.* 1999, Troy *et al.* 2001).

Nach erfolgter Domestikation von Wildrindern, wirkte die Selektion durch Auslese möglicher Weise zugunsten einer höheren Frequenz von $DGATI^A$, wahrscheinlich in erster Linie durch eine früh einsetzende Selektion auf Milchmenge. Beide $DGATI$ Allele unterscheiden sich phänotypisch durch die Produktion fettreicherer Milch im Falle der Lysinvariante (K) und einer größeren Milchmenge im Falle der Alaninvariante (A). Fettreichere Milch muss jedoch vom Organismus energetisch aufwändiger produziert werden, als fettärmere Milch. Der „Resource Allocation Theory“ (Rauw *et al.* 1998) folgend, muss bei begrenzter Ressourcenverfügbarkeit und gleichzeitig steigenden Leistungen mit einem Wettbewerb um die Ressourcen zwischen Leistungsmerkmalen und anderen Merkmalen gerechnet werden. Auf diese Weise könnte aufgrund der K232A Substitution, ein geringerer Energieverbrauch des Alaninphänotyps für Milchmenge zu einer verbesserten Fruchtbarkeit geführt haben. Da bereits die follikuläre Reifung durch eine negative Energiebilanz beeinflusst wird (Lucy *et al.* 1992), könnte sich demnach durch natürliche Selektion ein Anstieg der $DGATI^A$ Frequenz nach ihrem erstmaligen Auftreten bereits im Wildrind vollzogen haben.

MacHugh *et al.* (1999) fanden von einander abweichende mtDNA Haplotypen zwischen europäischen Auerochsen (*Bos primigenius*) und europäischen Hausrindern, was die Existenz genetisch unterschiedlicher Subtypen beim Wildrind veranschaulicht. Auch Troy *et al.* (2001) konnte hohe Divergenzen von mtDNA Haplotypen zwischen domestizierten Rindern und altertümlichen britischen Auerochsen finden. In jedem Fall existierte ein nicht

domestizierter und genetisch unterschiedlicher Subtyp *Bos primigenius* parallel zu domestizierten Rindern über eine Zeitspanne von mehreren tausend Jahren. Das Vorkommen von Geneflow zwischen domestizierten und wilden Populationen konnte für das Huhn nachgewiesen werden (Berthouly *et al.* 2009). Aufgrund eines relativen Mangels an Offenland im Neolithikum, in den durch Neusiedlung nutzbar gemachten Flächen und somit auch an Weideflächen, müssen sich die Lebensräume von domestizierten und wilden Rindern in Mittel- und Nordeuropa in Siedlungsnähe zu großen Teilen überdeckt, zumindest jedoch berührt haben. Aufgrund von extensiver Tierhaltung, die bei Schafen gar zu Rückverwilderungen führen konnte, wie im Fall der korsischen Mufflons nachgewiesen (Pfeffer 1967), kann ein Kontakt zwischen wilden europäischen *Bos primigenius* und domestizierten *Bos taurus* Rindern nicht ausgeschlossen werden. Daher kann eine Introgression von Fremdallelen auch beim Rind nicht ausgeschlossen werden (Medjugorac *et al.* 1994, Vila *et al.* 2005, Götherström *et al.* 2005). Die molekulare Nachweisführung auf Zellkern-genomischer Ebene bleibt jedoch umstritten (Edwards *et al.* 2007, Bollongino *et al.* 2008), obwohl durch mitochondriale Sequenzanalyse in Hausrindern Haplotypen gefunden wurden, die eindeutig auf einen Geneflow von europäischen Auerochsen hinweisen (Achilli *et al.* 2009).

Heutzutage existieren *Bos taurus* Rinderrassen mit relativ hohen Frequenzen von $DGAT1^K$, die in Jersey bzw. Angler Rindern die Folge einer konsequenten Selektion auf Milchfett darstellen. In britischen Jerseys wurde eine $DGAT1^K$ Frequenz von 0,69 gefunden, die in neuseeländischen Jerseys sogar bei 0,88 liegt (Spelman *et al.* 2002). Von den frühen Vorfahren dieser Rasse wird vermutet, dass sie von keltischen Rindern der Eisenzeit abstammen (Porter 1991). Die Ost-Türkei, im Bereich des fruchtbaren Halbmondes gelegen, ist das bekannte Domestikationszentrum von *Bos primigenius*. In der Hoffnung, dass nahöstliche Rinder genetische Variation des Wildrindes erhalten haben (Loftus *et al.* 1999), erschienen türkische Rinderrassen in der vorliegenden Untersuchung von besonderem Interesse. Winter *et al.* (2002) fanden gemeinsame Haplotypen zwischen autochthonem anatolischem Schwarzvieh und Jersey, ebenso wie anatolischem Schwarzvieh und indischen Sahival (*Bos indicus*) Rindern. Frühere Untersuchungen von Blutpolymorphismen fanden Unterschiede zwischen Jersey Rindern und europäischen Rindern. Während dem HBB^A das vorherrschende Allel darstellt und praktisch in nordeuropäischen Rindern fixiert ist, liegt die HBB^B Frequenz in *Bos indicus* (0,4) bemerkenswert höher als in *Bos taurus* Rindern (0 – 0,2) (Baker & Manwell 1980). Beide Allele erreichen jedoch gleich hohe Frequenzen im Jersey Rind (Hines 1999).

Da Domestikationszentren von *Bos taurus* und *Bos indicus* in geringerer Entfernung von einander liegen als Distanzen, die von migrierenden neolithischen Wanderern überwunden wurden, kann auch ein früher Kontakt zwischen *Bos indicus* und *Bos taurus* Rindern nicht ausgeschlossen werden. Wenn ein $DGATI^A$ homozygoter Vorfahre der heutigen *Bos taurus* Rinder jemals existierte, muss es zu einer Introgression von $DGATI^K$ gekommen sein. Es ist nicht unwahrscheinlich, dass die frühen domestizierten Rinder, die nach Europa zogen bereits heterozygot für $DGATI^{K+A}$ waren, aus denen Rassen wie Jersey später entstehen konnten. Wiederholte Introgression von Auerochs Allelen (Medjugorac *et al.* 1994, Götherström *et al.* 2005, Achilli *et al.* 2009) in domestizierte Rinder könnte die Entstehung von $DGATI^A$ homozygoten Hausrindern heutiger Zeit erklären helfen und jegliche sich daran anschließende Selektion auf Milchmenge müsste dann den Trend zu $DGATI^A$ Homozygotie verstärkt haben.

$DGATI^K$ Frequenzen von 0,01 in deutschen schwarzbunten Milchrindern und 0,03 in britischen Rindern der Friesenrasse lassen darauf schließen, dass die Gründerpopulation beider Schläge, nämlich schwarzbunte Friesen und Jütland Rinder (Porter 1991), dieses Allel möglicherweise nicht trugen. Geht man von einer kontinuierlich wachsenden Wertschätzung von Milchfett als einer Energiequelle in der menschlichen Ernährung während der vergangenen 200 Jahre aus, sollte folglich auch eine Selektion auf dieses Merkmal neben dem Merkmal Milchmenge in schwarzbuntem nordeuropäischem Milchvieh praktiziert worden sein. Dementsprechend müssten Frequenzen höher als 0.01 – 0,03 für $DGATI^K$ in heutigen europäischen Friesenrindern gefunden werden können, wenn dieses Allel in solchen Rindern bereits vorhanden gewesen wäre. Bedenkt man, dass das heutige moderne deutsche Holstein Rind das züchterische Produkt einer 40 jährigen Verbesserungszucht (upgrading) über die Vaterseite mit amerikanischen und kanadischen Holstein Vererbern darstellt, könnte man ähnliche $DGATI^{K+A}$ Frequenzen in der alten sowie der neuen schwarzbunten Zuchtrichtung erwarten. Wir fanden jedoch mittlere Frequenzen für beide $DGATI$ Allele in Dt. Holsteins. Dieses Ergebnis stimmt überein mit Frequenzen in neuseeländischen Holsteins von 80 - 90 % US bzw. kanadischen Holstein Einfluss (Spelman *et al.* 2002). Nach Porter (1991) kamen 95 % der schwarzbunten Rinder, die nach 1852 nach Nord Amerika eingeführt wurden, aus den Niederlanden. Wenn $DGATI^K$ nicht in der Gründerpopulation vertreten war, kann Introgression dieses Allels in die Holstein Rasse durchaus während ihrer Gründerjahre in der nordamerikanischen Milchindustrie durch einen engen Kontakt mit der Jersey Rasse erfolgt sein. Winter *et al.* (2002) verglichen $DGATI$ -Haplotypen zwischen Rassen und

fanden einen gemeinsamen Haplotypen zwischen Dt. Holstein, Jersey und Dt. Fleckvieh. Das Auftreten dieses Haplotypen in Fleckvieh kann durch neuerliche Introgression von Red Holstein Allelen in diese Rasse erklärt werden. Ein gemeinsamer Haplotyp zwischen Holstein und Jersey kann jedoch angesichts der geschlossenen Herdbücher beider Rassen nur sporadischen Kreuzungen zu Beginn der Rassenformierungen in Nord Amerika zugeschrieben werden. Nachdem dieses Allel Eingang in die Rasse gefunden hatte, konnte *DGATI*^K aufgrund von Selektion, die seit 1950 vorwiegend auf Milchfett ausgerichtet war (Grisart *et al.* 2002), in seiner Frequenz steigen.

Mit Hilfe diagnostischer Gentestverfahren ist es möglich Rassenvielfalt unter neuen Gesichtspunkten zu sehen, was zukünftigen Zuchtplänen zuträglich sein kann und Rinder Diversitätsstudien bereichert. *DGATI* eröffnet die Möglichkeit Milchrinder effektiver auf Milchfettgehalt zu selektionieren und fügt der Palette der existierenden Gentests auf Fleischqualität eine weitere Testmöglichkeit hinzu.

5.3.2 Frequenzen *DGATI* & *CYP11B1* in ADR-Holstein und ADR-Fleckvieh

Familien

Für Frequenzen der Allele des *DGATI*-Gens waren Vergleichswerte fremder Populationen in der Literatur verfügbar. In Veröffentlichungen betragen die *DGATI*^K Frequenzen in Holstein Rindern von 0,30 (Bovenhuis & Schrooten 2002), über 0,35 (Winter *et al.* 2002), 0,42 (Kaupe *et al.* 2004b) bis 0,63 (Grisart *et al.* 2002). Spelman *et al.* (2002) fanden in neuseeländischen Holsteins Frequenzen von 0,24 bis 0,71 in Abhängigkeit des Anteils holländischer- oder US- bzw. kanadischer Vererber.

In einem Granddaughter-Design besteht die väterliche Seite aus Vater - Sohn, bzw. aus Halbgeschwister-Gruppen. Aus diesem Grund stellen in einem solchen Zuchtschema die mütterlich vererbten Allele eine unabhängigere Stichprobe der Population dar als die von den Vätern weitergegebenen (Weller *et al.* 2003). In der vorliegenden Untersuchung des ADR-Familienmaterials betrug die Frequenz der maternal vererbten *DGATI*^K Allele in den Söhnen des deutschen Granddaughter-Designs 0,549. Dieses Ergebnis ist trotz Unterschieden in Familienanzahl und Populationsgröße nahezu identisch mit Ergebnissen anderer Autoren (Thaller *et al.* 2003), die aus dem gleichen Familienmaterial eine Frequenz von 0,548 veröffentlichten. In der vorliegenden Untersuchung betrug die geschätzte Frequenz des maternal vererbten *CYP11B1*^V Allels in Dt. Holsteins 0,78 und in Fleckvieh 0,73. Annähernd übereinstimmende Frequenzen in zwei unverwandten Rassen können ein Hinweis auf einen physiologischen Zusammenhang sein. Das *CYP11B1*-

Genprodukt in Rindern, Schafen und Schweinen ist ein bipotentes Enzym (Bülow & Bernhardt, 2002) und beide Allele (*CYP11B1*^{V/A}) sind durch das Katalysieren von Reaktionen an den Positionen 11 und 18 im Steroidmolekül in die Interkonversion von biologisch aktivem Cortisol zu inaktivem Cortison und *vice versa* involviert. Dabei wäre vorstellbar, dass unterschiedliche Frequenzen beider Allele unterschiedliche Mengen von Genprodukten mit Auswirkungen auf Substratmengen zur Folge haben.

5.3.3 Frequenzen *KIEL_E8*, *GML*, *ILSTS039* & *CSSM066* in ADR-Holstein Familien

Initiale Schwierigkeiten einer gezielten Amplifikation des kodierenden *CYP11B1*-Gens ließen eine Etablierung weiterer Marker aus der unmittelbaren Nähe dieses Gens hilfreich erscheinen, um eventuelle genetische Variation mit Auswirkung auf Milchleistungsparametern dieses chromosomalen Abschnitts besser zu charakterisieren. Mit Primersystemen, abgeleitet aus humaner Sequenz, konnten die ersten 760 bp des bovinen *GML*-Gens amplifiziert und unter der Accessionsnummer AY950682 in der Genbank (NCBI) hinterlegt werden. Exon 1 sowie die partielle Sequenz von Exon 2 waren monomorph in Deutschen Holstein Rindern des ADR Familienmaterials. In der Sequenz von Intron 1 konnten jedoch mehrere SNP als PCR-RFLP entwickelt werden, wovon zwei genotypisch nutzbar waren (Pos. +405 [G/A], Pos +573 [G/T]).

KIEL_E8, *ILSTS039* und *CSSM066* Genotypisierungen und Allelfrequenzen standen aus dem ersten Abschnitt des Forschungsprojektes Genomanalyse Rind der Arbeitsgemeinschaft Deutscher Rinderzüchter in Zusammenarbeit mit vier universitären deutschen Tierzuchtinstituten (ADR I) zur Verfügung und wurden aus der ADR-Datenbank (Kiel) übernommen.

5.4 Kopplung / Kopplungsungleichgewicht (LD)

Wenn starke Kopplung zwischen zwei Genorten vorliegt, werden die Haplotypen in Form der Allele beider Loci auf einem Chromatid meistens als Ganzes in die nächste Generation weitergegeben. Dabei ist das Maß für die Kopplung die Rekombinationshäufigkeit. Die Rekombinationsfrequenz muss bei gekoppelten Loci aber unter 50 % liegen (Halliburton 2004), da für ungekoppelte Loci die Wahrscheinlichkeit der gemeinsamen Weitergabe 50 % beträgt. Man spricht von Kopplungsungleichgewicht (LD), wenn Allelkombinationen zweier Loci auf einem Haplotypen in einer Population häufiger vorkommen, als man es bei unabhängiger Kombination der Allele entsprechend ihrer Allelhäufigkeit erwarten würde (Bickeböller & Fischer 2007).

5.4.1 Kopplung zwischen Markern

Die Nützlichkeit eines Markers, in einer auf einem Modell basierenden Kopplungsanalyse, hängt von seinem Polymorphiegrad und seiner Vererbungsweise ab. Aus diesem Grund steigt die Informativität eines Markers wenn nachgewiesen werden kann, welches elterliche Allel an die Nachkommen weitergegeben wurde (Da *et al.* 1999). Sind die Markerloci aber nicht hochpolymorph, so ist nur eine kleine Anzahl Meiosen informativ (Guo *et al.* 1999). Im untersuchten Tiermaterial besaß die Fleckviehpopulation bei drei Markern (*KIEL_E8*, *CYP11B1*, *GML*⁺⁵⁷³) keine informative Meiose. Diese Marker besitzen jedoch nur eine geringe bis keine Heterozygotie (Tabellen 4.4 & 4.11) in dieser vergleichsweise kleinen Population (3 Familien = 196 Söhne). Sowohl bei kompletter Homozygotie als auch bei kompletter Heterozygotie können keine informativen Meiosen beobachtet werden. Bei einem Heterozygotiegrad = 0,5 in der paternalen und maternalen Elternpopulation ist demnach die Chance für informative Meiosen am größten, wie dies von den Markern *DGATI* und *GML*⁺⁴⁰⁵ in den Fleckvieh-Familien veranschaulicht wird. Trotzdem kann fehlende Informativität der Meiosen nicht mit Rekombinationslosigkeit gleich gesetzt werden, da doppelte Rekombination innerhalb eines Markerpaares nicht beobachtet werden kann. Insofern ist auch eine Kartierung von Loci ohne informative Meiosen erklärlich, da Rekombination vorhanden gewesen sein kann.

Aufgrund der zentralen Bedeutung des MS Markers *ILSTS039* für die Erklärlichkeit der genotypischen Varianz in der QTL-Region, neben dem K232A Polymorphismus im *DGATI*-Gen, wurden für alle acht Allele dieses MS-Markers die Kopplungsverhältnisse mit allen anderen Markern paarweise berechnet. Dabei zeigte sich, dass zwei Allele (217, 223) mit keinem anderen Marker, und zwei Allele (219, 227) mit allen anderen Markern in Kopplung stehen. Während die Frequenzen der Allele 217 (0,001) und 223 (0,002) sehr gering sind und bereits aus diesem Grund die Möglichkeit, Rekombinationsereignisse zu beobachten extrem eingeschränkt ist, kann dieser Schluss jedoch nicht auf Alle 219 und 227 in der Umkehrung übertragen werden, da hier große Unterschiede in den Frequenzen vorliegen (Tabelle 4.9). Alle anderen Allele (221, 225, 229, 231), obwohl mit unterschiedlichen Frequenzen genotypisiert, sind nicht mit allen Allelen der übrigen Marker und nicht in gleicher Weise gekoppelt (Tabelle 4.13a,b). Es ist aber das komplett gekoppelte Allel 219 dieses Markers, das in hoch signifikanter Weise Allelsubstitutionseffekte bei den Merkmalen Milchmenge, Proteinmenge, Fettprozente, Proteinprozente und SCS verursacht (Tabelle 4.23). Während eine Kopplung zwischen Loci grundsätzlich eine Funktion des physischen Abstandes zwischen diesen Loci

verkörpert, ist diese Definition für die Kopplungsverhältnisse der *ILSTS039*²¹⁷⁻²³¹ Allele mit den jeweiligen anderen Markerallelen in der QTL Region nicht ausreichend. Die MS-Allele unterscheiden sich zwar um jeweils ein Tandemrepeat (2 bp) in Größe, die Kopplungsverhältnisse unter den Allelen verändern sich jedoch nicht in linearer Abhängigkeit davon. Die Rate der meiotischen Rekombination ist aber keine konstante Funktion der physikalischen Distanz über das Chromosom. Diese Variation wird durch Rekombinations-"Hot Spots" und Rekombinations-"Kälte-Spots" verursacht, in allen Organismen, von Bakterien bis zu den Menschen (Majewski & Ott 2000).

Es ist üblich den Polymorphismus-Informationsgehalt (PIC) zu nutzen, um den Polymorphismus von Markern zu quantifizieren (Botstein *et al.* 1980), wobei der PIC eine Schätzung der Wahrscheinlichkeit darstellt informative Meiosen zu erhalten. Dabei ist der PIC betont abhängig vom Grad der Heterozygotie (Daetwyler *et al.* 2008) und ist im Ausmaß mit ihr vergleichbar, wenn der Locus eine größere Anzahl Allele besitzt, da mit einer Zunahme von Allelen die Heterozygotie und der PIC ebenfalls ansteigen (Liu 1998). Aufgrund der polymorphen Natur von "tandem repeats" sind Mikrosatelliten oft von größerer Heterozygotie und höherem PIC-Wert (Botstein *et al.* 1980) als biallelische Marker gekennzeichnet. Nach der theoretischen Formel von Botstein *et al.* (1980) werden bei hochpolymorphen Markern für den PIC-Wert nur geringfügig kleinere Werte als für die Heterozygotie generiert (Chakravarti & Lynn 1999), was auch für die MS-Marker in [Tabelle 4.11](#) zutrifft. Die im ADR-Familienmaterial festgestellten Unterschiede in PIC und in Heterozygotie der biallelischen Marker zwischen den Rassen Holstein und Fleckvieh lassen auf Unterschiede in der Populationsstruktur beider Rassen schließen. Obwohl die verglichenen Populationen in unterschiedlichen Größen vorlagen, waren die MS-Marker in ihrem PIC vergleichbar. Es zeigten sich jedoch Unterschiede im PIC der SNP-Marker, die mit Unterschieden in den Allelfrequenzen einhergingen.

5.4.2 Kopplungsungleichgewicht (LD) zwischen Markern

Untersuchungen, die für Holstein Rinder durch Auswertung von Mikrosatelliten Genotypisierungen genomweites Kopplungsungleichgewicht (LD) fanden (Farnir *et al.* 2002, McRae *et al.* 2002), werden von anderen Autoren mit dem Hinweis auf Unterschiede in den Messgrößen (D' , r^2) von LD diskutiert (Lipkin *et al.* 2009). So konnten Studien, basierend auf SNP-Markern wesentlich geringeres LD (≤ 100 Kb) in Holsteinpopulationen feststellen (McKay *et al.* 2007, Khatkar *et al.* 2008). Darüber hinaus zeigte Zhao *et al.*

(2005, 2007), dass ein standardisiertes χ^2 ebenso geeignet ist, die Regression des allelischen Zustandes zu beschreiben.

Zur Charakterisierung des Kopplungsungleichgewichtes in der untersuchten QTL Region der vorliegenden Arbeit wurde das Kopplungsungleichgewicht zwischen Markerpaaren berechnet. Hier wurde von den Allelfrequenzen der Eltern der Erwartungswert der Genotypfrequenzen in den Nachkommen abgeleitet, unter der Annahme der Abwesenheit von Kopplung (0-Hypothese), und anschließend mit den wirklichen Genotypfrequenzen der Nachkommen verglichen. Die Abweichungen wurden anhand des χ^2 Tests auf Signifikanz überprüft. Signifikanzen kennzeichnen in diesem Fall Kopplungsungleichgewichte (Tabelle 4.12). Das Ergebnis generiert jedoch aus unterschiedlichen Gründen hier kein klares Bild, da sich Entkopplung zwischen Markerpaaren ergibt, die aber innerhalb gekoppelter Markerpaare liegen. Es ist durchaus möglich, dass die Markeranordnung, so wie vom aktuellen *BTAU* Build 4.0 übernommen, noch nicht verlässlich rangiert sind, denn die physische Anordnung der Loci am proximalen Ende der physischen Karte von *BTA14* hatte über die Entwicklung der *BTAU*-Builds des NCBI, bis zum aktuellen *BTAU* Build 5.2, kontinuierlich starken Umsortierungen aufgrund von Neuankordnungen der Klone unterlegen. Eine stimmige Anordnung der Marker ist jedoch die Grundlage für die Erstellung von LD-Karten (Marques *et al.* 2008). Zum anderen erscheinen die am weitest entfernten Loci in der untersuchten Region (*KIEL_E8* - *CSSM066*) gekoppelt zu sein, obwohl innerhalb dieser Region andere Markerpaare, in enger Nachbarschaft gelegen, sich als entkoppelt präsentieren. Selbst innerhalb des *GML* Gens, zwischen dem Markerpaar *GML*⁺⁴⁰⁵/*GML*⁺⁵⁷³ wurde freie Rekombinierbarkeit errechnet. Im NCBI *Btau*-Build 4.0 ist *ILSTS039* der nächstgelegene distale Marker zu *DGATI*. Aufgrund dessen wurde, analog zu Weller *et al.* (2003), die ein starkes Kopplungsungleichgewicht zwischen *ILSTS039*²⁵⁵ und *DGATI*^K in der israelischen Holsteinpopulation nachweisen konnten, das Kopplungsungleichgewicht zwischen den jeweils häufigsten Allelen des Mikrosatellitenmarkers *ILSTS039* und dem Lysin (K) Allel des *DGATI* Gens, getrennt für deutsche Holstein und Fleckvieh berechnet. Getrennt deshalb, da sich *ILSTS039* Allelfrequenzen zwischen beiden Rassen markant unterscheiden. Für Deutsche Holstein wurden die Allele "219" und "225" ausgewählt, die gemeinsam 79 % der Frequenz ausmachen und für Fleckvieh die Allele "221" und "227", die gemeinsam 79,1 % der Frequenz betragen. Obwohl in Deutschen Holstein 8 Allele und in Fleckvieh 7 Allele des MS *ILSTS039* segregieren, waren die Allele "219" und "225" in Holstein und die Allele

"221" und "227" in Fleckvieh mit dem Lysin (K) Allel des *DGATI* Gens stark korreliert. Die χ^2 Werte für den Test auf freie Rekombination betragen bei Holstein 602,19 und 795 und bei Fleckvieh 9,16 und 219,65 für die jeweiligen *ILSTS039* Allele. Bei vier Freiheitsgraden sind drei dieser Werte hoch signifikant unter allen Kriterien und ein Wert ist signifikant. Aufgrund dessen kann für Deutsche Holstein wie für Fleckvieh ein starkes Kopplungsungleichgewicht zwischen *DGATI* und MS *ILSTS039* bestätigt werden.

Unter dem Szenario eines einzelnen QTL am proximalen Ende von *BTA14* unterstützt diese Kopplung die Markeranordnung des *BTAU*-Build 4.0 des NCBI, da hier *DGATI* und *ILSTS039* die nächstgelegenen Marker sind. Unter dem Szenario von zwei QTL unterstützt diese Kopplung die Markeranordnung des *Btau*-Build 3.1 des NCBI, da hier aufgrund einer unterschiedlichen Anordnung der Klone *ILSTS039* nicht mehr der nächstgelegene Marker zu *DGATI* ist und unter anderem durch das *CYP11B1* und das *GML* Gen von ihm getrennt liegt. Diese Marker könnten dann eine eigenständige Variation oder eine Kopplung zu einer eigenständigen Variationsquelle, beispielsweise dem in nächster Nähe gelegenen Gen *PTK2* aufweisen.

5.5 Rekombination zwischen Markern

Rekombinationsraten variieren beträchtlich zwischen den Arten (Dumont & Payseur 2008). Wie in dieser Arbeit gezeigt werden kann existieren ebenso Unterschiede in Rekombinationsraten zwischen Rassen. Die Rekombinationsrate zwischen Loci ist grundlegend für die Erstellung von Kopplungskarten, da das Maß der genetischen Distanz (cM) und die Anordnung der Loci Ableitungen der geschätzten Rekombinationswahrscheinlichkeiten darstellen. Die Rekombinationswahrscheinlichkeit zwischen zwei Loci an entgegengesetzten Enden des Chromosoms beträgt höchstens 50 %. Die Rekombinationshäufigkeit im juxtacentromerischen Bereich von Chromosomen wird jedoch diskutiert. Frühere Publikationen gehen von einer niedrigen Rekombinationsrate aufgrund von starker Methylierung im Centromer aus (Lambie & Roeder 1986, Ekwall *et al.* 1997, Choo *et al.* 1998, Mahtani & Willard 1998). Demgegenüber berichten neuerliche Untersuchungen von einer erhöhten Rekombinationsrate in Centromeren, trotz Methylierung. Die Rekombinationshäufigkeit in Centromeren ist demnach höher als an jeder anderen Stelle des Chromosoms (Jaco *et al.* 2008). Eine erhöhte Rekombinationshäufigkeit im centromernahen Bereich ist demnach nicht auszuschließen und könnte helfen, die insgesamt unklaren Rekombinationsergebnisse dieser Arbeit vor

dem Hintergrund der noch immer unklaren Loci-Anordnung auf der physischen Karte von *BTA14* in diesem Bereich zu erklären.

Von Unterschieden in Rekombinationsraten bei Rindern wurde bereits zwischen Zuchtrichtungen, Rassen (Thomsen *et al.* 2001, Weimann *et al.* 2003) und Einzeltieren (Park *et al.* 1995, Simianer *et al.* 1997) berichtet. So konnten auch in der vorliegenden Arbeit Unterschiede zwischen den Rassen Deutsche Holstein und Fleckvieh kartiert werden und dies auch hinsichtlich eines Abgleichs mit Literaturdaten (Thomsen *et al.* 2001, Bennewitz *et al.* 2003, Ihara *et al.* 2004). Die genetische Kartierung der errechneten Karte von *BTA14* basiert auf dem ARD-Familienmaterial für die Rassen Deutsche Holstein und Fleckvieh und wurde mit Hilfe der BUILD Option des Programms CRIMAP (Green & Crooks 1990) errechnet. Die Kalkulation der chromosomalen Abdeckung erfolgte aus der Summe aller Markerintervalle (Kosambi cM, Kosambi 1944). Die rassebezogenen Karten des Chromosoms *BTA14* zeigen Unterschiede in ihrer Länge jedoch nicht in ihrer Markeranordnung. Diese Anordnung der Marker am proximalen Ende von *BTA14* stimmt indes nicht mit der physischen Anordnung der Marker im *BTAU* Build 4.0 überein, sondern folgt der Anordnung der Marker der älteren Version *BTAU* Build 3.1. Wie an anderer Stelle berichtet kann dieser Bereich jedoch noch nicht als endgültig abgeschlossen angesehen werden, da die Annotation der Klone bzw. Loci in diesem Bereich bislang mit jedem neu veröffentlichten *BTAU*-Build großen Umordnungen unterworfen war. Unter der Annahme eines zweiten QTL für Milchleistungsmerkmale in der proximalen Region von *BTA14* erscheint jedoch die Markeranordnung des *BTAU* Build 3.1 wahrscheinlicher. Die Gesamtlängen der genetischen Karten unterscheiden sich um 8,1 cM (Kosambi) mit der größeren Karte für die Dt. Holstein Rasse. Die Größe des Markerintervalls *KIEL_E8* - *CSSM066* übertrifft aber in der Fleckviehkarte das homologe Intervall der Holsteinkarte um über 10 cM und weist auf eine erhöhte Rekombinationsrate am proximalen Ende von *BTA14* in dieser Rasse hin und unterstreicht somit, wie oben erörtert, eine erhöhte Rekombinationswahrscheinlichkeit im juxtacentromerischen Bereich. Vergleiche genetischer Kartendistanzen zwischen Populationen können jedoch durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden. So besteht eine Abhängigkeit von Stichprobengröße und Allelfrequenz und ob das genetische Modell dominant oder rezessiv ist (Luan *et al.* 2001). Da die Stichprobengröße, die zu einer verlässlichen Schätzung benötigt wird, mit der Anzahl der Allele an einem Locus ansteigt, ist es ratsam biallelische Marker zu nutzen, wenn die verfügbare Stichprobengröße nur etwa 800 oder weniger beträgt (B-Rao 2001). Die Stichprobengröße für Dt. Holstein im Rahmen der vorliegenden Untersuchung betrug

>800, die für Dt. Fleckvieh <800. Im gesamt genomischen Zusammenhang gehört *BTA14* zu den vier Chromosomen mit der höchsten Rekombinationsrate neben *BTA18*, *BTA19*, *BTA23* und weist durchschnittlich 1,57 cM pro Mb physischer Distanz auf, wie Arias *et al.* (2009) zeigen konnten.

Ungleiche Allelfrequenzen zwischen Populationen können ebenso unterschiedliche genetische Distanzen zwischen Loci verursachen und beeinflussen die Genauigkeit der Kartierung. So lässt sich Rekombination optimal in Heterozygoten und bei gleicher Allelverteilung beobachten, d.h. für biallelische Marker bei einer Verteilung von 0,50 pro Marker und bei Mikrosatelliten bei genau gleich verteilten Häufigkeiten pro Allel. Allelfrequenzen ändern sich jedoch durch Rekombination (Lewontin 1964).

Bei Dt. Holstein kann aufgrund fast identischer Allelfrequenzen zwischen *KIEL_E8* und *DGATI* von annähernd kompletter Kopplung ausgegangen werden. Fleckvieh zeigt zwischen beiden Markern ähnliche Tendenz, jedoch auf weniger ausgeglichenem Frequenzniveau. Die gleiche Situation ist auch für alle anderen Marker im Intervall *KIEL_E8* - *CSSM066* zwischen beiden Rassen feststellbar, mit Ausnahme des Markers *GML*⁺⁴⁰⁵, der sich in seiner Frequenz zwischen den Rassen stark unterscheidet. In der genetischen Karte der Fleckvieh Rasse tritt im Bereich dieses Markers der wesentliche Unterschied zur Holstein Karte auf. Untersuchungen bei Maus und Menschen konnten zeigen, dass repetitive Tandemsequenzen für eine erhöhte Rekombinationsrate verantwortlich sein können (Murray *et al.* 1999). Gleiches ist auch hier denkbar, da der MS-Marker *ILSTS039* in diesen Abschnitt kartiert, darüber hinaus aber auch für den innergenischen Bereich des *GML*-Gens, im Markerintervall *GML*⁺⁴⁰⁵ - *GML*⁺⁵⁷³, keine Kopplung nachgewiesen werden konnte. Unterschiedliche Autoren berichteten vor der Klonierung des K232A Polymorphismus im *DGATI* Gen von unterschiedlicher Größe des QTL-Bereichs im Rahmen zwischen 2 cM in niederländischen Holstein (Riquet *et al.* 1999) bis 30 cM in israelischen Holstein (Ron *et al.* 1998), was als ein weiterer Hinweis auf variable Rekombinationsraten in diesem Bereich verstanden werden kann. Darüber hinaus scheint generell eine Abhängigkeit zwischen Gen-Clustern stärker konservierter und weniger konservierter Gene mit entsprechend reduzierten und erhöhten Rekombinationsraten zu existieren (Pál & Hurst 2003).

Rekombinationsraten folgen keiner linearen Funktion der physischen Distanz zwischen Markern, sondern werden durch Sequenzunterschiede in ihrer Variation beeinflusst (Majewski & Ott 2000). Rekombinationspunkte können dabei sehr kleine Abschnitte

(~1 Kb) auf dem Chromosom darstellen, die trotzdem bis zu 2% der Rekombinanten des gesamten Chromosoms verursachen (Kobori *et al.* 1986, Wahls 1998). Zwischen den einzelnen Familien des ADR Holstein Familienmaterials (AA, BB, CC, DA, EA, FA) wurden Unterschiede in Rekombinationsraten festgestellt. Für jede Familie einzeln gerechnete Kopplungskarten führten dementsprechend zu unterschiedlichen Kartengrößen mit einer Varianz von 48,5 cM. Aufgrund geschlechtsspezifischer Unterschiede in Rekombinationsraten (Lindsley & Sandler 1977, Ellegren *et al.* 1994) sind weibliche Kopplungskarten größer, als die in dieser Arbeit auf der Grundlage des ADR-Familienmaterials bestehend aus männlichen Halbgeschwisterfamilien errechneten.

5.6 Regressionsanalysen

Kurz nach dem Beginn des ADRII-Projektes erschienen die Publikationen von Autoren (Grisart *et al.* 2002, Winter *et al.* 2002), die das Acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase 1 (*DGATI*) Gen als das funktionale Kandidatengen des QTL für Milchleistungsmerkmale am centromerischen Ende von *BTA14* beschrieben. Die Frage, ob damit alle Variation dieses QTL erklärt werden konnte wurde erst durch eine weitere Publikation (Bennewitz *et al.* 2004) zur Diskussion gestellt, da entsprechende Regressionsmodelle dahingehende Ergebnisse lieferten. Eine Kopplung des weiter centromerisch von *DGATI* kartierenden Markers *KIEL_E8* mit einem zweiten QTL wurde vorgeschlagen. Bereits weiter zurückliegende Publikationen (Ron *et al.* 1996, Coppieters *et al.* 1998, Heyen *et al.* 1999) hatten Kopplung des QTL zu den MS-Markern *ILSTS039* und *CSSM066* festgestellt. Diese Marker kartieren in heutigen Karten telomerisch von *DGATI*, waren aber zum Zeitpunkt der erwähnten Publikationen die am weitesten centromerisch kartierenden Marker der genetischen Karte von *BTA14*.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zur Klärung der Frage eines zweiten QTL und vor dem geschilderten Hintergrund, aufgrund seiner chromosomalen Position (Riquet *et al.* 1999) das *CYP11B1* Gen als Kandidatengen untersucht. Durch Literaturhinweise auf seine physiologische Funktionalität im Lipidstoffwechsel (Bhathena 2000) sowie in Elektrolythomeostasis und Glucose Metabolismus (Kirita *et al.* 1990, Bülow & Bernhardt 2002) konnte ein physiologischer Kandidatengenstatus vermutet werden.

5.6.1 Einfache Regressionsanalyse (Marker *CYP11B1* und *DGATI*)

Durch den Entwurf selektiver Primersysteme war es möglich, ein Polymorphismus (V30A) tragendes Genfragment im kodierenden *CYP11B1*-Gen zu amplifizieren und anschließend zu subklonieren, zu sequenzieren und verlässlich zu genotypisieren, um

diesen Polymorphismus dann sowohl einzeln als auch gemeinsam mit dem K232A Polymorphismus des *DGATI* Gens zu evaluieren. In der Literatur hatte dieses Gen bereits als genetischer Marker begrenzte Erwähnung gefunden (Riquet *et al.* 1999, Schibler *et al.* 1998), jedoch gab es keine Hinweise, wie eine Differenzierung zwischen dem kodierenden *CYP11B1*-Gen und *CYP11B1*-Pseudogenen in unmittelbarer chromosomaler Nähe erreicht werden konnte.

5.6.1.1 Substitutionseffekte bei Milchleistungsmerkmalen

Um einen Vergleich der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit *DGATI*-Ergebnissen anderer Autoren zu ermöglichen, trotz Unterschieden in Vorgehensweise und Populationsgrößen, wurden die Substitutionseffekte von *CYP11B1*^V und *DGATI*^K für Milchleistungsmerkmale zuerst für jedes Allel getrennt geschätzt, als einzelne fixe Variablen in einem linearen "fixed-effect Model". Kopplungseffekte blieben bei diesem Ansatz bewusst unberücksichtigt. Die Ergebnisse von Thaller *et al.* (2003) und Bennewitz *et al.* (2004) basierten auf gleichen linearen Modellen jedoch auf der Grundlage von "Daughter Yield Deviations" (DYD), die in der vorliegenden Arbeit nicht genutzt werden konnten. DYD eines Bullen verkörpern per Definition den Durchschnitt der Töchterleistung, korrigiert um fixe, nicht genetische und zufällige Effekte der Töchter und genetische Effekte der angepaarten Kühe (Liu *et al.* 2004). DYD sind nicht regressiert und stellen ein mehr unabhängiges Maß der phänotypischen Leistung der Töchter eines Bullen als einen Zuchtwert dar (VanRaden & Wiggans 1991). Für die vorliegende Arbeit waren DYD jedoch nicht für alle berücksichtigten Merkmale erhältlich. Aus diesem Grund wurden deregressierte Zuchtwerte (DRZW, Sigurdsson & Banos 1995, Jairath *et al.* 1998) für alle Merkmale genutzt. Deregressierte Zuchtwerte werden durch die Division ihrer Sicherheiten erzeugt (Harder *et al.* 2006). Die Verwendung von DRZW im Falle fehlender DYD wurde bereits in der Literatur vorgeschlagen (Sigurdsson & Banos 1995, Thomson *et al.* 2001). Auch im internationalen Vergleich (Interbull) ist es üblich mit DRZW zu arbeiten (Banos *et al.* 1993), da hier die nationalen Zuchtwertschätzungsmethoden oft erheblich von einander abweichen. DRZW werden dazu aus nationalen Zuchtwerten kalkuliert (Fikse *et al.* 1995) und nutzen, im Unterschied zu DYD, die Verwandtschaftsmatrix zwischen Bullen, um den Beitrag männlicher Verwandter zum Zuchtwert des Bullen zu eliminieren, sodass die bereinigten Töchterleistungen verbleiben. DRZW bezeichnen komplette Zuchtwerte, DYD repräsentieren per Definition jedoch nur die Hälfte des Zuchtwertes eines Vererbers (Sire). Aus diesem Grund betragen Standardabweichungen von DYD ebenso nur die Hälfte der Standardabweichung von

DRZW. Wird berücksichtigt, dass die Allelsubstitutionseffekte ($\alpha/2$ - Effekte) der zitierten Veröffentlichungen (Thaller *et al.* 2003, Bennewitz *et al.* 2004) nur den halben nominalen Wert der in der vorliegenden Arbeit präsentierten Ergebnisse betragen, so wurden für Effekte des *DGATI*^K Allels auf Milchleistungsparameter vergleichbare Werte gefunden. Standardisiert man Ergebnisse auf der Basis von DYD, so unterschieden sich *DGATI*^K $\alpha/2$ - Effekte für Milchmenge um 2 - 9 kg und waren für Fettgehalt und Proteingehalt nahezu identisch. Alpha/2 - Effekte für Fettmenge differierten um 0,51 - 1,18 kg und für Proteinmenge um 0,27 - 0,22 kg. Die mit den Einzel-Modellen (unabhängige Variable im Modell war *CYP11B1*^V oder *DGATI*^K) errechneten Substitutionseffekte für alle fünf Milchproduktionsmerkmale waren hochsignifikant für *DGATI*^K, aber ebenso für *CYP11B1*^V, wie aufgrund von Kopplungseffekten bereits im Voraus vermutet wurde. *CYP11B1*^V war darüber hinaus signifikant für SCS, was einer möglichen Kopplung zu einem QTL (Markerintervall: ILSTS011-BM302) in der Nähe zugeschrieben werden kann (Zhang *et al.* 1998), obwohl sich auch in der QTL-Region Anhaltspunkte für Variation in diesem Merkmal ergaben (*GML*-Gen, *PTK2*-Gen).

In der Absicht zwischen *CYP11B1*^V und *DGATI*^K Substitutionseffekten unterscheiden zu können, wurden anschließend beide Allele als unabhängige fixe Variablen in einem linearen "fixed-effect Model" berechnet. Im Resultat veränderten sich die Substitutionseffekte pro Allel teilweise erheblich, jedoch weit mehr für *CYP11B1*^V als für *DGATI*^K. Die Substitutionseffekte pro *CYP11B1*^V waren geringer in allen Produktionsmerkmalen. Milchmenge und Fettgehalt waren weiterhin höchst signifikant, Proteinmenge hoch signifikant und Proteingehalt signifikant. Obwohl *CYP11B1*^V in der Einzelanalyse einen signifikanten Effekt auf SCS hatte, konnten in der gemeinsamen Analyse keine Effekte mehr nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis kann als eine Bestätigung der Analyse eines zweiten unabhängigen QTL gewertet werden.

Bennewitz *et al.* (2004) untersuchten den *BTA14* QTL ebenso, um auf zusätzliche Variation neben den bereits gefundenen *DGATI*^K Substitutionseffekten zu testen. Von diesen Autoren wurde ein weiterer bedingter QTL erkannt, der einen hoch signifikanten Effekt für Fettmenge, Proteinmenge sowie Fettprozent, aber keinen Effekt für Milchmenge zeigte. Da Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nur Substitutionseffekte für Fettprozent und Proteinprozent bestätigen, die unabhängig vom *DGATI*^K Allel nachgewiesen werden konnten, müssen in der weiteren QTL-Region zusätzliche Quellen für genetische Variation mit Auswirkungen auf Fett- und Proteinmengen existieren.

5.6.1.2 Substitutionseffekte bei Exterieurmerkmalen

Wenngleich der Nutzen von QTL für Körpermerkmale wenig offensichtlich zu sein scheint, wurden in der Literatur bereits starke Korrelationen zwischen ihnen und zuchtrelevanten Merkmalen gefunden, wie z.B. zwischen Größe und Produktionsmerkmalen (Short & Lawlor 1992), Fundamentnote und Langlebigkeit (Klassen *et al.* 1992, Dekkers *et al.* 1994, Vollema & Groen 1996), Exterieur und Kalbeintervall (Dadati *et al.* 1986), Euterform und SCS (Rogers & Hargrove 1993) und Milchtyp und metabolischer Gesundheit (Rogers *et al.* 1999).

Die Schätzung von Substitutionseffekten für Exterieurmerkmale, in den Einzelmodellen ($CYP11BI^V$ einzeln, $DGATI^K$ einzeln) erbrachte keine signifikanten Resultate für $CYP11BI^V$ aber für $DGATI^K$. Spelman *et al.* (2002) typisierten Holsteins ebenfalls mit $DGATI$, fanden jedoch keine signifikanten Effekte für Exterieur in der neuseeländischen Population. In der vorliegenden Untersuchung zeigten Dt. Holstein hoch signifikante Effekte für die Merkmale "Stärke" und Signifikanz für "Beckenbreite" für $DGATI^K$ im Einzelmodell sowie im Gemeinschaftsmodell. $CYP11BI^V$ blieb auch hier ohne Effekte.

Diesen Ergebnissen zufolge besitzen $DGATI$ Genotypen unterschiedliche Einflüsse auf das Exterieur von Milchrindern. In neuerlichen Veröffentlichungen genomweiter QTL - Kartierungen wurden keine Exterieureffekte für Marker auf $BTA14$ festgestellt. Dies könnte jedoch auf mangelnde Markerdichte (Schrooten *et al.* 2000), große Markerintervalle (Hiendleder *et al.* 2003) mit geringem Informationsgehalt (Boichard *et al.* 2003) zurückzuführen sein.

5.6.1.3 Substitutionseffekte bei Fruchtbarkeitsmerkmalen

Das Merkmal "Kalbeverlauf" ist ein komplexes Merkmal, wird aber hauptsächlich von der Größe des Kalbes und der Größe des Beckengürtels der Kuh beeinflusst (Meijering 1984, Johanson & Berger 2003). Das Merkmal "paternaler Kalbeverlauf" war im Einzelmodell der vorliegenden Arbeit, sowie im Gemeinschaftsmodell mit signifikanten Effekten durch $CYP11BI^V$ gekennzeichnet. Der Zuchtwert für paternalen Kalbeverlauf beschreibt dabei die Tendenz der Kalbeleichtigkeit (bzw. Kalbeschwierigkeit) von Kälbern eines bestimmten Bullen, verglichen mit dem Durchschnitt aller Kälber. Dabei ist unter dem paternalen Effekt bei den Kalbmerkmalen der Einfluss des Kalbes (Form, Größe) auf den Kalbeverlauf zu verstehen (VIT 2010). Demzufolge könnte der signifikant positive Effekt von $CYP11BI^V$ Unterschiede in der Wachstumsdynamik des Feten (Geburtsgewicht des Kalbes) vermuten lassen. Auch in der Literatur lassen sich hinreichend Nachweise

finden, die Geburtsgewichte der Kälber als den wichtigsten Faktor von Kalbeschwierigkeiten bezeichnen (Bellows *et al.* 1971, Burfening *et al.* 1978, Wang *et al.* 2000/2001). Da sich im Gemeinschaftsmodell der Effekt für *CYP11B*^V verstärkte, sind für den Fall, dass die errechneten Effekte nicht durch das *CYP11B*^V Allel selbst verursacht werden Kopplungseffekte nicht auszuschließen. Dabei ist es durchaus möglich, dass eine Kopplung zu zwei QTL für Wachstumseigenschaften bzw. Geburtsgewicht / 60-Tage-Gewicht (Miyata *et al.* 2006), die in einer F2-Generation der Rassen Holstein/Gir auf BTA14 bei 1 cM bzw. 0 cM kartiert wurden, existiert. *DGATI*^K Genotypen scheinen wie oben erwähnt Einfluss auf Exterieur Merkmale "Stärke" und "Beckenbreite" auszuüben, wenngleich das Fruchtbarkeitsmerkmal "maternaler Kalbeverlauf" (Größe & Form des Beckens) in der vorliegenden Analyse keine signifikanten Effekte zeigte.

Eine kontinuierliche Selektion auf Milchmenge über lange Zeit führt gleichzeitig zu einer Veränderung von Rahmen und Gewicht der Kuh (Heinrichs & Losinger 1998). Mit dem Anstieg der Milchleistung, nahm das Einzeltierkaliber in der Holstein Rasse kontinuierlich zu (Heinrich & Hardgrove 1987). Gravert *et al.* (1979) berichteten durchschnittlich von 137 cm Schulterhöhe und 640 kg Gewicht für die Holstein Rasse. Im heutigen Zuchtziel wird eine Schulterhöhe von 145-156 cm und ein Körpergewicht von 650 - 750 kg beschrieben (Deutscher Holsteinverband e.V. 2008). Das Merkmal Geburtsgewicht ist positiv mit Wachstumsmerkmalen korreliert (Woldehawariat *et al.* 1977) und Wachstumsleistung mit verfügbarer Energie (Halse *et al.* 1976), sodass eine Selektion auf Milchleistung indirekt eine Selektion auf höhere Geburtsgewichte bewirken könnte (Barnes *et al.* 1985, Bonczek *et al.* 1992). Aufgrund starker Kopplung am centromerischen Ende von BTA14 ist der Einfluss von QTL für Geburtsgewicht / 60-Tage-Gewicht in Kopplung mit dem Marker *CSSM066* nicht auszuschließen (Miyata *et al.* 2007). Da eine Selektion auf Größe, Geburtsgewichte schneller ansteigen lassen kann als Beckengröße, kann von einer negativen Korrelation zwischen diesen Merkmalen ausgegangen werden (Meijering 1984). Im Lichte von nur geringen Erblichkeiten der Fruchtbarkeitsmerkmale und signifikanten Effekten auch von nicht genetischen Faktoren, bleibt die Interpretation von Effekten für Fruchtbarkeitsmerkmale jedoch schwierig.

Das *DGATI*^K Allel zeigte signifikant negative Effekte für das Merkmal "maternale Non-Return-Rate 90", welches den Befruchtungserfolg der Töchter eines Bullen anhand der Non-Return-Rate darstellt. Nach der Abkalbung durchwandern Milchkühe ein ausgeprägtes Energiedefizit, das durch das Einsetzen starker Milchsekretion und einer unzureichend schnellen Erhöhung der Nahrungsaufnahme verursacht wird. Es besteht eine

direkte Korrelation zwischen der negativen Energiebilanz, sowie dem Ausmaß der Mobilisation von Körperfettdepots und dem Einsetzen der zyklischen Eierstocksaktivität *post partum* und einer verminderten Fruchtbarkeit. Ein Verlust an Körpermasse zu Beginn der Laktation von mehr als 1,0 BCS-Punkt (Body Condition Score, Edmonson 1989) ist mit einer signifikanten Verschlechterung des Erstbesamungserfolges verbunden (Butler & Smith 1989). De Vries & Veerkamp (2000) konnten zeigen, dass ein Absinken des maximalen Wertes der negativen Energiebilanz um 10 MJ NEL / Tag zu einem um 1,25 Tage verzögerten Auftreten der ersten Ovulation *post partum* führt. Aufgrund dessen wäre Variation im Merkmal Neon-Return-Rate durch Variation in $DGATI^K$ Frequenzen denkbar, als Folge einer erhöhten Energiebereitstellung des Organismus für vermehrte Milchfettproduktion und einem daraus resultierenden, stärkeren und verlängerten Energiedefizit *post partum*. Obwohl grundsätzlich das laktationsspezifische Ungleichgewicht im Energiestoffwechsel der Milchkuh ein hormonell bestimmter Vorgang ist, bei dem lediglich die Intensität variiert (Stangassinger 2006), errechneten Coffey *et al.* (2003) Zuchtwerte für Energie-Inbalancen, die sie aus BCS-Evaluierungen der Töchter von Besamungsbullen ableiteten.

5.6.1.4 Korrelationen zwischen DRZW für Milchleistungsmerkmale und Fruchtbarkeitsmerkmale

Pearson's Korrelationskoeffizienten wurden in der vorliegenden Arbeit zwischen DRZW für Milchleistungsmerkmale und Fruchtbarkeitsmerkmale mit Nutzungsdauer in der Absicht berechnet, mögliche Auswirkungen von erhöhter Energiebereitstellung der Kuh für erhöhte Milchfettwerte auf Fruchtbarkeit und Eutergesundheit zu bewerten. Bei Merkmalen mit hoher Heritabilität reichen oft wenige Töchter aus, um Zuchtwerte mit geringen Standardfehlern zu schätzen. Funktionale- und Fruchtbarkeitsmerkmale besitzen jedoch eher geringe Erblichkeiten, die im Allgemeinen zu geringen Sicherheiten in jungen Vererbern führen, da Sicherheiten der Zuchtwerte als die quadrierte Korrelation zwischen geschätzten und wahren Zuchtwerten definiert sind (VanRadden *et al.* 1991). In einem Granddaughter-Design haben Söhne üblicherweise 50 oder mehr Töchter, die Zuchtwertschätzungen mit Sicherheiten in der Größenordnung von 85 - 95% (Coppieters *et al.* 1999) ermöglichen. Die in dieser Studie berücksichtigten Holsteinbullen wurden zwischen 1986 und 1993 geboren, sodass Sicherheiten aufgrund der großen Nachkommenschaft sich im gehobenen Bereich bewegen (Milchleistung 95,4 %, Fruchtbarkeit 74,2 % und Exterieur 83,1 %).

Die wichtigsten Abgangsgründe für Holstein Milchrinder im Jahr 2002 in Deutschland waren Sterilität (20,6 %), Euterkrankheiten (15,2 %) und Fundament (9,1 %) (Bünger *et al.* 2002). In der zitierten Untersuchung war der Relativzuchtwert für somatische Zellzahl (RZS) am engsten mit dem Relativzuchtwert Nutzungsdauer (RZN) korreliert und betrug -0,42. In der vorliegenden Arbeit waren Korrelationen eher schwach, bis auf Korrelation "Nutzungsdauer" vs. "SCS" mit einem Wert von -0,52, der sich demnach in vergleichbarer Größenordnung bewegt. Signifikanzen waren durch die große Anzahl ausgewerteter Bullen von der Tendenz her sehr hoch. Auch wenn die nominalen Werte nur geringe Größen einnahmen, konnte eine klar negative Beziehung zwischen dem Merkmal "Milchfettprozent" und Fruchtbarkeitsmerkmalen festgestellt werden. Unter den direkten Produktionsparametern wurden die höchsten Korrelationen zwischen "Fettmenge" vs. "mNRR 90" und "Proteinmenge" vs. "mNRR 90", sowie "Fettmenge" vs. "Nutzungsdauer" mit jeweils -0,12, -0,09 und -0,12 festgestellt und alle waren höchst signifikant. 1998 fanden Boichard *et al.* bei einer Untersuchung der Fruchtbarkeitssituation der französischen Rassen Holstein, Normande und Montbelliarde durch Auswertung von annähernd 16 Mill. Befruchtungsdaten eine negative Korrelation in der Höhe von -0,2 bis -0,5 zwischen den Merkmalen "Milchmenge" und dem Befruchtungserfolg durch künstliche Besamung. Die vorliegende Untersuchung fand eine negative Korrelation zwischen den Merkmalen "Milchmenge" und "mNRR90", zwar in einer wesentlich geringeren Größe (-0.06), jedoch in ebenso signifikanter Weise.

Das Merkmal "Paternaler Kalbeverlauf" war höchst signifikant korreliert mit "Fettmenge" (-0,10). Es finden sich Hinweise in der Literatur, dass bei Anpaarung von *Bos indicus* Bullen an *Bos taurus* Kühe die Kreuzungsprodukte höhere Geburtsgewichte aufweisen, einhergehend mit Kalbeschwierigkeitsgraden, als durch die Größe der *Bos indicus* Vaterrasse zu erwarten wäre (Gregory *et al.* 1979b, Reynolds *et al.* 1980, Roberson *et al.* 1986). Da alle *Bos indicus* Rassen homozygot für das *DGATI*^K Allel sind (Kaupe *et al.* 2004a, Tania *et al.* 2006) erscheint ein kausaler Zusammenhang nicht ausgeschlossen. Bei den Produktionsmerkmalen waren die negativen Korrelationen zwischen DRZW Nutzungsdauer vs. "Fettmenge", bzw. "Fettprozent" vs. "SCS" die höchsten, die in der vorliegenden Untersuchung gefunden wurden. Eine hohe Korrelation zwischen "Nutzungsdauer" und "SCS" bestätigen Ergebnisse von Nash *et al.* (2000). Diese Autoren fanden, dass Töchter von Vätern, die längere Nutzungsdauer vererben, eine geringere Anzahl und geringere Intensität von Mastitis aufweisen als andere.

Da das Ausmaß einer negativen Energiebilanz, sowie der Rate der Genesung von einer Energieimbalance wichtige Faktoren für eine optimale Fruchtbarkeit zu sein scheinen (De Vries & Veerkamp 2000, Roche *et al.* 2000, Westwood *et al.* 2002), besteht die Möglichkeit eines negativen Einflusses von steigender Milchfettmenge auf eine funktionierende Fruchtbarkeit der Milchkuh und dadurch auf die Länge ihrer Nutzungsdauer.

5.6.2 Multiple Regressionsanalyse

(Marker *KIEL_E8*, *DGATI*, *CYP11B1*, *GML*⁺⁴⁰⁵, *GML*⁺⁵⁷³, *ILSTS039*, *CSSM066*)

Der in der vorliegenden Untersuchung in der Einzelgen-Analyse (nur *DGATI* als abhängige Variable im Modell) errechnete Allelsubstitutionskoeffizient ($\alpha/2$) für *DGATI*^K, in der Größenordnung von -144 kg Milch, ist vergleichbar mit den Ergebnissen anderer Autoren, die von nur einem QTL am centromerischen Ende von *BTA14* ausgingen (Looft *et al.* 2001, Grisart *et al.* 2001, Spelman *et al.* 2002, Thaller *et al.* 2003, Bennewitz *et al.* 2003) und liegt Ergebnissen aus Untersuchungen an Dt. Holstein Population näher, als Ergebnissen aus fremden Holstein Populationen. In niederländischen und neuseeländischen Holstein fanden Grisart *et al.* (2001) einen Allelsubstitutionskoeffizienten für *DGATI*^K von -158 kg Milch und Spelman *et al.* (2002) von -133 kg Milch. In Dt. Holsteins fanden Looft *et al.* (2001) für die ersten 100 Tage der Laktation -140 kg, Thaller *et al.* (2003) durchschnittlich für die ersten 3 Laktationen -146 kg und Bennewitz *et al.* (2003) durchschnittlich für die ersten 3 Laktationen einen Allelsubstitutionskoeffizienten für *DGATI*^K von -153 kg Milch.

Der Ansatz, ungeklärte Varianz im QTL-Bereich neben dem K232A Polymorphismus des *DGATI*-Gens im QTL-Bereich mit dem V30A Polymorphismus des *CYP11B1*-Gens als zusätzlichen Marker zu erklären, blieb wie oben beschrieben für die Merkmale Fett- und Proteinmenge unvollständig. Aus diesem Grund wurden zwei weitere SNP-Marker (*GML*⁺⁴⁰⁵, *GML*⁺⁵⁷³) in der QTL-Region etabliert sowie unveröffentlichte Mikrosatelliten-Typisierungen anderer Autoren (*ILSTS039* Bennewitz / Kiel, *CSSM066* Kühn / Dummerstorf) und Typisierungen des SSCP-Markers *KIEL_E8* (Karral-Albrecht *et al.* 2000, Looft *et al.* 2001) einbezogen. Um das gesamte verfügbare Datenmaterial zur Feinkartierung eines 2. QTL zu nutzen, wurde anschließend ein "Multiples Regressions-Verfahren" durchgeführt.

5.6.2.1 Stepwise Regression (Multivariate Analyse durch Multiple Regression)

Unter einem Szenario von zwei QTL zur Erklärung der gesamten Varianz am centromerischen Ende von *BTA14* muss sich zwangsläufig der Allelsubstitutionskoeffizient ($\alpha / 2$) für *DGATI*^K reduzieren. Hierbei fanden Bennewitz *et al.* (2004) noch 89% (-136 kg Milch) ihres ursprünglich errechneten $\alpha/2$ -Wertes für *DGATI*^K (-153 kg Milch). In der vorliegenden Untersuchung wurde die Annahme eines 2. QTL in konkreter Form anhand des Aminosäureaustausches (V30A) des positionellen Kandidatengens *CYP11B1* durchgeführt. Unter dieser Annahme konnte für *DGATI*^K ein $\alpha/2$ -Wert von -129 kg Milch errechnet werden. Dieses Ergebnis stellt eine Minderung des initialen $\alpha/2$ -Wertes (-144 kg Milch) im gleichen Verhältnis dar (89%), wie von Bennewitz *et al.* (2004) beschrieben. Aufgrund dieser Tatsache kann das Ergebnis als eine Bestätigung der Annahme eines 2. QTL interpretiert werden, der in einer starken Kopplung mit dem *CYP11B1*^V-Allel steht. Obwohl Bennewitz *et al.* (2004) den zweiten QTL in Kopplung mit dem SSCP Marker *KIEL_E8*, der in der physischen Karte (*BTAU* Build 4.0) proximal zum *DGATI*-Gen kartiert, darstellen konnten, wird in der vorliegenden Untersuchung der zweite QTL in Kopplung mit dem *CYP11B1*-Gen dargestellt, das im physischen Kontext distal zum *DGATI*-Gen kartiert. Die *in silico* physische Kartierung in [Abbildung 4.15c](#) zeigt die Anordnung der Marker innerhalb der weiteren QTL-Region und ihre physische Ausdehnung am centromerischen Ende von *BTA14*, nach dem NCBI Btau-Build 4.0. Wie berichtet, kartieren mehrere QTL für Milchfettgehalt und Milchfettmenge in diese QTL-Region (Khatkar *et al.* 2004). Während jedoch, wie von Khatkar *et al.* (2004) berichtet, die genetische Kartierungsposition von 0,1 cM mit der Position von *DGATI* zusammenfällt, weist die Kartierungsposition von 1,4 cM auf eine mehr distale Position, in etwa 1,5 Mb Entfernung hin.

In der Absicht, in der weiteren QTL-Region mehrere Marker auf Kopplungsungleichgewicht mit Milchleistungsmerkmalen zu untersuchen, wurde für die vorliegende Untersuchung eine Multiple Regression in Form eines Stepwise-Verfahrens durchgeführt. Die Vorgehensweise einer Multiplen Regression in additiven Schritten mit der STEPWISE PROCEDURE der SAS-Statistic-Suite (SAS Institute, 2000) verfolgte zwei Ziele. Zum Einen sollte die postulierte Möglichkeit eines zweiten QTL assoziiert mit dem *CYP11B1*-Gen überprüft werden und darüber hinaus in einem alternativen Ansatz eine Eingrenzung der QTL anhand einer Gewichtung der relativen Bedeutung weiterer Marker vorgenommen werden, indem die Marker in der Reihenfolge ihrer physischen Position auf dem Chromosom in das Modell aufgenommen werden sollten. Diese Vorgehensweise führte zu

drei unterschiedlichen Regressionsmodellen als Kalkulationsansatz. Hierfür wurden drei Gruppen mit progressiver Markeranzahl gebildet und nur die letzte Gruppe enthielt alle Marker.

In allen drei Variationen der Regressionsmodelle waren die P-Werte der Milchleistungsmerkmale (außer Modell 2 für Milch kg) für das *DGATI*-Gen immer höchst signifikant. Obwohl das *CYP11B1*-Gen in den ersten beiden Modellen P-Werte von höchst signifikant für Fettprozent über hoch signifikant für Milchmenge und Proteingehalt bis signifikant für Proteinmenge und SCS zeigte, verlor es seinen kompletten Informationsgehalt im dritten Modell, sobald Allele der Mikrosatellitenmarker *ILSTS039* und *CSSM066* in das Modell aufgenommen wurden. Ebenso veränderte sich der Informationsgehalt der *GML* Markerallele über die Entwicklung der Modelle. Während *GML*⁺⁴⁰⁵ in den beiden ersten Modellen zur Erklärlichkeit beitragen konnte (signifikant für Fettgehalt und Proteingehalt), jedoch anschließend die Auswahl verlassen musste, behielt *GML*⁺⁵⁷³ seine Informativität (signifikant für Fettmenge), trotz der Aufnahme der Mikrosatelliten Markerallele. Zusätzlich konnte im 3. Modell *GML*⁺⁵⁷³ für Variation im Merkmal SCS signifikante Erklärlichkeit liefern. Der EST Marker *KIEL_E8* zeigte Signifikanz lediglich für das Merkmal Fettmenge. Jedoch auch hier entfiel jeglicher Informationsgehalt, durch die Hinzunahme der Allele der Mikrosatellitenmarker in das Modell.

Mikrosatellitenmarker *ILSTS039* Allele differieren nicht in Anzahl, aber in Größe zwischen der israelischen (*ILSTS039*²²⁵⁻²³⁹, Weller *et al.* 2003) und deutschen (*ILSTS039*²¹⁷⁻²³¹) Holstein Population. In der israelischen Studie (*ILSTS039*²²⁵⁻²³⁹) von Weller *et al.* (2003) war das kleinste von acht MS Allelen (225 bp) assoziiert mit erhöhten Fettprozenten, wohingegen in der vorliegenden Untersuchung (*ILSTS039*²¹⁷⁻²³¹) das zweitkleinste von 8 MS Allelen (219) einen hoch signifikanten Wert für das Merkmal Fettprozent ergab, sodass diese Unterschiede nicht auf unterschiedlich große PCR-Amplifikate zurückgeführt werden können. Diese Tatsache legt nahe, dass in israelisches Holstein nicht die gleichen *ILSTS039* Allele segregieren wie in Dt. Holsteins. Die Allelfrequenzen des MS *ILSTS039*²¹⁷⁻²³¹ waren in der vorliegenden Untersuchung sehr zu Gunsten von Allel 219 (0,624) und Allel 225 (0,262) verschoben. Aufgrund dessen wurden beide Allele als getrennte Marker in die STEPWISE Regression aufgenommen. Allel *ILSTS039*²¹⁹ zeigte hoch signifikante Werte für Merkmale Milchmenge, Proteinmenge, Fettprozent und SCS, sowie signifikante Werte für Proteinprozent. Allel *ILSTS039*²²⁵ zeigte einen signifikanten Wert für Fettprozent.

Ebenso sind bei MS *CSSM066*¹⁷⁸⁻²⁰² zwischen 13 Allelen die Frequenzen ungleich verteilt, und Allel *CSSM066*¹⁸⁶ (0.227), Allel *CSSM066*¹⁹⁰ (0,393) und Allel *CSSM066*¹⁹⁴ (0.157) besitzen gemeinsam eine Frequenz von ca. 78 %. Aus diesem Grunde wurden hier drei Allele als unabhängige Marker für die multiple Regression ausgewählt. Da die Auswahlprozedur des STEPWISE Regressionsprogramms die angebotenen Marker durch Aufnahme in das Modell bzw. Ausschluss aus dem Modell entsprechend ihrem Erklärlichkeitsbeitrag rangiert, wie in Kapitel 3.2.4.2 beschrieben, wurden letztlich von MS *CSSM066* nur zwei Allele (186, 194) im Modell behalten. Interessanter Weise wurde dabei jedoch das Allel mit der höchsten Frequenz in der Population (Allele 190, Frequenz 0,393) ausgeschlossen. Dieses Ergebnis ist aber nur erklärlich, wenn Allel 190, anders als Allele 186 und 194, nicht in Kopplung mit dem oder den QTL steht. Allel 186 besaß einen hoch signifikanten Wert für Proteinprozent und Allel 194 einen ebenso hoch signifikanten Wert bei Proteinprozent sowie signifikante Werte für Fettmenge und Fettprozent. Die Assoziation der *CSSM066* Allele mit den Milchleistungsmerkmalen scheint jedoch insgesamt schwächer zu sein als die der *ILSTS039* Allele und kommt anscheinend bei weiter distal kartierenden Markern (*TG*) gänzlich zum Erliegen (Khatib 2007). Dies spricht für weniger enge Kopplungsverhältnisse dieses Markers mit dem QTL.

Bei der Schätzung der $\alpha / 2$ -Werte besitzt nur noch *CSSM066*¹⁸⁶ einen signifikanten Wert für Proteinprozent. Demgegenüber besitzt *ILSTS039*²¹⁹ höchst signifikante Werte für Milchmenge, Proteinmenge und Fettprozent, sowie hoch signifikante Werte für Proteinprozent und SCS. Bei *CYP11B1*^V entfällt in Anwesenheit des *ILSTS039*²¹⁹ im Modell jegliche Assoziation mit Milchleistungsmerkmalen. Hieraus ließe sich ableiten, dass unter der Annahme der Marker-/Genanordnung des Btau-Build 3.1 ein weiterer QTL mit großer Wahrscheinlichkeit auf der distalen Seite und unter der Annahme der Marker-/Genanordnung des Btau-Build 4.0 auf der proximalen Seite von MS *ILSTS039* positioniert sein könnte. In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigte das Allel *ILSTS039*²¹⁹ neben den bereits beschriebenen Effekten auch einen signifikanten P-Wert für das Merkmal Zellzahl (SCS). Diese Signifikanz könnte auf Kopplungseffekte mit einerseits dem *PTK2*-Gen, ca. 1 Mb entfernt (Btau-Build 4.0), sowie dem *GML*-Gen (Genbank AY950682), in unmittelbarer Nähe (ca. 100 Kb), in Verbindung gebracht werden. Das *GML*-Gen gehört, wie das *PTK2*-Gen, zu einer Genfamilie mit Auswirkung auf Apoptosis (Nakamura *et al.* 2004) und wurde auch aus diesem Grund als Kandidatengen für Effekte bei SCS ausgewählt. Diese Annahme scheint mit den vorliegenden Ergebnissen zumindest tendenziell bestätigt zu werden.

Als ein aussichtsreiches Kandidatengen, sowohl hinsichtlich seiner chromosomalen Position als auch seiner physiologischen Einflussnahme auf den Organismus, kann das Gen Protein Tyrosin Kinase 2 (*PTK2*) angesehen werden, wie mit den folgenden Literaturstellen aufgezeigt werden soll. *PTK2* ist eine 'non-receptor' Tyrosine Kinase (Schlaepfer & Mitra 2004). Berichten zufolge besitzt *PTK2* gewebespezifische Funktionalität (Zachary 1997) und in der Literatur finden sich diverse Hinweise auf seine Eignung als Kandidatengen:

- Milchdrüsenentwicklung sowie Milchdrüsenfunktion benötigen Focal adhesion kinase (*FAK* alias *PTK2*) als Mediator zur Integrin-Signalisation (Li *et al.* 2005, Nagy *et al.* 2007).

- Post translationelle Regulation von *DGATI* erfolgt durch eine Tyrosin Kinase (Haagsman *et al.* 1982, Lau *et al.* 1996) und / oder eine Protein Kinase (Rohlf's *et al.* 1993), obwohl keine funktionellen Auswirkungen auf *DGATI* Aktivität beobachtet werden konnte, wenn die konservierte Tyrosin-Phosphorylierungsstelle im humanen *DGATI*-Gen durch einen SNP mutiert war (Yu *et al.* 2002).

- Auswirkungen des *FAK (PTK2)*-Gens auf Apoptosis und Involution des Milchdrüsenepithels wurden beschrieben (De la Cruz *et al.* 2004, McMahon *et al.* 2004, Li *et al.* 2005). Demnach kommuniziert kontinuierlich eine Phosphorylierung von *FAK* das Überlebenssignal an die Zellen des Milchdrüsenorgans, sodass bei Ausbleiben des Signals unverzüglich Apoptosis ausgelöst wird (Frisch *et al.* 1996, Xu *et al.* 2000).

- Nach neueren Berichten wird *FAK (PTK2)* auch mit Funktionen im Energiemetabolismus (Huang *et al.* 2002, 2006) und mit Insulinresistenz (Bisht *et al.* 2008) in Verbindung gebracht. In Mäusen sind *FAK (PTK2)* defiziente (-/-) Linien bereits embryonal nicht lebensfähig (Zachary 1997). Durch 'gene silencing' Techniken (iRNA) in adulten Tieren kann experimentell die Genexpression von *FAK (PTK2)* signifikant reduziert und hierdurch eine Insulinresistenz ausgelöst werden. Bislang wurden als Ursachen von Insulinresistenz bei Kühen mit Leberinsuffizienz in erster Linie der erhöhte Glucokortikoidspiegel und/oder stark reduzierte Insulin-like growth factor 1 (IGF1) Plasmakonzentrationen in Betracht gezogen (Vernon and Finley 1986, Hussain *et al.* 1994). Die wichtigsten Auswirkungen der Leberverfettung auf den Gesundheitszustand von Milchkühen sind neben einer reduzierten Gluconeogeneserate (Cadornica-Valino *et al.* 1997) die verringerten Abbauraten sowohl von Endotoxinen als auch von Hormonen (Rukkwamsuk *et al.* 1999).

• Im Jahr 2007 publizierten de Roos *et al.* eine vergleichende Studie über Zuchtwertschätzung für Fettprozentage unter der Verwendung eines dichten Marker Sets auf BTA14. Verglichen wurden die Genauigkeiten der Zuchtwerte, geschätzt mit 'Genomic Selection', 'Gene assisted Selection' und BLUP, mit den offiziellen nationalen Zuchtwerten, die zum Zeitpunkt der Untersuchung für die Holstein Population der Niederlande und Flandern veröffentlicht waren. Die überragend höchste QTL Wahrscheinlichkeit nach Schätzung (average posterior QTL probability) entfiel auf Markerkombination 23, die nach dem in dieser Untersuchung verwendeten BTAU-Build 3.1 exakt mit der physischen Position von *PTK2* übereinstimmt.

Cytochrome c-1 (*CYCI*) verkörpert ein weiteres aussichtsreiches Kandidatengen aus der engeren QTL Region und liegt ca. 130 Kb distal von *DGATI* (Btau-Build 4.0). Es wird in der Literatur im Zusammenhang mit apoptotischer Geweberegulation beschrieben (Zhao *et al.* 2003, Cance & Golubovskaya 2008). Eine erfolgreiche Laktation hängt aber nicht nur von einem kontrollierten Prozess der Zellproliferation und von Milchdrüsenwachstum während der Trächtigkeit, sondern ebenso von einem regulierten Zelltod während der Involution ab (Zarzynska & Motyl 2008). Durch die Freisetzung von Cytochrome-c aus dem Mitochondrium in das Zytoplasma wird programmierter Zelltod ausgelöst (Zhao *et al.* 2003). *CYCI* kann unter derartigen Gesichtspunkten ebenso als ein positionales, wie auch physiologisches Kandidatengen angesehen werden.

6 Zusammenfassung

Literaturübersicht: Anhand einer Zusammenstellung ausgewählter Literatur wird ein Überblick über Entwicklung und Methode der Genomanalyse gegeben. Damit wird ebenso der gedankliche Weg nachvollzogen, der zur Erstellung dieser genomanalytischen Arbeit beschritten wurde. Hierbei kann Information über die Struktur und Plastizität des Genoms ebenso wie seine Entwicklung als ein Ausgangspunkt gewertet werden und molekulare Marker als Hilfsmittel und Wegmarkierungen, um in der Komplexität des Genoms eine Orientierung zu gewährleisten. Literatur über positionale Klonierung gibt einen Überblick über die methodische Verfahrensweise der Genomanalyse bis auf molekulare Ebene. Der Abschnitt QTL-Analyse stellt dar, wie Auswertung und Erkenntnisse der Genomanalyse in einen ökonomischen Zusammenhang gebracht werden, ohne den eine sinnvolle Zuchtauslese bei landwirtschaftlichen Nutztieren nicht möglich erscheint. Abschließend beleuchtet eine Auswertung von Veröffentlichungen über markergestützte Selektion und markergestützte Introgression Möglichkeiten der Anwendung von Ergebnissen aus der Genomanalyse in der Nutztierzucht.

Material & Methode: Der zentrale Untersuchungsgegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Rinder-DNA-Sammlung der Rassen Dt. Holstein und Dt. Fleckvieh der Arbeitsgemeinschaft Deutscher Rinderzüchter (ADR), Bonn, in der organisatorischen Form eines 'Great-Granddaughter Design'. Die Rinder-DNA-Sammlung des Instituts für Tierzucht & Haustiergenetik, JLU Giessen, in der organisatorischen Form des Familienmaterials der Rassen Dt. Angus und Dt. Fleckvieh konnte zum Etablieren und Überprüfen der Genotypisierungssysteme genutzt werden, ebenso wie diverse Rinder DNA. Eine Zusammenstellung aus 3442 DNA-Proben von 42 internationalen Rinderrassen wurde in einer separaten Untersuchungsreihe bearbeitet. Alle weiteren in dieser Arbeit verwendeten Materialien wurden von Zulieferfirmen bezogen oder stammten aus den Grundausrüstungen der Labore. Im Kapitel Material & Methoden aufgeführte Geräte und Chemikalien beziehen sich auf die Ausstattung der Tierzuchtinstitute der Justus-Liebig-Universität Giessen und der Technischen Universität München.

Ergebnisse: Die Ergebnisse umfassen die molekulargenetischen Untersuchungsergebnisse der Laborarbeiten mit ihren statistischen Auswertungen.

Sie schließen ein, die Genotypisierung und genetische Charakterisierung von 37 *Bos taurus* und 4 *Bos indicus*, internationalen Rinderrassen sowie einer *Bos indicus/Bos taurus*

Hybridrasse, mit dem K232A Polymorphismus des *DGATI*-Gens. Diese Untersuchungen erfolgten unter besonderer Berücksichtigung von Rassen aus dem Domestikationsgebiet von *Bos taurus*, sowie DNA unterschiedlicher Vererberlinien aus der DNA-Genreserve 'Altes Deutsches Schwarzbuntes Niederungsrind' des Instituts für Tierzucht & Haustiergenetik Giessen, im Hinblick auf Domestikation und Rassendifferenzierung beim Milch- und Fleischrind. Darüber hinaus beinhalten die Ergebnisse:

- ◆ Zur Komplettssequenzierung weiterbearbeitbare und durch Ansequenzierung und *in silico* Kartierung definierte BAC-Klone der proximalen Region von *BTA14* aus zwei unterschiedlichen BAC-Banken (Zhu *et al.* 1999, Buitkamp *et al.* 2000).
- ◆ Physische Kartierung des Gens *CYP11B1* und eines *CYHR1*-Paralogons auf *BTA14* durch Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung.
- ◆ Genetische Kartierung der Gene *DGATI*, *CYP11B1* und *GML*, sowie der Mikrosatelliten *ILSTS039* und *CSSM066* im ADR-Familienmaterial (separat für Holstein- und Fleckviehrinder).
- ◆ Etablierung eines Verfahrens der Differenzierung zwischen dem kodierenden Gen *CYP11B1* und zwei *CYP11B1*-Pseudogenen (*CYP11B1P1*, *CYP11B1P2*), zum Nutzen verlässlicher differenzieller PCR-Amplifizierung und Genotypisierung.
- ◆ Genotypisierungen des ADR-Familienmaterials (Dt. Holstein & Dt. Fleckvieh) mit den Polymorphismen A30V im *CYP11B1*-Gen (2 Allele) und K232A im *DGATI*-Gen (2 Allele), sowie der Auswertung der Daten durch lineare Regression.
- ◆ Genotypisierungen des ADR-Familienmaterials (Dt. Holstein & Dt. Fleckvieh) mit SNP *GML*⁺⁴⁰⁵ und *GML*⁺⁵⁷³, unter Einbeziehung vorhandener Genotypisierungen mit dem SSCP-Marker *KIEL_E8* und den Mikrosatellitenmarkern *ILSTS039* (2 Allele), *CSSM066* (3 Allele) und der Auswertung aller Genotypisierungsdaten mit Hilfe eines 'stepwise' Regressionsverfahrens.
- ◆ Lokalisierung und Charakterisierung weiterer Kandidatengene (*PTK2*, *CYCI*).

Diskussion: Das Kapitel 'Diskussion' strukturiert sich analog dem chronologischen Ablauf der Arbeiten und den sich daraus entwickelnden Ergebnissen und Auswertungen.

Im ersten Teil dieses Kapitels wird im Wesentlichen der bereits publizierte Teil der Diskussion der Ergebnisse behandelt. Hierbei wird auf der Grundlage der Untersuchungsergebnisse des K232A Polymorphismus im *DGATI*-Gen in einer Vielzahl internationaler Rinderrassen in einem entwicklungsgeschichtlichen Zusammenhang die Entstehung und

Verbreitung in der Spezies *Bos* im Allgemeinen und in der Holstein Rinderrasse im Speziellen diskutiert. Der zuchttechnische Wert dieses Polymorphismus wird beleuchtet. Dem schließt sich die Diskussion der Ergebnisse der Genotypisierung des A30V Polymorphismus im *CYP11B1*-Gen mit seinen Auswertungen im Hinblick auf Milchproduktions-, Fruchtbarkeits-, Exterieur- und Nachhaltigkeitsparameter an.

Der Diskussion der veröffentlichten Ergebnisse schließt sich eine erweiterte und vertiefende Diskussion der QTL-Feinkartierung unter der Einbeziehung der Typisierungsergebnisse an, die nach der Bearbeitung des *CYP11B1*-Gens am ADR-Familienmaterial generiert werden konnten. Während den Untersuchungen der genetischen Variation im centromerischen Bereich von *BTA14* in Form einer Beteiligung des A30V Polymorphismus im *CYP11B1*-Gens an der gesamten QTL Wirkung noch eine alleinige lineare Abhängigkeit unterstellt war, so wurde im weiteren Verlauf der Untersuchungen klar, dass die, neben der durch den K232A Polymorphismus im *DGATI*-Gen erklärbare, noch feststellbare Restvarianz einer komplexeren Dynamik unterworfen zu sein scheint. Weitere Genotypisierungsdaten neu gefundener polymorpher Loci in der chromosomalen Nähe des *CYP11B1*-Gens gemeinsam mit nutzbaren Informationen von Genotypisierungen aus Datenbeständen der ersten Phase des Forschungsvorhabens führten zu Überlegungen der Rangierung der nun vorhandenen Marker anhand eines Tests auf bestmögliche Eignung für die Erklärlichkeit der Restvarianz in der QTL-Region. Im vertiefenden Teil der Diskussion wird die Vorgehensweise einer 'stepwise Regression' unter Verwendung aller zur Verfügung stehenden Genotypisierungsinformation diskutiert. Hierbei wird darauf eingegangen, dass einige der Marker ihre komplette Informativität verlieren, sobald andere Marker in das Regressionsmodell aufgenommen und berücksichtigt werden. Da die diskutierten Ergebnisse der Arbeit die Restvarianz in der QTL-Region nicht komplett erklären können, wird abschließend die Möglichkeit der Existenz weiterer Kandidatengene im Bereich, durch Literaturrecherche gestützt, aufgezeigt.

7 Summary

Review of Literature: Based on a compilation of selected literature, an overview of development and methods of genome analysis is provided. Thereby the intellectual pathway is traced that had to be pursued to accomplish this genome-analytical work. In this way information on the structure and plasticity of the genome as well as its evolutionary development may be understood as a starting point and molecular markers as tools and signposts to ensure orientation in the complexity of the genome. Literature on positional cloning provides an overview of the methodological procedure of genome analysis onto the molecular level. The section on QTL analysis presents, how the analysis and findings of genome analysis are brought into an economic context, without which a meaningful breeding selection in farm animals does not seem possible. Finally, an evaluation of publications on marker-assisted selection and marker-assisted introgression is meant to shed light on possibilities of the application of genome analytical results in livestock breeding.

Material & Methods: The central object of study of this thesis was the bovine DNA library of German Holstein and German Fleckvieh cattle breeds of the Syndicate of German Cattle Breeders (ADR), Bonn, Germany, in the organizational form of a 'Great-Granddaughter Design'. The bovine DNA library of the Institute of Animal Breeding & Animal Genetics, JLU Giessen, in the organizational form of a family design of German Angus and German Fleckvieh cattle breeds was employed to establish and verify the genotyping systems, as well as several anonymous bovine DNA. A collection of 3442 DNA samples from 42 international breeds of cattle was handled in a separate series of investigations. All other materials used in this work were purchased from suppliers or derived from the basic equipment of the laboratories. In chapter Material & Methods equipment listed refer to the equipment of Animal Breeding Institutes of the Justus-Liebig University in Giessen and the Technical University of Munich.

Results: The results presented herein include findings of the molecular genetic investigations and their statistical data analysis. They cover the genotyping and genetic characterization with the K232A polymorphism in the *DGAT1* gene, of 37 *Bos taurus* and 4 *Bos indicus* breeds of cattle and one *Bos indicus* / *Bos taurus* hybrid breed. This research was carried out with special attention to the domestication region of *Bos taurus*, and DNA of different progenitor lines from the DNA gene reserve 'Old German Black Pied Lowland

Cattle' of the Institute of Animal Breeding and Genetics, JLU Giessen, in view of domestication and breed differentiation in dairy and beef cattle. Furthermore results include:

- ◆ for complete sequencing prepared and by end-sequencing *in silico* mapped BAC clones of the proximal region of *BTA14* from two different BAC libraries (Zhu *et al.* 1999, Buitkamp *et al.* 2000).
- ◆ Physical mapping of the gene *CYP11B1* and a *CYHR1* paralogon on *BTA14* by fluorescence *in situ* hybridization.
- ◆ Genetic mapping of the genes *DGATI*, *CYP11B1* and *GML*, and the microsatellites *ILSTS039* and *CSSM066* in the ADR family material, separately for German Holstein and German Fleckvieh cattle.
- ◆ Establishment of a procedure for the differentiation between the coding *CYP11B1* gene and two *CYP11B1* pseudogenes (*CYP11B1P1*, *CYP11B1P2*) on the molecular level, for the benefit of reliable differential PCR amplification and genotyping.
- ◆ Genotyping of the ADR Great-Granddaughter Design (German Holstein and German Fleckvieh) with the A30V polymorphism in the *CYP11B1* gene (2 alleles) and the K232A polymorphism in the *DGATI* gene (2 alleles), followed by an analysis of the data by linear regression.
- ◆ Genotyping of the ADR Great-Granddaughter Design (German Holstein and German Fleckvieh) with *GML*⁺⁴⁰⁵ and *GML*⁺⁵⁷³ SNPs, taking into account existing genotyping with SSCP marker *KIEL_E8* and microsatellite markers *ILSTS039* (2 alleles), *CSSM066* (3 alleles), followed by an analysis of all genotyping data using a 'stepwise' regression procedure.
- ◆ Localization and characterization of further candidate genes (*PTK2*, *CYCI*).

Discussion: The chapter 'discussion' is structured along the lines of the chronological development of this work and the concomitant emerging results and evaluations.

In the first part of the chapter quintessentially contents dealing with already published results are being discussed. Those are based on the findings of genetic variation by the K232A polymorphism in the *DGATI* gene, in a number of international cattle breeds. The evolutionary context, the emergence and spread of the polymorphism in the *Bos* species in general and in the Holstein cattle breed in particular is discussed. The breeding value of this polymorphism is illuminated. The discussion then moves on to the results of the

genotyping of the A30V polymorphism in the *CYP11B1* gene and the evaluation of implications on milk production, fertility, conformation and sustainability parameters.

The discussion of published results is followed by a broader and deeper discussion of QTL fine mapping inclusive of the genotyping data that had been generated after the investigation of the *CYP11B1* gene in the ADR Great-Granddaughter-Design. While, during investigations of genetic variation in the centromeric region of *BTA14* in form of a participation of the A30V polymorphism in the *CYP11B1* gene, still a sole linear dependence was assumed, it was later realized, that the residual variance, in addition to the variation explained by the K232A polymorphism in the *DGATI* gene, the detectable residual variance was subject to a more complex setting. Additional genotyping data of newly found polymorphic loci in the chromosomal vicinity of the *CYP11B1* gene, together with exploitable information of genotyping data sets from the first phase of the research project (ADR I) led to considerations of ranking the markers now in place, on the basis of a test for best fit for informativity of the residual variance in the QTL region. In the in-depth part of the discussion, the approach of a stepwise regression is discussed, taking all available genotypic information into account. The fact is discussed that some of the markers lose their entire information content when other markers are included into the regression model. Since the discussed results of this work fall short of completely explaining the residual variance in the QTL region, finally the possibility of the existence of further candidate genes in the area, in agreement with literature, is considered.

8 Literatur

- Achilli A, Bonfiglio S, Olivieri A, Malusà A, Pala M, Kashani BH, Perego UA, Ajmone-Marsan P, Liotta L, Semino O, Bandelt HJ, Ferretti L, and Torroni A: The multifaceted origin of taurine cattle reflected by the mitochondrial genome. *PLoS One* (2009) 4(6):e5753
- Adams SN: Sheep and cattle grazing in forests: a review. *Journal of Applied Ecology* (1975) 12, 143-152
- Aerts J, Wetzels Y, Cohen N, and Aerssens J: Data mining of public SNP databases for the selection of intragenic SNPs. *Human Mutation* (2002) 20, 162-173
- Agerholm JS, Bendixen C, Andersen O, and Arnbjerg J: Complex vertebral malformation in holstein calves. *Journal of Veterinary Diagnosis and Investigation* (2001) 13, 283-289
- Agris PF: Decoding the genome: a modified view. *Nucleic Acids Research* (2004) 32, 223-238
- Ajmone-Marsan P, Valentini A, Cassandro M, Vecchiotti-Antaldi G, Bertoni G, Kuiper M: AFLP markers for DNA fingerprinting in cattle. *Animal Genetics* (1997) 28, 418-426
- Aleyasin A and Barendse W: Comparative mapping of genes from human chromosome 12 by genetic linkage mapping in cattle. *Journal of Heredity* (1999) 90, 537-542
- Allen AR, Taylor M, McKeown B, Curry AI, Lavery JF, Mitchell A, Hartshorne D, Fries R, and Skuce RA. Compilation of a panel of informative single nucleotide polymorphisms for bovine identification in the Northern Irish cattle population. *BMC Genetics* (2010)11,5
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, and Lipman DJ: Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* (1997) 25, 3389-3402
- Amarger V, Gauguier D, Yerle M, Apiou F, Pinton P, Giraudeau F, Monfouilloux S, Lathrop M, Dutrillaux B, Buard J, and Vergnaud G: Analysis of distribution in the human, pig, and rat genomes points toward a general subtelomeric origin of minisatellite structures. *Genomics* (1998) 15, 62-71
- Amills M and Bouzat JL: Characterization of the bovine BCL2L1 gene and related pseudogenes. *Animal Genetics* (2003) 34, 457-461
- Amos W, Sawcer SJ, Feakes RW, and Rubinsztein DC: Microsatellites show mutational bias and heterozygote instability. *Nature Genetics* (1996) 13, 390-391
- Andersson L, Archibald A, Ashburner M, Audun S, Barendse W, Bitgood J, Bottema C, Broad T, Brown S, Burt D, Charlier C, Copeland N, Davis S, Davisson M, Edwards J, Eggen A, Elgar G, Eppig JT, Franklin I, Grewe P, Gill T 3rd, Graves JA, Hawken R, Hetzel J, and Womack J: Comparative genome organization of vertebrates. *The First International Workshop on Comparative Genome Organization. Mammalian Genome* (1996) 7, 717-734
- Archibald AL, Couperwhite S, Haley CS, Beattie CW, and Alexander LJ: RFLP and linkage analysis of the porcine casein loci--CASAS1, CASAS2, CASB and CASK. *Animal Genetics* (1994) 25, 349-351
- Arias JA, Keehan M, Fisher P, Coppieters W, and Spelman R: A high density linkage map of the bovine genome. *BMC Genetics* (2009) 10:18
- Armour JAL, Alegre SA, Miles S, Williams LJ, and Badge RM: Minisatellites and mutation processes in tandemly repetitive DNA. In: *Microsatellites. Evolution and Applications* (Goldstein DB and Schlötterer C, eds.). Oxford University Press (1999), Oxford, UK
- Arranz JJ, Bayon Y, and San Primitivo F: Differentiation among Spanish sheep breeds using microsatellites. *Genetics Selection Evolution* (2001) 33, 529-542
- Asakawa S, Abe I, Kudoh Y, Kishi N, Wang Y, Kubota R, Kudoh J, Kawasaki K, Minoshima S, Shimizu N: Human BAC library: construction and rapid screening. *Gene* (1997) 191, 69-79
- Ashwell MS, Rexroad C, Miller R, and van Raden PM: Identification of Mastitis Quantitative Trait Loci in an existing Holstein Population. *Proceedings of the 25th Conference of the International Society of Animal Genetics (ISAG), Tours* (1996), *Animal Genetics* 27, 101 (E003)

- Ashwell MS, Da Y, Van Tassell CP, Vanraden PM, Miller RH, and Rexroad CE Jr: Detection of putative loci affecting milk production and composition, health, and type traits in a United States Holstein population. *Journal of Dairy Science* (1998) 81, 3309-3314
- Ashwell MS and van Tassell CP: Detection of Putative Loci Affecting Milk, Health, and Type Traits in a US Holstein Population Using 70 Microsatellite Markers in a Genome Scan. *Journal of Dairy Science* (1999) 82, 2497-2502
- Ashwell MS, Van Tassell CP, Sonstegard TS: A genome scan to identify quantitative trait loci affecting economically important traits in a US Holstein population. *Journal of Dairy Science* (2001) 84, 2535-2542
- Ashwell MS, Heyen DW, Sonstegard TS, Van Tassell CP, Da Y, VanRaden PM, Ron M, Weller JI, Lewin HA. Detection of quantitative trait loci affecting milk production, health, and reproductive traits in Holstein cattle. *Journal of Dairy Science* (2004) 87, 468-475
- Ayoubi P, Jin X, Leite S, Liu X, Martajaja J, Abduraham A, Wan Q, Yan W, Misawa E, and Prade RA: PipeOnline 2.0: automated EST processing and functional data sorting. *Nucleic Acids Research* (2002) 30, 4761-4769
- Bailey JA, Gu Z, Clark RA, Reinert K, Samonte RV, Schwartz S, Adams MD, Myers EW, Li PW, Eichler EE: Recent segmental duplications in the human genome. *Science* (2002) 297, 1003-1007
- Bairoch A and Apweiler R: The SWISS-PROT protein sequence database and its supplement TrEMBL in 2000. *Nucleic Acids Research* (2000) 28, 45-48
- Baker CA and Manwell C: Chemical classification of cattle. 1. Breed groups. *Animal Blood Groups and Biochemical Genetics* (1980) 11, 127
- Baker BS and Belote JM: Sex determination and dosage compensation in *Drosophila melanogaster*. *Annual Review in Genetics* (1983) 17, 345-393
- Baker ME: Evolution of adrenal and sex steroid action in vertebrates: a ligand-based mechanism for complexity. *Bioessays* (2003) 25, 396-400
- Baker ME: Unusual evolution of 11beta- and 17beta-hydroxysteroid and retinol dehydrogenases. *Bioessays* (1996) 18, 63-70
- Baker W, van den Broek A, Camon E, Hingamp P, Sterk P, Stoesser G, and Tuli MA: The EMBL nucleotide sequence database. *Nucleic Acids Research* (2000) 28, 19-23
- Band MR, Larson JH, Rebeiz M, Green CA, Heyen DW, Donovan J, Windish R, Steining C, Mahyuddin P, Womack JE, Lewin HA: An ordered comparative map of the cattle and human genomes. *Genome Research* (2000) 10, 1359-1368
- Banos G: A theoretical comparison between direct and indirect conversions of dairy bull evaluations. *Journal of Animal Breeding and Genetics* (1993) 110, 57-65
- Bansal A, van den Boom D, Kammerer S, Honisch C, Adam G, Cantor CR, Kleyn P, and Braun A: Association testing by DNA pooling: an effective initial screen. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* (2002) 99, 16871-16844
- Barendse W, Armitage SM, Kossarek LM, Shalom A, Kirkpatrick BW, Ryan AM, Clayton D, Li L, Neiberghs HL, Zhang N, Grosse WM, Weiss J, Creighton P, McCarthy F, Ron M, Teale AJ, Fries R, McGraw RA, More SS, Georges M, Soller M, Womack JE, and Hetzel DJS: A genetic linkage map of the bovine genome. *Nature Genetics* (1994) 6, 227-235
- Barendse W and Fries R: Genetic Linkage Mapping, the Gene Maps of Cattle and the Lists of Loci. In: Fries R and Ruvinsky A (eds): *The Genetics of Cattle*. CABI Publishing, Wallingford, Oxon, UK, (1999)
- Barendse W: Assessing lipid metabolism. Patent WO9923248 (2002)
- Barendse W, Vaiman D, Kemp SJ, Sugimoto Y, Armitage SM, Williams JL, Sun HS, Eggen A, Agaba M, Aleyasin SA, Band M, Bishop MD, Buitkamp J, Byrne K, Collins F, Cooper L, Coppieters W, Denys B, Drinkwater RD, Easterday K, Elduque C, Ennis S, Erhardt G, Ferreti L, Flavin N, Gao Q, Georges M, Gurung R, Harzilius B, Hawkins G, Hetzel J, Hirano T, Hulme D, Jorgensen C, Kessler M, Kirkpatrick BW, Konfortov B, Kostia S, Kuhn C, Lenstra JA, Leveziel H, Lewin HA, Leyhe B, Lil L, Martin Burriel I, McGraw RA, Miller JR, Moody DE, Moore SS, Nakane IJ, Nijman IJ, Olsaker I, Pomp D, Rando A, Ron M, Shalom A, Teale AJ, Thieven U, Urquhart BGD, Vage DI, Van de Weghe A, Varvio S, Velmala R, Vilkki J, Weikard R,

- Weikard R, Woodside C, Womack JE, Zanotti M, and Zaragoza P: A medium-density genetic linkage map of the bovine genome. *Mammalian Genome* (1997) 8, 21-28
- Barnes MA, Kazmer GW, Akers RM, and Pearson RE: Influence of selection for milk yield on endogenous hormones and metabolites in Holstein heifers and cows. *Journal of Animal Science* (1985) 60, 271-284
- Barnes WM: PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high fidelity from lambda bacteriophage templates. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* (1994) 91, 2216-2220
- Bassam BJ, Caetano-Anollés G, Gresshoff PM. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anales of Biochemistry* (1991) 196, 80-83. Erratum in: *Anales of Biochemistry* (1991) 198, 217
- Bateson W, Saunders ER, and Punnett RC: Experimental studies in the physiology of heredity. *Reports to the Evolution Committee of the Royal Society* (1905) 2, 1-55 and 80-99
- Baumung R, Cubric-Curik V, Schwend K, Achmann R, and Sölkner J: Genetic characterisation and breed assignment in Austrian sheep breeds using microsatellite marker information. *Journal of Animal Breeding and Genetics* (2006) 123(4), 265-271
- Beadle GW and Tatum EL: Genetic Control of Biochemical Reactions in *Neurospora* *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* (1941) 27, 499-506
- Beckmann JS and Soller M: Molecular Markers in the genetic improvement of farm animals. *Biotechnology* (1987) 5, 573
- Beja-Pereira A, Alexandrino P, Bessa I, Carretero Y, Dunner S, Ferrand N, Jordana J, Laloe D, Moazami-Goudarzi K, Sanchez A, and Canon J: Genetic characterization of southwestern European bovine breeds: a historical and biogeographical reassessment with a set of 16 microsatellites. *Journal of Heredity* (2003) 94, 243-250
- Bejerano G, Pheasant M, Makunin I, Stephen S, Kent WJ, Mattick JS, and Haussler D: Ultraconserved elements in the human genome. *Science* (2004) 304, 1321-1325
- Bellows RA, Short RE, Anderson DC, Knapp BW, and Pahnish OF: Cause and effect relationships associated with calving difficulty and calf birth weight. *Journal of Animal Science* (1971) 33, 407-415
- Belmont JW and Gibbs RA: Genome-wide linkage disequilibrium and haplotype maps. *American Journal of Pharmacogenomics* (2004) 4, 253-262
- Bengtsson BO: Rates of karyotype evolution in placental mammals. *Hereditas* (1980) 92,37-47
- Bennewitz J, Reinsch N, Paul S, Looft C, Kaupé B, Weimann C, Erhardt G, Thaller G, Kühn C, Schwerin M, Thomsen H, Reinhardt F, Reents R and Kalm E: The DGAT1 K232A Mutation Is Not Solely Responsible for the Milk Production Quantitative Trait Locus on the Bovine Chromosome 14. *Journal of Dairy Science* (2004) 87, 431-442
- Bennewitz J, Reinsch N, Grohs C, Leveziel H, Malafosse A, Thomsen H, Xu N, Looft C, Kuhn C, Brockmann GA, Schwerin M, Weimann C, Hiendleder S, Erhardt G, Medjugorac I, Russ I, Forster M, Brenig B, Reinhardt F, Reents R, Averdunk G, Blumel J, Boichard D, Kalm E: Combined analysis of data from two granddaughter designs: A simple strategy for QTL confirmation and increasing experimental power in dairy cattle. *Genetics Selection Evolution* (2003) 35, 319-338
- Benson DA, Boguski MS, Lipman DJ, Ostell J, Ouellette BF, Rapp BA, and Wheeler DL: GenBank. *Nucleic Acids Research* (1999) 27, 12-17
- Berthouly C, Leroy G, Nhu Van T, Hoang Thanh H, Bed'hom B, Trong Nguyen B, Vu Chi C, Monicat F, Tixier-Boichard M, Verrier E, Maillard JC, and Rognon X: Genetic analysis of local Vietnamese chickens provides evidence of gene flow between domestic and wild populations. *BMC Genetics* (2009) 10, 1
- Bhathena SJ: Relationship between fatty acids and the endocrine system. *BioFactors* (2000) 13, 35-39
- Bickeböller H & Fischer C: Einführung in die Genetische Epidemiologie. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, (2007)
- Bihoreau MT, Sebag-Montefiore L, Godfrey R F, Wallis R H, Brown J H, Danoy PA, Collins S C, Rouard M, Kaisaki P J, Lathrop M, and Gauguier D: A high-resolution consensus

- linkage map of the rat, integrating radiation hybrid and genetic maps. *Genomics* (2001) 75, 57-69
- Bilmstrom JA, Valberg SJ, Bernoco D, and McKelson JR: Genetic test for myophosphorylase deficiency in Charolaise cattle. *American Journal for Veterinary Research* (1998) 59, 267-270.
- Bina M, Young J, and Pares-Matos EI: A conceptual scale for correlating cytogenetic and physical maps. *Cytogenetics Genome Research* (2002) 97, 136-139
- Biola O, Angel JM, Avner P, Bachmanov AA, Belknap JK, Bennett B, Blankenhorn EP, Blizard DA, Bolivar V, Brockmann GA, Buck KJ, Bureau JF, Casley WL, Chesler EJ, Cheverud JM, Churchill GA, Cook M, Crabbe JC, Crusio WE, Darvasi A, de Haan G, Dermant P, Doerge RW, Elliot RW, Farber CR, Flaherty L, Flint J, Gershenfeld H, Gibson JP, Gu J, Gu W, Himmelbauer H, Hitzemann R, Hsu HC, Hunter K, Iraqi FF, Jansen RC, Johnson TE, Jones BC, Kempermann G, Lammert F, Lu L, Manly KF, Matthews DB, Medrano JF, Mehrabian M, Mittlemann G, Mock BA, Mogil JS, Montagutelli X, Morahan G, Mountz JD, Nagase H, Nowakowski RS, O'Hara BF, Osadchuk AV, Paigen B, Palmer AA, Peirce JL, Pomp D, Rosemann M, Rosen GD, Schalkwyk LC, Seltzer Z, Settle S, Shimomura K, Shou S, Sikela JM, Siracusa LD, Spearow JL, Teuscher C, Threadgill DW, Toth LA, Toyee AA, Vadasz C, Van Zant G, Wakeland E, Williams RW, Zhang HG, and Zou F: The nature and identification of quantitative trait loci: a community's view. *Nature Review Genetics* (2003) 4, 911-916
CORPORATE NAME: Complex Trait Consortium
- Bishop MD, Kappes SM, Keele JW, Stone RT, Sunden SL, Hawkins GA, Solinas-Toldo S, Fries R, Grosz MD, Yoo J, and Beattie CW: A genetic linkage map for cattle. *Genetics* (1994) 136, 619-639
- Bisht B, Srinivasan K, and Dey CS: In vivo inhibition of focal adhesion kinase causes insulin resistance. *Journal of Physiology* (2008) 586, 3825-3837
- Blattner FR, Plunkett G 3rd, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF, Gregor J, Davis NW, Kirkpatrick HA, Goeden MA, Rose DJ, Mau B, and Shao Y: The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* (1997) 277, 1453-1474
- Blazej RG, Paegel BM, and Mathies RA: Polymorphism ratio sequencing: a new approach for single nucleotide polymorphism discovery and genotyping. *Genome Research* (2003) 13, 287-293
- Blott SC, Boursnell M, Hill G, Pettitt L, Binns MM, Vaudin M, and Swinburne JE: Whole Genome Linkage Disequilibrium in the Thoroughbred Horse. *Proceedings of the Plant and Animal Genome XV Conference (P591: Equine)*, San Diego, CA, USA (2007)
- Boguski MS, Lowe TM, and Tolstoshev CM: dbEST - database for expressed sequence tags. *Nature Genetics* (1993) 4, 332-333
- Bois P, Stead JD, Bakshi S, Williamson J, Neumann R, Moghadaszadeh B, Jeffreys AJ: Isolation and characterization of mouse minisatellites. *Genomics* (1998) 50, 317-330
- Boichard D, Grohs C, Bourgeois F, Cerqueira F, Faugeras R, Neau A, Rupp R, Amigues Y, Boscher AY, and Levéziel H: Detection of genes influencing economic traits in three French dairy cattle breeds. *Genetic Selection Evolution* (2003) 35, 77-101
- Boichard D, Barbat A, Briend M: Evaluation génétique des caractères de fertilité femelle chez les bovins laitiers. *Rencontres autour des recherches sur les ruminants N°5*, Paris , (1998), N° 5, 103-106
- Boisgard R, Chanut E, Laviolle F, Pauloin A, and Ollivier-Bousquet M: Roads taken by milk proteins in mammary epithelial cells. *Livestock Production Science* (2000) 70, 49-61
- Bollongino R, Elsner J, Vigne JD, and Burger J: Y-SNPs do not indicate hybridization between European aurochs and domestic cattle. *PLoS one* (2008) 3, 33418
- Bonczek RR, Richardson DO, Moore ED, Miller RH, Owen JR, Dowlen HH, and Bell BR: Correlated response in growth and body measurements accompanying selection for milk yield in Jerseys. *Journal of Dairy Science* (1992) 75, 307-316
- Boon WC, Roche PJ, Butkus A, McDougall JG, Jeyaseelan K, Coghlan JP: Functional and expression analysis of ovine steroid 11 beta-hydroxylase (cytochrome P450 11 beta). *Endocrinological Research* (1997) 23, 325-347

- Botstein D, White RL, Skolnick M, and Davis RW: Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* (1980) 32, 314-331
- Bovenhuis H and Schrooten C: Quantitative trait loci for milk production traits in dairy cattle. *Proceedings of the 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, (2002), Montpellier, France
- Bovenhuis H, van Arendonk JAM, Davis G, Elsen JM, Haley CS, Hill WG, Baret PV, Hetzel DJS, and Nicholas FW: Detection and mapping of quantitative trait loci in farm animals. *Livestock Production Science* (1997) 52, 135-144
- Bovine Genome Sequencing and Analysis Consortium, Elsik CG, Tellam RL, Worley KC, Gibbs RA, Muzny DM, Weinstock GM, Adelson DL, Eichler EE, Elnitski L, GuigóR, Hamernik DL, Kappes SM, Lewin HA, Lynn DJ, Nicholas FW, Reymond A, Rijnkels M, Skow LC, Zdobnov EM, Schook L, Womack J, Alioto T, Antonarakis SE, Astashyn A, Chapple CE, Chen HC, Chrast J, Câmara F, Ermolaeva O, Henrichsen CN, Hlavina W, Kapustin Y, Kiryutin B, Kitts P, Kokocinski F, Landrum M, Maglott D, Pruitt K, Sapojnikov V, Searle SM, Solovyev V, Souvorov A, Ucla C, Wyss C, Anzola JM, Gerlach D, Elhaik E, Graur D, Reese JT, Edgar RC, McEwan JC, Payne GM, Raison JM, Junier T, Kriventseva EV, Eyraas E, Plass M, Donthu R, Larkin DM, Reecy J, Yang MQ, Chen L, Cheng Z, Chitko-McKown CG, Liu GE, Matukumalli LK, Song J, Zhu B, Bradley DG, Brinkman FS, Lau LP, Whiteside MD, Walker A, Wheeler TT, Casey T, German JB, Lemay DG, Maqbool NJ, Molenaar AJ, Seo S, Stothard P, Baldwin CL, Baxter R, Brinkmeyer-Langford CL, Brown WC, Childers CP, Connelley T, Ellis SA, Fritz K, Glass EJ, Herzig CT, Iivanainen A, Lahmers KK, Bennett AK, Dickens CM, Gilbert JG, Hagen DE, Salih H, Aerts J, Caetano AR, Dalrymple B, Garcia JF, Gill CA, Hiendleder SG, Memili E, Spurlock D, Williams JL, Alexander L, Brownstein MJ, Guan L, Holt RA, Jones SJ, Marra MA, Moore R, Moore SS, Roberts A, Taniguchi M, Waterman RC, Chacko J, Chandrabose MM, Cree A, Dao MD, Dinh HH, Gabisi RA, Hines S, Hume J, Jhangiani SN, Joshi V, Kovar CL, Lewis LR, Liu YS, Lopez J, Morgan MB, Nguyen NB, Okwuonu GO, Ruiz SJ, Santibanez J, Wright RA, Buhay C, Ding Y, Dugan-Rocha S, Herdandez J, Holder M, Sabo A, Egan A, Goodell J, Wilczek-Boney K, Fowler GR, Hitchens ME, Lozado RJ, Moen C, Steffen D, Warren JT, Zhang J, Chiu R, Schein JE, Durbin KJ, Havlak P, Jiang H, Liu Y, Qin X, Ren Y, Shen Y, Song H, Bell SN, Davis C, Johnson AJ, Lee S, Nazareth LV, Patel BM, Pu LL, Vattathil S, Williams RL Jr, Curry S, Hamilton C, Sodergren E, Wheeler DA, Barris W, Bennett GL, Eggen A, Green RD, Harhay GP, Hobbs M, Jann O, Keele JW, Kent MP, Lien S, McKay SD, McWilliam S, Ratnakumar A, Schnabel RD, Smith T, Snelling WM, Sonstegard TS, Stone RT, Sugimoto Y, Takasuga A, Taylor JF, Van Tassell CP, Macneil MD, Abatepaulo AR, Abbey CA, Ahola V, Almeida IG, Amadio AF, Anatriello E, Bahadue SM, Biase FH, Boldt CR, Carroll JA, Carvalho WA, Cervelatti EP, Chacko E, Chapin JE, Cheng Y, Choi J, Colley AJ, de Campos TA, De Donato M, Santos IK, de Oliveira CJ, Deobald H, Devinoy E, Donohue KE, Dovic P, Eberlein A, Fitzsimmons CJ, Franzin AM, Garcia GR, Genini S, Gladney CJ, Grant JR, Greaser ML, Green JA, Hadsell DL, Hakimov HA, Halgren R, Harrow JL, Hart EA, Hastings N, Hernandez M, Hu ZL, Ingham A, Iso-Touru T, Jamis C, Jensen K, Kapetis D, Kerr T, Khalil SS, Khatib H, Kolbehdari D, Kumar CG, Kumar D, Leach R, Lee JC, Li C, Logan KM, Malinverni R, Marques E, Martin WF, Martins NF, Maruyama SR, Mazza R, McLean KL, Medrano JF, Moreno BT, Moré DD, Muntean CT, Nandakumar HP, Nogueira MF, Olsaker I, Pant SD, Panzitta F, Pastor RC, Poli MA, Poslusny N, Rachagani S, Ranganathan S, Razpet A, Riggs PK, Rincon G, Rodriguez-Osorio N, Rodriguez-Zas SL, Romero NE, Rosenwald A, Sando L, Schmutz SM, Shen L, Sherman L, Southey BR, Lutzow YS, Sweedler JV, Tammen I, Telugu BP, Urbanski JM, Utsunomiya YT, Verschoor CP, Waardenberg AJ, Wang Z, Ward R, Weikard R, Welsh TH Jr, White SN, Wilming LG, Wunderlich KR, Yang J, Zhao FQ. The genome sequence of taurine cattle: a window to ruminant biology and evolution. *Science* (2009) 324:522-588

- Bottema CD, Cerin H, Rizza S, Cook J, Webb GC, and Fowler CS: Isolation of repetitive DNA sequences from Cattle and Sheep. Proceedings of the 24th Conference of the International Society of Animal Genetics (ISAG), Prague (1994), *Animal Genetics* 25(2)
- B-Rao C: Sample Size Considerations in Genetic Polymorphism Studies. *Human Heredity* (2001) 52, 191-200
- Braunschweig M, Hagger C, Stranzinger G, and Puhan Z: Associations between casein haplotypes and milk production traits of Swiss Brown Cattle. *Journal of Dairy Science* (2000) 83, 1387-1395
- Breyne P, Dreesen R, Cannoot B, Rombaut D, Vandepoele K, Rombauts S, Vanderhaeghen R, Inze D, and Zabeau M: Quantitative cDNA-AFLP analysis for genome-wide expression studies. *Molecular Genetics and Genomics* (2003) 269, 173-179
- Bridges CB: Sex in relation to chromosomes and genes. *The American Naturalist* (1925) 59, 127-137
- Broad TE, Burkin DJ, Cambridge LM, Maher DW, Lewis PE, Ansari HA, Pearce PD, Jones C: Assignment of five loci from human chromosome 8q onto sheep chromosome 9. *Cytogenetics and Cell Genetics* (1995) 68, 102-106
- Brockmann GA and Bevova MR: Using mouse models to dissect the genetics of obesity. *Trends in Genetics* (2002) 18, 367-376
- Brodskii LI, Ivanov VV, Kalaidzidis IaL, Leontovich AM, Nikolaev VK, Feranchuk SI, and Drachev VA: GeneBee-NET: An Internet based server for biopolymer structure analysis. *Biokhimiia* (1995) 60, 1221-1230
- Brodsky LI, Drachev AL, Leontovich AM, Feranchuk SI: A novel method of multiple alignment of biopolymer sequences. *Biosystems* (1993) 30, 65-79
- Broman KW, Murray JC, Sheffield VC, White RL, and Weber JL: Comprehensive human genetic maps: Individual and sex-specific variation in recombination. *American Journal of Human Genetics* (1998) 63, 861-869
- Brubaker CL, Paterson AH, and Wendel JF: Comparative genetic mapping of allotetraploid cotton and its diploid progenitors. *Genome* (1999) 42, 184-203
- Bruckmann A, Hock C, Linke K, Hennies M, Schallenberger E: Alterations of growth hormone, cortisol, luteinizing hormone, and insulin concentrations in early-postnatal calves affected with diarrhea. *Domestic Animal Endocrinology* (2000) 18, 187-97
- Bruère AN, Chapman HM, Jaine PM, and Morris RM: Origin and significance of centric fusion in domestic sheep. *Journal of Heredity* (1976) 67, 149-154
- Bruford MW and Wayne RK: Microsatellites and their application to population genetic studies. *Current Opinion in Genetics and Development* (1993) 3, 939-943
- Bruford MW, Bradley DG, and Luikart G: DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. *Nature Review Genetics* (2003) 4, 900-910
- Brugmans B, van der Hulst RG, Visser RG, Lindhout P, and van Eck HJ: A new and versatile method for the successful conversion of AFLP markers into simple single locus markers. *Nucleic Acids Research* (2003) 31, e55
- Bülow HE, Bernhardt R: Analyses of the CYP11B gene family in the guinea pig suggest the existence of a primordial CYP11B gene with aldosterone synthase activity. *European Journal of Biochemistry* (2002) 269, 3838-3846
- Bülow HE, Möbius K, Bähr V, and Bernhardt R: Molecular Cloning and Functional Expression of the Cytochrome P450 11B-Hydroxylase of the Guinea Pig. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (1996) 221, 304-312
- Bünger A., Pasman E, Rensing S, Reinhardt F, and Reents R: Einfluss von Fundament und Eutergesundheit auf die Nutzungsdauer. (2002) [online: <http://www.vit.de/index.php?id=publikationen-zws&L=1Binary429/Nutzungsdauer.pdf>]
- Buard J and Vergnaud G: Complex recombination events at the hypermutable minisatellite CEB1 (D2S90). *EMBO Journal* (1994) 13, 3203-3210
- Buchanan FC, Thue TD, Winkelma-Sim DC, Plante Y, and Schmutz SM: Twi QTL for growth map to bovine chromosome 14. Proceedings of the 27th Conference of the International Society of Animal Genetics (ISAG), Mineapolis (2000), (B122)

- Buitkamp J, Ammer H, Geldermann H: DNA fingerprinting in domestic animals. *Electrophoresis* (1991) 12, 169-174
- Buitkamp J, Kollers S, Durstewitz G, Fries R, Welzel K, Schafer K, Kellermann A, Lehrach H: Construction and characterization of a gridded cattle BAC library. *Animal Genetics* (2000) 31, 347-351
- Bureik M, Lisurek M, Bernhardt R: The human steroid hydroxylases CYP1B1 and CYP11B2. *Biological Chemistry* (2002) 383, 1537-1551
- Burfening PJ, Kress DD, Friedrich RL, and Vaniman D: Calving ease and growth rate of Simmenthal-sired calves. I. Factors affecting calving ease and growth rate. *Journal of Animal Science* (1978) 46, 922-929
- Burguete I, Di Berardino D, Lioi MB, Taibi L, and Matassino D: Cytogenetic observations on a Robertsonian translocation in Saanen goats. *Genetics Selection Evolution* (1987) 19, 391-398
- Burnside EB, Pan Y, Jansen GB, Plante Y, Vandervoort GE, and Petitclerc D: Confirmation of QTL for protein yield and mammary systems in a large half-sib family of Holsteins. *Proceedings of the 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, (2002), Montpellier, France
- Burt DW: Chromosome Rearrangement in Evolution. *Encyclopedia of Life Science* (2002), 1-5
- Burt DW: The cattle genome reveals its secrets. *Journal of Biology* (2009) 8, 36
- Bunch TD, Foote WC, and Spillett JJ: Translocations of acrocentric chromosomes and their implications in the evolution of sheep (*Ovis*). *Cytogenetics and Cell Genetics* (1976) 17, 122-136
- Bush GL, Case SM, Wilson AC, and Patton JL: Rapid speciation and chromosomal evolution in mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* (1977) 74, 3942-3946
- Butcher LM, Meaburn E, Knight J, Sham PC, Schalkwyk LC, Craig IW, and Plomin R: SNPs, microarrays and pooled DNA: identification of four loci associated with mild mental impairment in a sample of 6000 children. *Human Molecular Genetics* (2005) 14, 1315-1325
- Butler WR: Energy balance relationships with follicular development, ovulation and fertility in postpartum dairy cows. *Livestock Production Science* (2003) 83, 211-218
- Butler WR und Smith RD: Interrelationships between energy balance and postpartum reproductive function in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* (1989) 72, 767-783
- Cabello G and Levieux D: Comparative absorption of colostral IgG1 and IgM in the newborn calf: Effects of thyroxine, cortisol, and environmental factors. *Annals de Recherche Veterinaire* (1980) 11, 1
- Cadornica-Valino C, Grummler RR, Armentano LE, Donkin SS, and Bertics SJ: Effects of fatty acids and hormones on fatty acid metabolism and gluconeogenesis in bovine hepatocytes. *Journal of Dairy Science* (1997) 80, 646-656
- Cai L, Taylor JF, Wing RA, Gallagher DS, Woo SS, Davis SK: Construction and characterization of a bovine bacterial artificial chromosome library. *Genomics* (1995) 29, 413-425
- Cance WG and Golubovskaya VM: Focal Adhesion Kinase Versus p53: Apoptosis or Survival? *Science Signaling* (2008) 1 (20), 22
- Carmichael AN, Fridolfsson AK, Halverson J, and Ellegren H: Male-biased mutation rates revealed from Z and W chromosome-linked ATP synthase alpha-subunit (ATP5A1) sequences in birds. *Journal of Molecular Evolution* (2000) 50, 443-447
- Caron J, Loredó-Osti JC, Laroche L, Skamene E, Morgan K, and Malo D: Identification of genetic loci controlling bacterial clearance in experimental *Salmonella enteritidis* infection: an unexpected role of Nramp1 (*Slc11a1*) in the persistence of infection in mice. *Genes and Immunity* (2002) 3, 196-204
- Carragher NO, Westhoff MA, Fincham VJ, Schaller MD, and Frame MC: A novel role for FAK as a protease-targeting adaptor protein: regulation by p42 ERK and Src. *Current Biology* (2003) 13, 1442-1450
- Casas E, Keele JW, Shackelford SD, Koohmaraie M, Sonstegard TS, Smith TP, Kappes SM, and Stone RT: Association of the muscle hypertrophy locus with carcass traits in beef cattle. *Journal of Animal Science* (1998) 76, 468-473

- Casas E, Keele JW, Shackelford SD, Koohmaraie M, Stone RT: Identification of quantitative trait loci for growth and carcass composition in cattle. *Animal Genetics* (2004) 35, 2-6
- Casas E, Shackelford SD, Keele JW, Koohmaraie M, Smith TPL, and Stone RT: Detection of quantitative trait loci for growth and carcass composition in cattle. *Journal of Animal Science* (2003) 81, 2976-2983
- Casas E, White SN, Riley DG, Smith TP, Brenneman RA, Olson TA, Johnson DD, Coleman SW, Bennett GL, and Chase CC: Assessment of single nucleotide polymorphism in genes residing on chromosome 14 and 29 for association with carcass composition traits in *Bos indicus* cattle. *Journal of Animal Science* (2005) 83, 13-19
- Casci T: Genome evolution; Long way for a shortcut. *Nature Review Genetics* (2004) 5, 1343
- Cases S, Smith SJ, Zheng YW, Myers HM, Lear SR, Sande E, Novak S, Collins C, Welch CB, Lusis AJ, Erickson SK, and Farese RV Jr.: Identification of a gene encoding an acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* (1998) 95, 13018-13023
- Casey TM, Boecker A, Chiu JF, Plaut K: Glucocorticoids maintain the extracellular matrix of differentiated mammary tissue during explant and whole organ culture. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* (2000) 224, 76-86
- Chakraborti R and Schutt CE: Novel Sulfoxides Facilitate GC-Rich Template Amplification. *BioTechniques* (2002) 32, 866-874
- Chakravarti A and Lynn A: Meiotic mapping in Humans. In: Birren B, Green ED, Hieter P, Klapholz S, Myers RM, Riethman H, and Roskams J (eds.): *A Laboratory Manual, Volume 4, Mapping Genomes*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999
- Chang BH & Li WH: Estimating the intensity of male-driven evolution in rodents by using X-linked and Y-linked Ube 1 genes and pseudogenes. *Journal of Molecular Evolution* (1995) 40,70-77
- Chamberlain A, McParlan H, Balasingham T, Carrick M, Bowman P, Robinson N and Goddard M: Mapping QTL affecting milk composition traits in dairy cattle using a complex pedigree. *Proceedings of the seventh world congress on genetics applied to livestock production, Montpellier* (2002) vol. 33, pp. 35-38
- Charlier C, Coppieters W, Farnir F, Grobet L, Leroy PL, Michaux C, Mni M, Schwers A, Vanmanshoven P, Hanset R, and Georges M: The mh gene causing double-muscling in cattle maps to bovine Chromosome 2. *Mammalian Genome* (1995) 6, 788-792
- Chassagne M, Barnouin J, and Chacornac JP: Risk Faktors for Stillbirth in Holstein Heifers under Field Conditions in France: A prospective Survey. *Theriogenology* (1999) 51, 1477-1488
- Chiaromonte F, Miller W, and Bouhassira EE: Gene length and proximity to neighbors affect genome-wide expression levels. *Genome Research* (2003) 13, 2602-2608
- Chowdhary BP, Raudsepp T, Kata SR, Goh G, Millon LV, Allan V, Piumi F, Guerin G, Swinburne J, Binns M, Lear TL, Mickelson J, Murray J, Antczak D F, Womack JE, and Skow LC: The first-generation whole-genome radiation hybrid map in the horse identifies conserved segments in human and mouse genomes. *Genome Research* (2003) 13, 742-751
- Chua SC, Szabo P, Vitek A, Grzeschik KH, John M, and White PC: Cloning of cDNA encoding steroid 11 beta-hydroxylase (P450c11). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* (1987) 84, 7193-7197
- Church GM and Gilbert W: Genomic sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* (1984) 81, 1991-1995
- Clegg RA, Barber MC, Pooley L, Ernens I, Larondelle Y, and Travers MT: Milk fat synthesis and secretion: molecular and cellular aspects. *Livestock Production Science* (2000) 70, 3-14
- Clutton-Brock J: *A Natural History of Domesticated Mammals*. Cambridge University Press, Cambridge, UK 1999
- Coffey MP, Simm G, Hill WG, Brotherstone S: Genetic evaluations of dairy bulls for daughter energy balance profiles using linear type scores and body condition score analyzed using random regression. *Journal of Dairy Science* (2003) 86, 2205-2212

- Cohen SN, Chang AC, Boyer HW, and Helling RB: Construction and biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* (1973) 70, 3240-3244
- Collins FS: Positional cloning: let's not call it reverse anymore. *Nature Genetics* (1992) 1, 3-6
- Collins FS: Positional cloning moves from perditional to traditional. *Nature Genetics* (1995) 9, 347-50
- Collins FS, Green ED, Guttmacher AE, Guyer MS, and the Human Genome Research Institute: A Vision for the future of genomics research. *Nature* (2003) 422, 835-847
- Connor EE, Sonstegard TS, Keele JW, Bennett GL, Williams JL, Papworth R, Van Tassell CP, and Ashwell MS: Physical and linkage mapping of mammary-derived expressed sequence tags in cattle. *Genomics* (2004) 83, 148-152
- Choo KH: Why is the centromere so cold? *Genome Research* (1998) 8, 81-82
- Coppieters W, Riquet J, Arranz JJ, Berzi P, Cambisano N, Grisart B, Karim L, Marcq F, Moreau L, Nezer C, Simon P, Vanmanshoven P, Wagenaar D, and Georges M: A QTL with major effect on milk yield and composition maps to bovine Chromosome 14. *Mammalian Genome* (1998) 9, 540-544
- Cornell M, Paton NW, Hedeler C, Kirby P, Delneri D, Hayes A, and Oliver SG: GIMS: an integrated data storage and analysis environment for genomic and functional data. *Yeast* (2003) 20, 1291-1306
- Corpet F: Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research* (1988), 16, 10881-10890
- Cox DR, Burmeister M, Price ER, Kim S, and Myers RM: Radiation hybrid mapping: a somatic cell genetic method for constructing high-resolution maps of mammalian chromosomes. *Science* (1990) 250, 245-250
- Craig JA, Sharma BS, and Jiang Z: The sequence of the bovine cysteine- and histidine-rich cytoplasmic gene: EST puzzle solving by comparative assembly and confirmation by genomic sequencing. *Journal of Animal Breeding and Genetics* (2003) 120, 210-215
- Crawford AM, Dodds KG, Ede AJ, Pierson CA, Montgomery GW, Garmonsway HG, Beattie AE, Davies K, Maddox JF, Kappes SW, Stone RT, Nguyen TC, Penty JM, Lord EA, Broom JE, Buitkamp J, Schwaiger W, Epplen JT, Matthew P, Matthews ME, Hulme DJ, Beh KJ, McGraw RA, and Beattie CW: An autosomal genetic linkage map of the sheep genome. *Genetics* (1995) 140, 703-724
- Crooijmans RP, Vrebalov J, Dijkhof RJ, van der Poel JJ, Groenen MA: Two-dimensional screening of the Wageningen chicken BAC library. *Mammalian Genome* (2000) 11, 360-363
- Crowe ML, Rana D, Fraser F, Bancroft I, and Trick M: BACFinder: genomic localisation of large insert genomic clones based on restriction fingerprinting. *Nucleic Acids Research* (2002) 30, e118
- Curnow KM, Slutsker L, Vitek J, Cole T, Speiser PW, New MI, White PC, Pascoe L: Mutations in the CYP11B1 gene causing congenital adrenal hyperplasia and hypertension cluster in exons 6, 7, and 8. *PNAS* (1993) 90,4552-4556
- Da Y, VanRaden PM, Ron M, Beever JE, Paszek AA, Song J, Wiggans GR, Ma R, Weller JI, and Lewin HA: Standardization and conversion of marker polymorphism measures. *Animal Biotechnology* (1999) 10, 25-35
- Dadati E, Kennedy BW, Burnside EB: Relationships between conformation and calving interval in Holstein cows. *Journal of Dairy Science* (1986) 69, 3112-3119
- Daetwyler HD, Schenkel FS, Sargolzaei M, Robinson JA: A genome scan to detect quantitative trait loci for economically important traits in Holstein cattle using two methods and a dense single nucleotide polymorphism map. *Journal of Dairy Science* (2008) 91, 3225-3236
- Darvasi A, Weinreb A, Minke V, Weller JI, and Soller M: Detecting marker-QTL linkage and estimating QTL gene effect and map position using a saturated genetic map. *Genetics* (1993) 134, 943-951
- Darvasi A: Experimental strategies for the genetic dissection of complex traits in animal models. *Nature Genetics* (1998) 18, 19-24
- Darvasi A and Pisante-Shalom A: Complexities in the genetic dissection of quantitative trait loci. *Trends in Genetics* (2002) 18, 489-491

- Darwin C: The variation of animals and plants under domestication. John Murray, London, UK (1868) Neuauflage: John Hopkins University Press, Baltimore, MD, USA (1998)
- David L, Blum S, Feldman MW, Lavi U, and Hillel J: Recent duplication of the common carp (*Cyprinus carpio* L.) genome as revealed by analyses of microsatellite loci. *Molecular Biology and Evolution* (2003) 20, 1425-1434
- Daly AK and Day CP: Candidate gene case-control association studies: advantages and potential pitfalls. *British Journal of Clinical Pharmacology* (2001) 52, 489-499
- Dekkers JCM, Jairath LK, and Lawrence BH: Relationships between sire genetic evaluations for conformation and functional herd life of daughters. *Journal of Dairy Science* (1994) 77, 844-854
- Dennis JA, Healy PJ, Beaudet AL, O'Brien WE. Molecular definition of bovine argininosuccinate synthetase deficiency. *PNAS USA* (1989) 86(20):7947-7951
- De Vries MJ und Veerkamp RF: Energy balance of dairy cattle in relation to milk production variables and fertility. *Journal of Dairy Science* (2000) 83, 62-69
- De Vries, Hugo: Intracellular Pangenesis. Verlag G. Fischer, Jena (1889)
- De la Cruz I, Steffgen K, Martina A, McGee C, and Hathaway H: Apoptosis and involution in the mammary gland are altered in mice lacking a novel receptor, beta1,4-Galactosyltransferase I. *Developmental Biology* (2004) 272, 286-309
- De Roos APW, Schrooten C, Mullaart E, Calus MPL, and Veerkamp RF: Breeding Value Estimation for Fat Percentage Using Dense Markers on *Bos taurus* Autosome 14. *Journal of Dairy Science* (2007) 90, 4821-4829
- Diament AL, Farahani P, Chiu S, Fisler J, and Warden CH: A novel mouse Chromosome 2 congenic strain with obesity phenotypes. *Mammalian Genome* (2004) 15, 452-459
- DiBerardino D, Hayes H, Fries R, Long S: International system for cytogenetic nomenclature of domestic animals. The Second International Conference on Standardization of Domestic Animal Karyotypes, INRA, Jouy-en Josas, France, 22nd-26th May, 1989. *Cytogenetics and Cell Genetics* (1990) 53,65-79
- Dib C, Faure S, Fizames C, Samson D, Drouot N, Vignal A, Millasseau P, Marc S, Hazan J, Seboun E, Lathrop M, Gyapay G, Morissette J, and Weissenbach J: A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature* (1996) 380,152-154
- Dietrich WF, Miller J, Steen R, Merchant MA, Damron-Boles D, Husain Z, Dredge R, Daly MJ, Ingalls KA, and O'Connor TJ: A comprehensive genetic map of the mouse genome. *Nature* (1996) 380,149-152
- Di Meo GP, Perucatti A, Gautier M, Hayes H, Incarnato D, Eggen A, and Iannuzzi L: Chromosome localization of the 31 type I Texas bovine markers in sheep and goat chromosomes by comparative FISH-mapping and R-banding. *Animal Genetics* (2003) 34, 294-296
- Ding C and Cantor CR: Direct molecular haplotyping of long-range genomic DNA with M1-PCR. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* (2003) 100, 7449-7453
- Dolf J and Hediger R: Comparison of centric fusion in a Toggenburg and Saanen goat. *Proceedings of the 6th European Colloquium on Cytogenetic of Domestic Animals* (311-312), Zürich, 1984
- Domalik LJ, Chaplin DD, Kirkman MS, Wu RC, Liu WW, Howard TA, Seldin MF, Parker KL: Different isozymes of mouse 11 beta-hydroxylase produce mineralocorticoids and glucocorticoids. *Molecular Endocrinology* (1991) 5, 1853-1861
- Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K, Mattick JS. 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res.* (1991) 19, 4008
- Drögemüller C, Wöhlke A, Mömke S, and Distl O: Fine mapping of the polled locus to a 1-Mb region on bovine chromosome 1q12. *Mammalian Genome* (2005)16, 613-620
- Ducrocq V, Boichard D, Barbat A, and Larroque H: Implementation of an approximate multi-trait BLUP evaluation to combine production traits and functional traits into a total merit index. 52nd Annual Meeting of the European Association for Animal Production, Budapest, Hungary (2001)
- Ducrocq V, Delaunay I, Boichard D, and Mattalia S: A general approach for international genetic evaluations robust to inconsistencies of genetic trends in national evaluations. *Interbull Bulletin* (2003) 30, 101-111

- Duijvesteijn N, Knol EF, Merks JW, Crooijmans RP, Groenen MA, Bovenhuis H, Harlizius B. A genome-wide association study on androstenone levels in pigs reveals a cluster of candidate genes on chromosome 6. *BMC Genetics* (2010) 11, 42
- Dumont B and Payseur A: Evolution of the Genomic Rate of Recombination in Mammals. *Evolution* (2008) 62, 276-294
- Dutil APJ and Deng AY: Quantitative trait loci with opposing blood pressure effects demonstrating epistasis on Dahl rat chromosome 3. *Physiol Genomics* (2003) 15, 1-8
- Eakin GS and Behringer RR: Tetraploid Development in the Mouse. *Developmental Dynamics* (2003) 228, 751-766
- Eck SH, Benet-Pagès A, Flisikowski K, Meitinger T, Fries R, and Strom TM: Whole genome sequencing of a single *Bos taurus* animal for single nucleotide polymorphism discovery. *Genome Biology* (2009) 10(8), R82
- Edmonson AJ, Lean IJ, Weaver LD, Farver T, and Webster G: A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science* (1989) 72, 68
- Edwards CJ, Connellan J, Wallace PF, Park SD, McCormick FM, Olsaker I, Eythorsdottir E, MacHugh DE, Bailey JF, Bradley DG: Feasibility and utility of microsatellite markers in archaeological cattle remains from a Viking Age settlement in Dublin. *Animal Genetics* (2003) 34, 410-416
- Edwards CJ, Bollongino R, Scheu A, Chamberlain A, Tresset A, Vigne JD, Baird JF, Larson G, Ho SY, Heupink TH, Shapiro B, Freeman AR, Thomas MG, Arbogast RM, Arndt B, Bartosiewicz L, Benecke N, Budja M, Chaix L, Choyke AM, Coqueugnot E, Döhle HJ, Göldner H, Hartz S, Helmer D, Herzig B, Hongo H, Mashkour M, Ozdogan M, Pucher E, Roth G, Schade-Lindig S, Schmölcke U, Schulting RJ, Stephan E, Uerpmann HP, Vörös I, Voytek B, Bradley DG, and Burger J: Mitochondrial DNA analysis shows a Near Eastern Neolithic origin for domestic cattle and no indication of domestication of European aurochs. *Proceedings Biological sciences / The Royal Society* (2007) 274:1377-1385
- Edwards J and Bartlett JM: Mutation and polymorphism detection: a technical overview. *Methods in Molecular Biology* (2003) 226, 287-294
- Eggen A, Steinbach D, Fries R, and Leveziel H: Proceedings 24th ISAG, International Conference on Animal Genetics, Prague, Czech Republic, 1994, Abstracts, p. 111, *Animal Genetics* 25(2)
- Eggen A, Gautier M, Billaut A, Petit E, Hayes H, Laurent P, Urban C, Pfister-Genskow M, Eilertsen K, Bishop MD: Construction and characterization of a bovine BAC library with four genome-equivalent coverage. *Genetics Selection Evolution* (2001) 33, 543-548
- Eichler EE and Patel NH: Genomes and evolution; from sequence to organism. *Current Opinion in Genetics and Development* (2003) 13, 559-561
- Eickbush TH: Repair by retrotransposition. *Nature Genetics* (2002) 31, 1-2
- Ekwall K, Olsson T, Turner BM, Cranston G, Allshire RC: Transient inhibition of histone deacetylation alters the structural and functional imprint at fission yeast centromeres. *Cell* (1997) 91, 1021-1032
- Ekstrom PO, Bjorheim J, Gaudernack G, and Giercksky KE: Population screening of single-nucleotide polymorphisms exemplified by analysis of 8000 alleles. *Journal of Biomolecular Screening* (2002) 7, 501-506
- Ellegren H, Chowdhary BP, Johansson M, Marklund L, Fredholm M, Gustavsson I, and Andersson L: A primary linkage map of the porcine genome reveals a low rate of genetic recombination. *Genetics* (1994) 137, 1089-1100
- Ellegren H, Moore S, Robinson N, Byrne K, Ward W, and Sheldon BC: Microsatellite Evolution - A Reciprocal Study of Repeat Lengths at Homologous Loci in Cattle and Sheep. *Molecular Biology and Evolution* (1997) 14, 854-860
- Ellegren H and Fridolfsson AK: Male-driven evolution of DNA sequences in birds. *Nature Genetics* (1997) 17, 182-184
- Elminger B and Stranzinger C: Identification of a centromeric fusion in the G-banding karyotype of a Saanen goat. *Proceedings of the 5th European Colloquium on Cytogenetic of Domestic Animals* (407-409), Milano, 1982

- Elsen JM: Sélection et introgression assistées par marqueurs. INRA Production Animal, numéro hors série "Génétique moléculaire: principes et applications aux populations animales" (2000) 233-237
- Engelbrecht Y and Swart P: Adrenal function in Angora goats: A comparative study of adrenal steroidogenesis in Angora goats, Boer goats, and Merino sheep. *Journal of Animal Science* (2000) 78, 1036-1046
- Esnault C, Maestre J, and Heidmann T: Human LINE retrotransposons generate processed pseudogenes. *Nature Genetics* (2000) 24, 363-367
- Everts-van der Wind A, Kata SR, Band MR, Rebeiz M, Larkin DM, Everts RE, Green CA, Liu L, Natarajan S, Goldammer T, Lee JH, McKay S, Womack JE, and Lewin HA: A 1463 gene cattle-human comparative map with anchor points defined by human genome sequence coordinates. *Genome Research* (2004) 14, 1424-1437
- Fahrenkrug SC, Rohrer GA, Freking BA, Smith TP, Osoegawa K, Shu CL, Catanese JJ, de Jong PJ: A porcine BAC library with tenfold genome coverage: a resource for physical and genetic map integration. *Mammalian Genome* (2001) 12, 472-474
- Falconer DS and Mackay TFC: *Introduction to Quantitative Genetics*. Longman, Harlow, UK (1996)
- Farber CR, Medrano JF: Putative in silico mapping of DNA sequences to livestock genome maps using SSLP flanking sequences. *Animal Genetics* (2003) 34, 11-18
- Farnir F, Grisart B, Coppieters W, Riquet J, Berzi P, Cambisano N, Karim L, Mni M, Moisisio S, Simon P, Wagenaar D, Vilkki J, and Georges M: Simultaneous Mining of Linkage and Linkage Disequilibrium to Fine Map Quantitative Trait Loci in Outbred Half-Sib Pedigrees: Revisiting the Location of a Quantitative Trait Locus With Major Effect on Milk Production on Bovine Chromosome 14. *Genetics* (2002) 161, 275-287
- Farnir F, Coppieters W, Arranz JJ, Berzi P, Cambisano N, Grisart B, Karim L, Marcq F, Moreau L, Mni M, Nezer C, Simon P, Vanmanshoven P, Wagenaar D, Georges M: Extensive genome-wide linkage disequilibrium in cattle. *Genome Research* (2000) 10, 220-227
- Fernando RL and Grossman M: Marker assisted selection using best linear unbiased prediction. *Genetics Selection Evolution* (1989) 21, 467-477
- Fikse WF and Banos G: Weighting factors of sire daughter information in international genetic evaluations. *Journal of Dairy Science* (2001) 84, 1759-1767
- Fikse WF, Sigurdsson A, and Banos G: Genetic correlations between three countries for conformation traits. *Proceedings 1995 Interbull Annual Meeting, Prague, Czech Republic, Vol. 11*
- Fisher PJ and Spelman RJ: Verification of selective DNA pooling methodology through identification and estimation of the DGAT1 effect. *Animal Genetics* (2004) 35, 201-205
- Fjell CD, Bosdet I, Schein JE, Jones SJ, and Marra MA: Internet Contig Explorer (iCE)--a tool for visualizing clone fingerprint maps. *Genome Research* (2003) 13, 1244-1249
- Fowden AL, Mundy L, and Silver M: Developmental regulation of gluconeogenesis in the sheep fetus during late gestation. *Journal of Physiology* (1998) 508, 937-947
- Frangeul L, Nelson KE, Buchrieser C, Danchin A, Glaser P, and Kunst F: Cloning and assembly strategies in microbial genome projects. *Microbiology* (1999) 145, 2625-2634
- Franklin IR: Systematics and Phylogeny of the Sheep. In: Piper L and Ruvinsky A (eds): *The genetics of sheep*. CAB INTERNATIONAL, Wallingford, UK (1997)
- Frengen E, Weichenhan D, Zhao B, Osoegawa K, van Geer M, and de Jong PJ: A Modular, Positive Selection Bacterial Artificial Chromosome Vector with Multiple Cloning Sites. *Genomics* (1999) 56, 250-253
- Frengen E, Zhao B, Howe S, Weichenhan D, Osoegawa K, Gjernes E, Jessee J, Prydz H, Huxley C, and de Jong PJ: Modular bacterial artificial chromosome vectors for transfer of large inserts into mammalian cells. *Genomics* (2000) 68, 118-126
- Friedman R and Hughes AL: Two Patterns of Genome Organization in Mammals: the Chromosomal Distribution of Duplicate Genes in Human and Mouse. *Molecular Biology and Evolution* (2004) Feb 12 [Epub ahead of print]
- Friedman R and Hughes AL: The temporal distribution of gene duplication events in a set of highly conserved human gene families. *Molecular Biology and Evolution* (2003) 20, 154-161

- Friedman JE, Yun JS, Patel YM, McGrane MM, and Hanson RW: Glucocorticoids Regulate the Induction of Phosphoenolpyruvate Carboxykinase (GTP) Gene Transcription during Diabetes. *Journal of Biological Chemistry* (1993) 268,12952-12957
- Fries R: Mapping the bovine genome: methodological aspects and strategy. *Animal Genetics* (1993) 24, 111-116
- Fries R: DNA Variation - Polymorphismus - Genetische Variation. 18. Hülseberger Gespräche, Schriftenreihe der H. Wilhelm Schaumann Stiftung (2000) 18, 35-43
- Fries R and Thaller G: Aktueller Stand und Perspektiven der molekularen Tierzucht. *Züchtungskunde* (2003) 75, 324-335
- Fries R, Eggen A, and Stranzinger G: The bovine genome contains polymorphic microsatellites. *Genomics* (1990) 8, 403-406
- Frisch SM, Vuori K, Ruoslahti E, Chan-Hui PY: Control of adhesion-dependent cell survival by focal adhesion kinase. *Journal of Cell Biology* (1996) 134:793-799
- Furuhata T, Tokino T, Urano T, and Nakamura Y: Isolation of a novel GPI-anchored gene specifically regulated by p53; correlation between its expression and anti-cancer drug sensitivity. *Oncogene* (1996) 13, 1965-1970
- Gallardo MH, Bickham JW, Honeycutt RL, Ojeda RA, and Kohler N: Discovery of tetraploidy in a mammal. *Nature* (1999) 401, 341
- Garner TW: Genome size and microsatellites: the effect of nuclear size on amplification potential. *Genome* (2002) 45, 212-215
- Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, Ivanyi I, Appel RD, and Bairoch A: ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Research* (2003) 31, 3784-3788
- Gautier M, Capitan A, Fritz S, Eggen A, Boichard D, and Druet T: Characterization of the DGAT1 K232A and variable number of tandem repeat polymorphisms in French dairy cattle. *Journal of Dairy Science* (2007) 90, 2980-2988
- Gavin AJ, Scheetz TE, Roberts CA, O'Leary B, Braun TA, Sheffield VC, Soares MB, Robinson JP, and Casavant TL: Pooled library tissue tags for EST-based gene discovery. *Bioinformatics* (2002) 18, 1162-1166
- Geldermann H: Investigation on inheritance of quantitative characters in animal by gene markers (I. Methods). *Theoretical and Applied Genetics* (1975) 46, 319-330
- Geldermann H: Investigation on inheritance of quantitative characters in animal by gene markers (II. Expected effects). *Theoretical and Applied Genetics* (1976) 47, 1-4
- Geldermann H, Pieper U, and Roth B: Effects of marked chromosome sections on milk performance in cattle. *Theoretical and Applied Genetics* (1985) 70, 138-146
- Geley S, Kapelari K, Jöhrer K, Peter M, Glatzl J, Vierhapper H, Schwarz S, Helmberg A, Sippell WG, White PC, and Kofler R: CYP11B1 Mutations Causing Congenital Adrenal Hyperplasia due to 11 β -Hydroxylase Deficiency. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* (1996) 81, 2896-2901
- GenBank Release 141.0: www.itc.virginia.edu/achs/molbio/databases/gbrel_141.txt
- Gengler N.: Considerations on the path from test-day records to national and international genetic evaluations and its consequences. *Proceedings of the 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, (2002), Montpellier, France
- Georges M: Towards marker assisted selection in livestock. *Reproduction Nutrition and Development* (1999) 39, 555-561
- Georges M and Anderson L: Livestock genomics comes of age. *Genome Research* (1996) 6, 907-921
- Georges M, Nielsen D, Mackinnon M, Mishra A, Okimoto R, Pasquino AT, Sargeant LS, Sorensen A, Steele MR, Zhao X, Womack JE, and Hoeschele I: Mapping quantitative trait loci controlling milk production in dairy cattle by exploiting progeny testing. *Genetics* (1995) 139, 907-920
- Georges M and Massey JM: Velogenetics, or the synergistic use of marker assisted selection and germline manipulation. *Theriogenology* (1991) 35, 151-159
- Georges M, Dietz AB, Mishra A, Nielsen D, Sargeant LS, Sorensen A, Steele MR, Zhao X, Leipold H, Womack JE, and Lathrop M: Microsatellite mapping of the gene causing

- weaver disease in cattle will allow the study of an associated quantitative trait locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* (1993) 90, 1058-1062
- Georges M, Lequarré AS, Castelli M, Hanset R, and Vassart G: DNA fingerprinting in domestic animals using four different minisatellite probes. *Cytogenetics and Cell Genetics* (1988) 47, 127-131
- Gibbs RA, Weinstock GM, Metzker ML, Muzny DM, Sodergren EJ, Scherer S, Scott G, Steffen D, Worley KC, Burch PE, Okwuonu G, Hines S, Lewis L, DeRamo C, Delgado O, Dugan-Rocha S, Miner G, Morgan M, Hawes A, Gill R, Celera, Holt RA, Adams MD, Amanatides PG, Baden-Tillson H, Barnstead M, Chin S, Evans CA, Ferreira S, Fosler C, Glodek A, Gu Z, Jennings D, Kraft CL, Nguyen T, Pfannkoch CM, Sitter C, Sutton GG, Venter JC, Woodage T, Smith D, Lee HM, Gustafson E, Cahill P, Kana A, Doucette-Stamm L, Weinstock K, Fechtel K, Weiss RB, Dunn DM, Green ED, Blakesley RW, Bouffard GG, De Jong PJ, Osoegawa K, Zhu B, Marra M, Schein J, Bosdet I, Fjell C, Jones S, Krzywinski M, Mathewson C, Siddiqui A, Wye N, McPherson J, Zhao S, Fraser CM, Shetty J, Shatsman S, Geer K, Chen Y, Abramzon S, Nierman WC, Havlak PH, Chen R, James Durbin K, Egan A, Ren Y, Song XZ, Li B, Liu Y, Qin X, Cawley S, Cooney AJ, D'Souza LM, Martin K, Qian Wu J, Gonzalez-Garay ML, Jackson AR, Kalafus KJ, McLeod MP, Milosavljevic A, Virk D, Volkov A, Wheeler DA, Zhang Z, Bailey JA, Eichler EE, Tuzun E, Birney E, Mongin E, Ureta-Vidal A, Woodward C, Zdobnov E, Bork P, Suyama M, Torrents D, Alexandersson M, Trask BJ, Young JM, Huang H, Wang H, Xing H, Daniels S, Gietzen D, Schmidt J, Stevens K, Vitt U, Wingrove J, Camara F, Mar Alba M, Abril JF, Guigo R, Smit A, Dubchak I, Rubin EM, Couronne O, Poliakov A, Hubner N, Ganten D, Goesele C, Hummel O, Kreitler T, Lee YA, Monti J, Schulz H, Zimdahl H, Himmelbauer H, Lehrach H, Jacob HJ, Bromberg S, Gullings-Handley J, Jensen-Seaman MI, Kwitek AE, Lazar J, Pasko D, Tonellato PJ, Twigger S, Ponting CP, Duarte JM, Rice S, Goodstadt L, Beatson SA, Emes RD, Winter EE, Webber C, Brandt P, Nyakatura G, Adetobi M, Chiaromonte F, Elnitski L, Eswara P, Hardison RC, Hou M, Kolbe D, Makova K, Miller W, Nekrutenko A, Riemer C, Schwartz S, Taylor J, Yang S, Zhang Y, Lindpaintner K, Andrews TD, Caccamo M, Clamp M, Clarke L, Curwen V, Durbin R, Eyraas E, Searle SM, Cooper GM, Batzoglou S, Brudno M, Sidow A, Stone EA, Craig Venter J, Payseur BA, Bourque G, Lopez-Otin C, Puente XS, Chakrabarti K, Chatterji S, Dewey C, Pachter L, Bray N, Yap VB, Caspi A, Tesler G, Pevzner PA, Haussler D, Roskin KM, Baertsch R, Clawson H, Furey TS, Hinrichs AS, Karolchik D, Kent WJ, Rosenbloom KR, Trumbower H, Weirauch M, Cooper DN, Stenson PD, Ma B, Brent M, Arumugam M, Shteynberg D, Copley RR, Taylor MS, Riethman H, Mudunuri U, Peterson J, Guyer M, Felsenfeld A, Old S, Mockrin S, and Collins F: Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature* (2004) 428, 493-521
- Gibbs RA, Weinstock G, Kappes S, Schook L, Skow L, and Womack J: Bovine Genomic Sequencing Initiative, White-Paper (2003)
[www.genome.gov/Pages/Research/Sequencing/SeqProposals/BovineSEQ.pdf]
- Gibson JP: Strategies for Utilising Molecular Marker Data for Livestock Genetic Improvement in the Developing World. In: Conference 10 of the FAO Biotechnology Forum, Session II: Marker assisted selection in animals. Torino, Italy (2003)
[www.fao.org/biotech/docs/Gibson.pdf]
- Gibson LJ: Chromosomal Changes in Mammalian Speciation: A Literature Review. *Origins* (1984) 11, 67-89
- Gill JW, Hosking BJ, and Egan AR: Prenatal programming of mammalian growth - a review of the role of steroids. *Livestock Production Science* (1998) 54, 251-267
- Gill CA, Davis SK, Taylor JF, Cockett NE, and Bottema CD: Construction and characterization of an ovine bacterial artificial chromosome library. *Mammalian Genome* (1999) 10, 1108-1111
- Gill JL, Bishop SC, McCorquodale C, Williams JL, and Wiener P: Association of selected SNP with carcass and taste panel assessed meat quality traits in a commercial population of Aberdeen Angus-sired beef cattle. *Genetics Selection Evolution* (2009) 41, 36

- Glazier AM, Nadeau JH, and Aitman TJ: Finding genes that underlie complex traits. *Science* (2002) 298, 2345-2349
- Godard S, Schibler L, Oustry A, Cribiu EP, Guerin G: Construction of a horse BAC library and cytogenetical assignment of 20 type I and type II markers. *Mammalian Genome* (1998) 9, 633-637
- Goddard ME and Wiggans GR: Genetic Improvement of Dairy Cattle. In: Fries R and Ruvinsky A (eds): *The Genetics of Cattle*. CAB INTERNATIONAL, Wallingford, UK (1999)
- Goldstein DB, Ruiz Linares A, Cavalli-Sforza LL, and Feldman MW: An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. *Genetics* (1995) 139, 463-471
- Goldstein DB & Schlötterer C [eds.]: *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford University Press, New York, USA (1999)
- Goller S and Mitterbauer R: Molekularbiologische Übungen I Plasmidvektoren - Klonieren in *Escherichia coli*. 2004 [www.boku.ac.at/MoBil/Kolloquium_E_coli.pdf]
- Goring HH, Terwilliger JD, Blangero J: Large upward bias in estimation of locus-specific effects from genomewide scans. *American Journal of Human Genetics* (2001) 69, 1357-1369
- Gorni C, Williams JL, Heuven HC, Negrini R, Valentini A, van Eijk MJ, Waddington D, Zevenbergen M, Marsan PA, Peleman JD: Application of AFLP technology to radiation hybrid mapping. *Chromosome Research* (2004) 12, 285-297
- Gortari MJ de, Freking BA, Cuthbertson RP, Kappes SM, Keele JW, Stone RT, Leymaster KA, Dodds KG, Crawford AM, and Beattie CW: A second-generation linkage map of the sheep genome. *Mammalian Genome* (1998) 9, 204-209
- Götherström A, Anderung C, Hellborg L, Elburg R, Smith C, Bradley DG, and Ellegren H: Cattle domestication in the Near East was followed by hybridization with aurochs bulls in Europe. *Proceedings of the Royal Society of London B Biological Science* (2005) 272, 2345–2350
- Grant SF, Steinlicht S, Nentwich U, Kern R, Burwinkel B, and Tolle R: SNP genotyping on a genome-wide amplified DOP-PCR template. *Nucleic Acids Research* (2002) 30, e125
- Grant SGN, Jessee J, Bloom FR, and Hanahan D: Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* (1990) 87, 4645-4649
- Grapes L, Dekkers JC, Rothschild MF, and Fernando RL: Comparing linkage disequilibrium-based methods for fine mapping quantitative trait loci. *Genetics* (2004) 166, 1561-1570
- Gravert HO, Waßmuth R, and Weniger JH: *Einführung in die Züchtung, Fütterung und Haltung landwirtschaftlicher Nutztiere*. Verlag Paul Parey, Hamburg (1979)
- Graves JAM and Van de Berg J: *Comparative Gene Mapping*. Institute for Laboratory Animal Research Journal (1998) 39, 47-260
- Gray CH and Tatum EL: X-ray induced growth factor requirements in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* (1944) 30:404–410
- Green P, Falls K, and Crooks S: Documentation of CRIMAP, Version 2.4, Washington University School of Medicine, St. Louis, MO, USA (1990)
- Greenblatt HC, Diggs CL, and Rosenstreich DL: *Trypanosoma rhodesiense*: analysis of the genetic control of resistance among mice. *Infection and Immunity* (1984) 44, 107-111
- Gregory KE, Smith GM, Cundiff LV, Koch RM, and Laster DB: Characterization of biological types of cattle - Cycle III: I. Birth and weaning traits. *Journal of Animal Science* (1979a) 48, 271-279
- Gregory KE, Laster DB, Cundiff LV, Smith GM, and Koch RM: Characterization of biological types of cattle - Cycle III: II. Growth rate and puberty in females. *Journal of Animal Science* (1979b) 49, 461–471
- Gregory TR: Coincidence, coevolution, or causation? DNA content, cell size, and the C-value enigma. *Biological Reviews* (2001a) 76, 65-101
- Gregory TR: *Animal Genome Size Database* (2001b) (URL 3)
- Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RC, and Gelbart WM: *An Introduction to Geneic Analysis*. W.H.Freeman and Company, New York, NY, USA (2000)
- Grisart B, Farnir F, Karim L, Cambisano N, Kim JJ, Kvasz A, Mni M, Simon P, Frere JM, Coppieters W, Georges M: Genetic and functional confirmation of the causality of the

- DGAT1 K232A quantitative trait nucleotide in affecting milk yield and composition. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* (2004) 101, 2398-2403
- Grisart B, Coppeters W, Farnir F, Karim L, Ford C, Berzi P, Cambisano N, Mni M, Reid S, Simon P, Spelman R, Georges M, and Snell R: Positional Candidate Cloning of a QTL in Dairy Cattle: Identification of a Missense Mutation in the Bovine DGAT1 Gene with Major Effect on Milk Yield and Composition. *Genome Research* (2002) 12, 222-231
- Grobet L, Martin LJ, Poncelet D, Pirottin D, Brouwers B, Riquet J, Schoeberlein A, Dunner S, Menissier F, Massabanda J, Fries R, Hanset R, and Georges M: A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle. *Nature Genetics* (1997) 17, 71-74
- Grodzicker T, Williams J, Sharp P, and Sambrook J: Physical mapping of temperature sensitive mutations of adenoviruses. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology* (1974) 39, 439-446
- Groenen MA, Cheng HH, Bumstead N, Benkel BF, Briles WE, Burke T, Burt DW, Crittenden LB, Dodgson J, Hillel J, Lamont S, de Leon AP, Soller M, Takahashi H, and Vignal A: A consensus linkage map of the chicken genome. *Genome Research* (2000) 10, 137-147
- Gromova V (1936): Zitiert in: Bunch TD, Foote WC, and Spillett JJ: Translocations of acrocentric chromosomes and their implications in the evolution of sheep (*Ovis*). *Cytogenetics and Cell Genetics* (1976) 17, 122-136
- Grosclaude F, Joudrier P, Mahe MF: A genetic and biochemical analysis of a polymorphism of bovine alpha S2-casein. *Journal of Dairy Research* (1979) 46, 211-213
- Gu X, Wang Y, and Gu J: Age distribution of human gene families shows significant roles of both large- and small-scale duplications in vertebrate genomes. *Nature Genetics* (2002) 31, 205-209
- Gu Z, Rifkin SA, White KP, and Wen-Hsiung Li: Duplicate genes increase gene expression diversity within and between species. *Nature Genetics* (2004) 36, 577-579
- Guo X, and Elston RC: Linkage information content of polymorphic genetic markers. *Human Heredity* (1999) 49, 112-118
- Gustavsson I: Chromosome abnormality in cattle. *Nature* (1966) 211, 865-866
- Gustavsson I: Cytogenetics, distribution and phenotypic effects of a translocation in Swedish cattle. *Hereditas* (1969) 63, 68-169
- Gutiérrez JP, Goyache F, Fernández I, Alvarez I, and Royo LJ: Genetic relationships among calving ease, birth weight and weaning weight in the Asturiana de los Vales beef cattle breed. *Journal of Animal Science* (2007) 85, 69-75
- Haber JE and Louis EJ: Minisatellite Origins in Yeast and Humans. *Genomics* (1998) 48, 132-135
- Hardl DL and Clark AG: *Principles of Population Genetics*. Sinaur Associates, Sunderland, MA, USA (1997)
- Haldane JBS: The rate of spontaneous mutation of a human gene. *Journal of Genetics* (1935) 31, 317-326
- Haldane JBS: The combination of linkage values, and the calculation of distances between the loci of linked factors. *Journal of Genetics* (1919) 8:299-309
- Haley CS: Advances in QTL mapping. In: *From Jay Lush to Genomics: Visions For Animal Breeding and Genetics*, 16-18 May 1999, Ames, USA [edited by Dekkers JCM, Lamont SJ and Rothschild MF] *AgBiotechNet® Proceedings* 001 Paper 3.
- Haley CS and Visscher PM: Strategies to utilize marker-quantitative trait loci associations. *Journal of Dairy Science* (1998) 81, 85-97
- Halliburton R: *Introduction to Population Genetics*. Pearson Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, USA (2004)
- Halse K, Blom AK, and Hove K: Growth hormone related to insulin and sugar in nocturnal blood plasma of lactating cows. *Acta Endocrinologica (Copenhagen)* (1976) 82, 767-73
- Han M and Robinson MA: PCR-SSCP analysis of polymorphism: a simple and sensitive method for detecting differences between short segments of DNA. *Methods in Molecular Biology* (2003) 226, 327-334
- Hanigan MD, Bequette BJ, Crompton LA, and France J: Modeling mammary amino acid metabolism. *Livestock Production Science* (2000) 70, 63-78
- Hansen LB: Symposium: Selection for Milk Yield. *Journal of Dairy Science* (2000) 83, 1145-4450

- Harder B, Bennewitz J, Hinrichs D, Kalm E: Genetic parameters for health traits and their relationship to different persistency traits in German Holstein dairy cattle. *Journal of Dairy Science* (2006) 89, 3202-3212
- Harper JM, Galecki AT, Burke DT, Pinkosky SL, and Miller AR: Quantitative trait loci for insulin-like growth factor I leptin thyroxine and corticosterone in genetically heterogeneous mice. *Physiological Genomics* (2003) 15, 44-51
- Harrison PM, Milburn D, Zhang Z, Bertone P, Gerstein M: Identification of pseudogenes in the *Drosophila melanogaster* genome. *Nucleic Acids Research* (2003) 31, 1033-1037
- Hashimoto T, Morohashi K, and Omura T : Cloning and characterization of bovine cytochrome P-450(11 beta) genes. *Journal Biochemistry (Tokyo)* (1989) 105, 676-679
- Hastings IM, Bootland LH, and Hill WG: The role of growth hormone in lines of mice divergently selected on body weight. *Genetic Research* (1993) 61, 101-106
- Hawken R, Barris W, and Dalrymple B: A bovine SNP database (IBISS: an interactive bovine in silico snp database). *Proceedings of the Plant and Animal Genome XII Conference (P957)*, San Diego, CA, USA (2004)
- Hawken RJ, Murtaugh J, Flickinger GH, Yerle M, Robic A, Milan D, Gellin J, Beattie CW, Schook LB, Alexander LJ.: A first-generation porcine whole-genome radiation hybrid map. *Mammalian Genome* (1999) 10, 824-830
- Hayden MJ, Good G, and Sharp PJ: Sequence tagged microsatellite profiling (STMP): improved isolation of DNA sequence flanking target SSRs. *Nucleic Acids Research* (2002) 30, e129
- Hayes BJ, Bowman PJ, Chamberlain AC, Verbyla K, Goddard ME. Accuracy of genomic breeding values in multi-breed dairy cattle populations. *Genetics Selection Evolution* (2009) 41, 51
- Hayes BJ, Chamberlain AJ, McPartlan H, Macleod I, Sethuraman L, and Goddard ME: Accuracy of marker-assisted selection with single markers and marker haplotypes in cattle. *Genetic Research* (2007) 89,215-220
- Hayes B and Goddard ME: Evaluation of marker assisted selection in pig enterprises. *Livestock Production Science* (2003) 81, 197-211
- Hayes W: Recombination in *Bact. coli* K 12; unidirectional transfer of genetic material. *Nature* (1952) 169, 118-119
- He M, Jiang W, and Huang L: Studies on aneuploid pearl oyster (*Pinctada martensii* Dunker) produced by crossing triploid females and diploid male following the inhibition of PB1. *Aquaculture* (2004) 230, 117-124
- Healy J, Thomas EE, Schwartz JT, and Wigler M: Annotating large genomes with exact word matches *Genome Research* (2003) 13, 2306-2315
- Hedges SB, Parker PH, Sibley CG, Kumar S: Continental breakup and the ordinal diversification of birds and mammals. *Nature* (1996) 381, 226-229
- Heinrich AJ and Hargrove GL: Standards of Weight and Height for Holstein Heifers. *Journal of Dairy Science* (1987) 70, 653-660
- Heinrichs AJ and Losinger WC: Growth of Holstein heifers in the United States. *Journal of Animal Science* (1998) 76, 1254-1260
- Helmberg A: Twin genes and endocrine disease: CYP21 and CYP11B genes. *Acta Endocrinologica* (1993) 129, 97-108
- Herre W, Kesper KD: Verbreitung von *Ovis ammon* in Europa. *Zoologischer Anzeiger* (1953) 151, 204
- Herron BJ, Silva GH, Flaherty L: Putative assignment of ESTs to the genetic map by use of the SSLP database. *Mammalian Genome* (1998) 9, 1072-1074
- Herzog A: Möglichkeiten der Erkennung und Begrenzung von Erbfehlern in der Haustierzucht, dargestellt am Beispiel der pathogenetischen Überwachung von Besamungsbullen. *Wiener Tierärztliche Monatsschriften* (1992) 79, 142-148
- Hetzel J, Davis G, Corbet N, Scacheri S, Mayne C, Scott J, and Stevenson R: Localisation of Quantitative Trait Loci (QTL) for Growth Traits in *Bos taurus* x *Bos indicus* Cattle. *Proceedings of the Plant and Animal Genome V Conference (S13)*, San Diego, CA, USA (1997)

- Heyen DW, Weller JI, Ron M, Band M, Beever JE, Feldmesser E, Da Y, Wiggans PM, VanRaden PM, and Lewin HA: A genome scan for QTL influencing milk production and health traits in dairy cattle. *Physiological Genomics* (1999) 1, 165-181
- Hiendleder S, Thomsen H, Reinsch N, Bennewitz J, Leyhe-Horn B, Looft C, Xu N, Medjugorac I, Russ I, Kuhn C, Brockmann GA, Blumel J, Brenig B, Reinhardt F, Reents R, Averdunk G, Schwerin M, Forster M, Kalm E, Erhardt G: Mapping of QTL for Body Conformation and Behavior in Cattle. *Journal of Heredity* (2003) 94, 496-506
- Higgins D, Thompson J, Gibson T, Thompson JD, Higgins DG, and Gibson TJ: CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressively multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* (1994) 22, 4673-4680
- Higgs DR, Wood WG, Jarman AP, Vickers MA, Wilkie AOM, Lamb J, Vyas P, and Bennett JP: The alpha-thalassemias. *Annals of the New York Academy of Sciences* (1990) 612, 15-22
- Hines HC: Blood Groups and Biochemical Polymorphisms. In: Fries R and Ruvinsky A (eds.) *The Genetics of Cattle*. CABI Publishing, Wallingford, (1999), UK
- Hocquette JF, Ortigues-Marty L, Pethick D, Herpin P, and Fernandez X: Nutritional and hormonal regulation of energy metabolism in skeletal muscles of meat-producing animals. *Livestock Production Science* (1998) 56, 115-143
- Hough RL, McCarthy FD, Thatcher CD, Kent HD, and Eversole DE: Influence of glucocorticoids on macromolecular absorption and passive immunity in neonatal lambs. *Journal of Animal Science* (1990) 68, 2459
- Hofmann MA, Brian DA. Sequencing PCR DNA amplified directly from a bacterial colony. *Biotechniques*. (1991) 11, 30-1.
- Hoffman SM, Nelson DR, Keeney DS: Organization, structure and evolution of the CYP2 gene cluster on human chromosome 19. *Pharmacogenetics* (2001) 11, 687-698
- Hospital F, Chevalet C, and Mulsant P: Using Markers in Gene Introgression Breeding Programs. *Genetics* (1992) 132: 1199-1210
- Hu ZL, Fritz ER, Reecy JM. AnimalQTLdb: a livestock QTL database tool set for positional QTL information mining and beyond. *Nucleic Acids Research* (2007) (Database issue):D604-9.
- Huang D, Kohe M, Ilic D, and Bryer-Ash M: Reduced expression of focal adhesion kinase disrupts insulin action in skeletal muscle cells. *Endocrinology* (2006) 147, 3333-3343
- Huang D, Cheung AT, Parsons JT & Bryer-Ash M: Focal adhesion kinase (FAK) regulates insulin-stimulated glycogen synthesis in hepatocytes. *Journal of Biological Chemistry* (2002) 277, 18151-18160
- Huang X and Madan A: CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Research* (1999) 9, 868-877
- Hurst LD, Pál C, and Lercher MJ: The Evolutionary Dynamics of Eukaryotic Gene Order. *Nature Reviews Genetics* (2004) 5, 299-310
- Hussain MA, Schmitz OA, Mengel Y, Glatz JS, Christiansen J, Zapf J, and Froesch ER: Comparison of the effects of growth hormone and insulin-like factor I on the substrate oxidation and on insulin sensitivity in growth hormone-deficient humans. *Journal of Clinical Investigation* (1994) 94, 1126-1133
- Huynen MA and Bork P: Measuring genome evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* (1998) 95, 5849-5856
- Ihara N, Takasuga A, Mizoshita K, Takeda H, Sugimoto M, Mizoguchi Y, Hirano T, Itoh T, Watanabe T, Reed KM, Snelling WM, Kappes SM, Beattie CW, Bennett GL, and Sugimoto Y: A comprehensive genetic map of the cattle genome based on 3802 microsatellites. *Genome Research* (2004) 14, 1987-1998
- Ihaka R and Gentleman R: R: A language for data analysis and graphics. *Journal of Computational and Graphical Statistics* (1996) 5, 299-314
- Imai T, Yamazaki T, and Kominami S: Kinetic studies on bovine cytochrome p45011 beta catalyzing successive reactions from deoxycorticosterone to aldosterone. *Biochemistry* (1998) 37, 8097-8104

- Imai K, Ihara N, Watanabe T, Tsuji S, Fukuma T, Osaki Y, Ogata Y, Matsushige T, and Sugimoto Y: QTL for beef marbling mapped on BTA 9 and BTA 14 in a paternal half-sib family from purebred Japanese Black cattle (Hiroshima-gyu) population. Proceedings 29th ISAG, International Conference on Animal Genetics, Tokio, Japan, 2004, (F047), Abstracts, p. 137
- Imoto H, Hirotsune S, Muramatsu M, Okuda K, Sugimoto O, Chapman VM, and Hayashizaki Y: Direct Determination of NotI Cleavage Sites in the Genomic DNA of Adult Mouse Kidney and Human Trophoblast Using Whole-Range Restriction Landmark Genomic Scanning. *DNA Research* (1994) 1, 239–243
- Inglis GC, Kenyon CJ, Szpirer C, Klinga-Levan K, Sutcliffe RG, Connell JM: Microsatellite polymorphism analysis allows the individual assignment of the rat 11 beta-hydroxylase gene (*Cyp11b1*) and the rat aldosterone synthase gene (*Cyp11b2*) to chromosome 7 using rat x mouse somatic cell hybrids and identifies differences between and within various rat strains. *Journal of Molecular Endocrinology* (1995) 14, 303-311
- Innis MA, Gelfand DH, and Sninsky JJ: PCR Applications. *Protocols for functional Genomics*. Academic Press, London, UK (1999)
- International Chicken Sequencing Consortium: Sequence and comparative analysis of the chicken Genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. *Nature* (2004) 432, 695-716
- Iraqi FA, Behnke JM, Menge DM, Lowe AM, Teale AJ, Gibson JP, Baker LR, and Wakelin DR: Chromosomal regions controlling resistance to gastro-intestinal nematode infections in mice. *Mammalian Genome* (2003) 14, 184-191
- Itoh T, Takasuga A, Watanabe T, and Sugimoto Y: Mapping of 1400 expressed sequence tags in the bovine genome using a somatic cell hybrid panel. *Animal Genetics* 34, 362-370
- Israel C and Weller JI: Effect of type I error threshold on marker-assisted selection in dairy cattle. *Production Science* (2004) 85, 189-199
- Jackson DA, Symons RH, and Berg P: Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of Simian Virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* (1972) 69, 2904-2909
- Jaco I, Canela A, Vera E, and Blasco MA: Centromere mitotic recombination in mammalian cells. *The Journal of Cell Biology* (2008) 181, 885-892
- Jaffe DB, Butler J, Gnerre S, Mauceli E, Lindblad-Toh K, Mesirov JP, Zody MC, and Lander ES: Whole-genome sequence assembly for mammalian genomes: Arachne 2. *Genome Research* (2003) 13, 91-96
- Jahn-Hofmann K, Holzhey N, Ellinger T, Engels JW: A new concept for DNA-arrays Nucleosides Nucleotides. *Nucleic Acids* 22, 1479-1482
- Jairath L, Dekkers JC, Schaeffer LR, Liu Z, Burnside EB, and Kolstad B: Genetic evaluation for herd life in Canada. *Journal of Dairy Science* (1998) 81, 550-562
- Jeffreys AJ, Tamaki K, MacLeod A, Monckton DG, Neil DL, Armour JA: Complex gene conversion events in germline mutation at human minisatellites. *Nature Genetics* (1994) 6, 136-45
- Jeffreys AJ, and Morton DB: DNA fingerprints of dogs and cats. *Animal Genetics* (1987) 18, 1-15.
- Jeffreys AJ, Wilson V, and Thein SL: Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature* (1985) 314, 67-73
- Jensen RG: *Handbook of Milk Composition*. Academic Press, San Diego, CA, USA (1995)
- Jeon JT, Park EW, Jeon HJ, Kim TH, Lee KT, Cheong IC: A large-insert porcine library with sevenfold genome coverage: a tool for positional cloning of candidate genes for major quantitative traits. *Molecules and Cells* (2003) 16, 113-116
- Jiang Z, Melville JS, Cao H, Kumar S, Filipski A, and Verrinder Gibbins AM: Measuring conservation of contiguous sets of autosomal markers on bovine and porcine genomes in relation to the map of the human genome. *Genome* (2002) 45, 769-776
- Jiao J, Kaur N, Lu B, Reeves SA, and Halvorsen SW: Initiation and maintenance of CNTF-Jak/STAT signaling in neurons is blocked by protein tyrosine phosphatase inhibitors. *Brain Research, Molecular Brain Research* (2003) 116, 135-46

- Joehrer K, Geley S, Strasser-Wozak EM, Azziz R, Wollmann HA, Schmitt K, Kofler R, White PC: CYP11B1 mutations causing non-classic adrenal hyperplasia due to 11 beta-hydroxylase deficiency. *Human Molecular Genetics* (1997) 6, 1829-1834
- Joerg H, Garner D, Rieder S, Suwattana D, and Stranzinger G: Molecular genetic characterization of Robertsonian translocation in cattle. *Journal of Animal Breeding and Genetics* (2001) 118, 371-377
- Johanson JM and Berger PJ: Birth weight as a predictor of calving ease and perinatal mortality in Holstein cattle. *Journal of Dairy Science* (2003) 86, 3745-3755
- John B and Freeman M: Causes and consequences of Robertsonian exchange. *Chromosoma* (1975) 52, 123-136
- Kaderali L, Deshpande A, Nolan JP, and White PS: Primer-design for multiplexed genotyping. *Nucleic Acids Research* (2003) 31, 1796-1802
- Kagawa K, Inoue T, Tokino T, Nakamura Y, and Akiyama T : Overexpression of GML promotes radiation-induced cell cycle arrest and apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communication* (1997) 241, 481-485
- Kalinkowski ST, Taper ML, and Marshall TC: Revising how the computer program cervus accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* (2007) 16, 1099–1106
- Kämmerer S, Buitkamp J, Geuder U, Schuster M, and Götz KU: TG and DGAT have no influence on intramuscular fat content in Bavarian Simmental bulls. *Proceedings 31st International Conference on Animal Genetics (ISAG), Amsterdam (2008), Poster 2197*
- Kantanen J, Olsaker I, Holm LE, Lien S, Vilkki J, Brusgaard K, Eythorsdottir E, Danell B, Adalsteinsson S: Genetic diversity and population structure of 20 North European cattle breeds. *Journal of Heredity* (2000) 91, 446-457
- Kapil SJ, Kehrl ME, Tyler HD, and Goff JP: Characterization of CD18 Expression in Jersey Calves at Parturition and During the First Week Postpartum. DSL-49 (www.ans.iastate.edu/ext/dairy/report95/health/dsl-49.pdf)
- Kappes SM, Keele JW, Stone RT, McGraw RA, Sonstegard TS, Smith TPL, Lopez-Corrales NL, and Beattie CW: A Second-Generation Linkage Map of the Bovine Genome. *Genome Research* (1997) 7, 235-249
- Kappes SM: Utilization of gene mapping information in livestock animals. *Theriogenology* (1999) 51, 135-147
- Karall-Albrecht C, Groenen MA, van der Poel JJ, Barendse W, Womack JE, Kalm E, and Looft C: Mapping of 16 ESTs expressed in the bovine mammary gland during lactation. *Mammalian Genome* (2000) 11, 320-325
- Karsenty E, Barillot E, Tosser-Klopp G, Lahbib-Mansais Y, Milan D, Hatey F, Cirera S, Sawera M, Jorgensen CB, Chowdhary B, Fredholm M, Wimmers K, Ponsuksili S, Davoli R, Fontanesi L, Braglia S, Zambonelli P, Bigi D, Neuenschwander S, and Gellin J: The GENETPIG database: a tool for comparative mapping in pig (*Sus scrofa*). *Nucleic Acids Research* (2003) 31, 138-141
- Kashi Y, Hallerman E, and Soller M: Marker-assisted selection of candidate bulls for progeny testing programmes. *Animal Production* (1990) 51, 63-74
- Kasukawa T, Furuno M, Nikaido I, Bono H, Hume D A, Bult C, Hill D P, Baldarelli R, Gough J, Kanapin A, Matsuda H, Schriml L M, Hayashizaki Y, Okazaki Y, and Quackenbush J: Development and evaluation of an automated annotation pipeline and cDNA annotation system. *Genome Research* (2003) 13, 1542-1551
- Kaupe B, Winter A, Fries R and Erhardt G: DGAT1 polymorphism in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle breeds. *Journal of Dairy Research* (2004a) 71, 1-6
- Kaupe B, Kollers S, Fries R, and Erhardt G: Mapping of CYP11B and a putative CYHR1 paralogous gene to bovine chromosome 14 by FISH. *Animal Genetics* (2004b) 35, 462-504
- Kaupe B, Brandt H, Prinzenberg EM, and Erhardt G: Joint analysis of the influence of CYP11B1 and DGAT1 genetic variation on milk production, somatic cell score, conformation, reproduction, and productive lifespan in German Holstein cattle. *Journal of Animal Science* (2007) 85, 11-21

- Kawamoto T, Mitsuuchi Y, Toda K, Yokoyama Y, Miyahara K, Miura S, Ohnishi T, Ichikawa Y, Nakao K, Imura H, Ulick S, and Shizuta Y: Role of Steroid 11 β -Hydroxylase and Steroid 18-Hydroxylase in the Biosynthesis of Glucocorticoids and Mineralocorticoids in Humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* (1992) 89, 1458-1462.
- Keighren MA, Macfadyen LP, Hill AS, Patek CE, Telfer EE, and West JD: Polyploid cells in the mouse ovary. *Journal of Anatomy* (2003) 202, 563-571
- Keles S, van der Laan M, and Eisen MB: Identification of regulatory elements using a feature selection method. *Bioinformatics* (2002) 18, 1167-1175
- Kell DB: Genotype-phenotype mapping: genes as computer programs. *Trends in Genetics* (2002) 18, 555-559
- Kelley JM, Field CE, Craven MB, Bocskai D, Kim UJ, Rounsley SD, and Adams MD: High throughput direct end sequencing of BAC clones. *Nucleic Acids Research* (1999) 27, 1539-1546
- Kellis M, Birren BW, and Lander ES: Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* (2004) 428, 617-624
- Kemp SJ, Hishida O, Wambugu J., Rink A, Longeri ML, Ma RZ, Da Y, Lewin HA, Barendse W, and Teale AJ: A panel of polymorphic bovine, ovine and caprine microsatellite markers. *Animal Genetics* (1995) 26, 299-306
- Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M, and Tsui LC: Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* (1989) 245, 1073-1080
- Khalturin K, Kuznetsov S, Bosch TC: PCR fluorescence differential display. *Methods in Molecular Biology* (2003) 226, 237-244
- Khandelwal S: Chromosome evolution in the genus *Ophioglossum* L. *Botanical Journal of the Linnean Society* (2008) 102, 205-217
- Khani S and Tayek JA: Cortisol increases gluconeogenesis in humans: its role in the metabolic syndrome. *Clinical Science* (2001) 101, 739-747
- Khatib H, Zaitoun I, Chang YM, Maltecca C, and Boettcher P: Evaluation of association between polymorphism within the thyroglobuline gene and milk production traits in dairy cattle. *Journal of Animal Breeding and Genetics* (2007) 124, 26-28
- Khatkar MS, Nicholas FW, Collins AR, Zenger KR, Cavanagh JA, Barris W, Schnabel RD, Taylor JF, and Raadsma HW: Extent of genome-wide linkage disequilibrium in Australian Holstein-Friesian cattle based on a high-density SNP panel. *BMC Genomics* (2008) 9, 187
- Khatkar MS, Thomson PC, Tammen I, and Raadsma HW: Quantitative trait loci mapping in dairy cattle: review and meta-analysis. *Genetics Selection Evolution* (2004) 36, 163-190
- Kikkawa Y, Takada T, Sutopo, Nomura K, Namikawa T, Yonekawa H, Amano T: Phylogenies using mtDNA and SRY provide evidence for male-mediated introgression in Asian domestic cattle. *Animal Genetics* (2003) 34, 96-101
- Kim UJ, Shizuya H, de Jong PJ, Birren B, and Simon MI: Stable propagation of cosmid sized human DNA inserts in an F factor based vector. *Nucleic Acids Research* (1992) 20, 1083-1085
- Kim UJ, Birren BW, Slepak T, Mancino V, Boysen C, Kang HL, Simon MI, Shizuya H: Construction and characterization of a human bacterial artificial chromosome library. *Genomics* (1996) 34, 213-218
- Kimura Y, Furuhashi T, Urano T, Hirata K, Nakamura Y, and Tokino T: Genomic Structure and Chromosomal Localization of GML (GPI-Anchored Molecule-like Protein), a Gene Induced by p53. *Genomics* (1997a) 41, 477-480
- Kimura Y, Furuhashi T, Shiratsuchi T, Nishimori H, Hirata K, Nakamura Y, and Tokino T: GML sensitizes cancer cells to Taxol by induction of apoptosis. *Oncogene* (1997b) 15(11):1369-1374
- Kinghorn B & van der Werf J: Identifying and incorporating genetic markers and major genes in animal breeding programs. QTL Course: June 2000 Belo Horizonte - Brasil [www.animalgenome.org/edu/QTL/Julius_notes/]

- Kinoshita-Kikuta E, Kinoshita E, and Koike T: A novel procedure for simple and efficient genotyping of single nucleotide polymorphisms by using the Zn²⁺-cyclen complex. *Nucleic Acids Research* (2002) 30, e126
- Kirita S, Morohashi K, Hashimoto T, Yoshioka H, Fujii-Kuriyama Y, and Omura T: Expression of two kinds of cytochrome P-450(11 beta) mRNA in bovine adrenal cortex. *Journal of Biochemistry (Tokyo)* (1988) 104, 683-686
- Kirita S, Hashimoto T, Kitajima M, Honda S, Morohashi K, and Omura T: Structural analysis of multiple bovine P-450 (11 beta) genes and their promoter activities. *Journal of Biochemistry (Tokyo)* (1990) 108, 1030-1041
- Kirkness EF, Bafna V, Halpern AL, Levy S, Remington K, Rusch DB, Delcher AL, Pop M, Wang W, Fraser CM, and Venter JC: The dog genome: survey sequencing and comparative analysis. *Science* (2003) 301, 1898-1903
- Klassen DJ, Monardes HG, Jairath L, Cue RI, and Hayes JF: Genetic correlations between lifetime production and linearized type in Canadian Holsteins. *Journal of Dairy Science* (1992) 75, 2272-2282
- Knap PW, van der Steen HAM, and Plastow GS: Developments in pig breeding and the role of research. *Livestock Production Science* (2001) 72, 43-48
- Kneeland J, Li C, Basarab J, Snelling W, Benkel B, Murdoch B, and Moore SS: Identification and fine mapping of QTL for growth traits on bovine chromosomes 2, 5, 6, 14, 19, 21 and 23 within one commercial line of *Bos taurus*. Online publication of the University of Alberta [www.afns.ualberta.ca/]
- Kobori JA, Strauss E, Minard K, and Hood L: Molecular analysis of the hotspot of recombination in the murine major histocompatibility complex. *Science* (1986) 234, 173-179
- Komiya T, Hirashima T, Kikui M, Fukuoka M, Ohno A, and Kawase I: GPI-anchored molecule-like protein (GML) expression in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Anticancer Research* (1999) 19, 4315-4319
- Koning DJ de, Dekkers JCM, and Haley CS: Designs for QTL Detection in Livestock and their Implications for MAS. In: Conference 10 of the FAO Biotechnology Forum, Session II: Marker assisted selection in animals. Torino, Italy (2003). [www.fao.org/biotech/docs/DeKoning.pdf]
- Kosambi DD: The estimation of map distance from recombination values. *Annals Eugenics* (1944) 12, 172-175
- Kozul R, Caburet S, Dujon B, and Fischer G: Eucaryotic genome evolution through the spontaneous duplication of large chromosomal segments. *EMBO Journal* (2004) 23, 234-243
- Koudande OD, Iraqi F, Thomson PC, Teale AJ, and van Arendonk JA: Strategies to optimize marker-assisted introgression of multiple unlinked QTL. *Mammalian Genome* (2000) 11, 145-150
- Kowalski SP, Lan TH, Feldmann KA, and Paterson AH: Comparative mapping of *Arabidopsis thaliana* and *Brassica oleracea* chromosomes reveals islands of conserved organization. *Genetics* (1994) 138, 499-510
- Kruglyak L: Prospects for whole-genome linkage disequilibrium mapping of common disease genes. *Nature Genetics* (1999) 22, 139-144
- Kühn Ch, Bennewitz J, Reinsch N, Xu N, Thomsen H, Looft C, Brockmann GA, Schwerin M, Weimann C, Hiendleder S, Erhardt G, Medjugorac I, Förster M, Brenig B, Reinhardt F, Reents R, Russ I, Averdunk G, Blümel J, Kalm E. Quantitative trait loci mapping of functional traits in the German Holstein cattle population. *Journal of Dairy Science* (2003) 86, 360-368
- Kuhnert P, Nicolet J, and Frey J: Rapid and Accurate Identification of *Escherichia coli* K-12 Strains. *Applied Environmental Microbiology* (1995) 61, 4135-4139
- Kuhnert P, Hacker J, Muhldorfer I, Burnens AP, Nicolet J, and Frey J: Detection system for *Escherichia coli*-specific virulence genes: absence of virulence determinants in B and C strains. *Applied Environmental Microbiology* (1997) 63, 703-709
- Kulikova T, Aldebert P, Althorpe N, Baker W, Bates K, Browne P, van den Broek A, Cochrane G, Duggan K, Eberhardt R, Faruque N, Garcia-Pastor M, Harte N, Kanz C, Leinonen R, Lin Q, Lombard V, Lopez R, Mancuso R, McHale M, Nardone F, Silventoinen V,

- Stoehr P, Stoesser G, Tuli MA, Tzouvara K, Vaughan R, Wu D, Zhu W, and Apweiler R: The EMBL Nucleotide Sequence Database. *Nucleic Acids Research* (2004) 32 Database issue D27-D30
- Kumar S, Hedges SB: A molecular timescale for vertebrate evolution. *Nature* (1998) 392, 917-920
- Kumar S, Subramanian S: Mutation rates in mammalian genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* (2002) 99, 803-808
- Lai Y, Shinde D, Arnheim N, and Sun F: The mutation process of microsatellites during the polymerase chain reaction. *Journal of Computational Biology* (2003) 10, 143-155
- Lamb RC and Barker BO: Genetic relationship between birth weight and adult weight in Holsteins. *Journal of Dairy Science* (1975) 58, 724-728
- Lambie EJ and Roeder GS: Repression of meiotic crossing over by a centromere (CEN3) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* (1986) 114, 769-789
- Lan H, Wang W, and Shi L: Phylogeny of *Mundiacus* (Cervidae) based on mitochondrial DNA restriction maps. *Biochemical Genetics* (1995) 33, 377-388
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczyk J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrim J, Mesirov JP, Miranda C, Morris W, Naylor J, Raymond C, Rosetti M, Santos R, Sheridan A, Sougnez C, Stange-Thomann N, Stojanovic N, Subramanian A, Wyman D, Rogers J, Sulston J, Ainscough R, Beck S, Bentley D, Burton J, Clee C, Carter N, Coulson A, Deadman R, Deloukas P, Dunham A, Dunham I, Durbin R, French L, Grafham D, Gregory S, Hubbard T, Humphray S, Hunt A, Jones M, Lloyd C, McMurray A, Matthews L, Mercer S, Milne S, Mullikin JC, Mungall A, Plumb R, Ross M, Shownkeen R, Sims S, Waterston RH, Wilson RK, Hillier LW, McPherson JD, Marra MA, Mardis ER, Fulton LA, Chinwalla AT, Pepin KH, Gish WR, Chissoe SL, Wendl MC, Delehaunty KD, Miner TL, Delehaunty A, Kramer JB, Cook LL, Fulton RS, Johnson DL, Minx PJ, Clifton SW, Hawkins T, Branscomb E, Predki P, Richardson P, Wenning S, Slezak T, Doggett N, Cheng JF, Olsen A, Lucas S, Elkin C, Uberbacher E, Frazier M, Gibbs RA, Muzny DM, Scherer SE, Bouck JB, Sodergren EJ, Worley KC, Rives CM, Gorrell JH, Metzker ML, Naylor SL, Kucherlapati RS, Nelson DL, Weinstock GM, Sakaki Y, Fujiyama A, Hattori M, Yada T, Toyoda A, Itoh T, Kawagoe C, Watanabe H, Totoki Y, Taylor T, Weissbach J, Heilig R, Saurin W, Artiguenave F, Brottier P, Bruls T, Pelletier E, Robert C, Wincker P, Smith DR, Doucette-Stamm L, Rubenfield M, Weinstock K, Lee HM, Dubois J, Rosenthal A, Platzer M, Nyakatura G, Taudien S, Rump A, Yang H, Yu J, Wang J, Huang G, Gu J, Hood L, Rowen L, Madan A, Qin S, Davis RW, Federspiel NA, Abola AP, Proctor MJ, Myers RM, Schmutz J, Dickson M, Grimwood J, Cox DR, Olson MV, Kaul R, Raymond C, Shimizu N, Kawasaki K, Minoshima S, Evans GA, Athanasiou M, Schultz R, Roe BA, Chen F, Pan H, Ramsier J, Lehrach H, Reinhardt R, McCombie WR, de la Bastide M, Dedhia N, Blocker H, Hornischer K, Nordsiek G, Agarwala R, Aravind L, Bailey JA, Bateman A, Batzoglou S, Birney E, Bork P, Brown DG, Burge CB, Cerutti L, Chen HC, Church D, Clamp M, Copley RR, Doerks T, Eddy SR, Eichler EE, Furey TS, Galagan J, Gilbert JG, Harmon C, Hayashizaki Y, Haussler D, Hermjakob H, Hokamp K, Jang W, Johnson LS, Jones TA, Kasif S, Kasprzyk A, Kennedy S, Kent WJ, Kitts P, Koonin EV, Korf I, Kulp D, Lancet D, Lowe TM, McLysaght A, Mikkelsen T, Moran JV, Mulder N, Pollara VJ, Ponting CP, Schuler G, Schultz J, Slater G, Smit AF, Stupka E, Szustakowski J, Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J, Wagner L, Wallis J, Wheeler R, Williams A, Wolf YI, Wolfe KH, Yang SP, Yeh RF, Collins F, Guyer MS, Peterson J, Felsenfeld A, Wetterstrand KA, Patrinos A, Morgan MJ, Szustakowski J, de Jong P, Catanese JJ, Osoegawa K, Shizuya H, Choi S, Chen YJ; International Human Genome Sequencing Consortium: Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* (2001) 409, 860-921
- Lander ES and Botstein D: Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* (1989) 121, 185-199
- Lander ES and Kruglyak L: Genetic dissection of complex traits: Guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nature Genetics* (1995) 11, 241-247

- Lander ES and Green P: Construction of multilocus genetic linkage maps in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* (1987) 84, 2363-2367
- Larkin DM, Everts-van der Wind A, Rebeiz M, Schweitzer PA, Bachman S, Green C, Wright CL, Campos EJ, Benson LD, Edwards J, Liu L, Osoegawa K, Womack JE, de Jong PJ, Lewin HA: A cattle-human comparative map built with cattle BAC-ends and human genome sequence. *Genome Research* (2003) 13, 1966-1972
- Latorra D, Campbell K, Wolter A, and Hurley JM: Enhanced allele-specific PCR discrimination in SNP genotyping using 3' locked nucleic acid (LNA) primers. *Human Mutation* (2003) 22, 79-85
- Lau TE and Rodriguez MA: A protein tyrosine kinase associated with the ATPdependent inactivation of adipose diacylglycerol acyltransferase. *Lipids* (1996) 31, 277-283
- Lauber M and Muller J: Purification and characterization of two distinct forms of rat adrenal cytochrome P450(11) beta: functional and structural aspects. *Archives of Biochemistry and Biophysics* (1989) 274, 109-119
- Lawrence JG, Hendrix RW, and Casjens S: Where are the pseudogenes in bacterial genomes? *Trends in Microbiology* (2001) 9, 535-540
- Lawson LJ and Hewitt GM: Comparison of substitution rates in ZFX and ZFY introns of sheep and goat related species supports the hypothesis of male-biased mutation rates. *Journal of Molecular Evolution* (2002) 54, 54-61
- Lederberg J and Tatum EL: Sex in bacteria; genetic studies, 1945-1952. *Science* (1953) 118, 169-175
- Lederberg J: E.coli K12. *Microbiology Today* (2004) 31, 116
- Lee SH and van der Werf JHJ: The efficiency of designs for fine-mapping of quantitative trait loci using combined linkage disequilibrium and linkage. *Genetics Selection Evolution* (2004) 36, 145-
- Lefcourt AM, Bitman J, Kahl S, and Wood DL: Circadian and ultradian rhythms of peripheral cortisol concentrations in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* (1993) 76, 2607-2612
- Levene, H: On a Matching Problem Arising in Genetics. *The Annals of Mathematical Statistics* (1949) 20, 91-94.
- Levin DA and Wilson AC: Rates of Evolution in Seed Plants: Net Increase in Diversity of Chromosome Numbers and Species Numbers Through Time. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* (1976) 73, 2086-2090
- Levine M and Tjian R: Transcription regulation and animal diversity. *Nature* (2003) 424, 147-151
- Lewin B: *Gene*. VCH Verlagsgesellschaft Weinheim, Germany (1988)
- Lewis R: Charting the Genomic Landscape. *The Scientist* (2004) 18, 24-25
- Lewontin RC: *Molecular and Classical Biology*. *Science* (1964) 146(3640),14
- Lichter P, Tang CJ, Call K, Hermanson G, Evans GA, Housman D, Ward DC: High-resolution mapping of human chromosome 11 by in situ hybridization with cosmid clones. *Science* (1990) 247, 64-69
- Li N, Zhang Y, Naylor MJ, Schatzmann F, Maurer F, Wintermantel T, Schuetz G, Ulrich Mueller U, Streuli CH, and Nancy E Hynes NE: $\beta 1$ - integrins regulate mammary gland proliferation and maintain the integrity of mammary alveoli. *The EMBO Journal* (2005) 24, 1942-1953
- Li R, Mignot E, Faraco J, Kadotani H, Cantanese J, Zhao B, Lin X, Hinton L, Ostrander EA, Patterson DF, and de Jong PJ: Construction and characterization of an eightfold redundant dog genomic bacterial artificial chromosome library. *Genomics* (1999) 58, 9-17
- Li WH and Graur D: *Fundamentals of molecular evolution*. Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA, USA (1991)
- Li WH, Yi S, and Makova K: Male-driven evolution. *Current Opinion in Genetics and Development* (2002) 12, 650-656
- Li YC, Korol AB, Fahima T, Beiles A, and Nevo E: Microsatellites: genomic distribution putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology* (2002) 11, 2453-2465

- Lichter P, Tang C., Call K, Hermanson G, Evans GA, Housman D, and Ward DC: High resolution mapping of human chromosome 11 by in situ hybridization with cosmid clones. *Science* (1990) 247, 64-69
- Lien S, Rogne S, Brovold MJ, and Aleström P: A method for isolation of DNA from frozen (A.I.) bulls semen. *Journal of Animal Breeding and Genetics* (1990) 107, 74
- Lindsley DL and Sandler L: The genetic analysis of meiosis in female *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the Royal Society of London B Biological Science* (1995) 277, 295-312
- Lipkin E, Straus K, Stein RT, Bagnato A, Schiavini F, Fontanesi L, Russo V, Medugorac I, Foerster M, Sölkner J, Dolezal M, Medrano JF, Friedmann A, Soller M: Extensive long-range and nonsyntenic linkage disequilibrium in livestock populations: deconstruction of a conundrum. *Genetics* (2009) 181, 691-699
- Litt M and Luty JA: A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actine gene. *American Journal of Human Genetics* (1989) 44, 397-401
- Liu BH: *Statistical Genomics. Linkage, Mapping, and QTL Analysis*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA (1998)
- Liu WH, Kaur M, and Makrigiorgos GM: Detection of hotspot mutations and polymorphisms using an enhanced PCR-RFLP approach. *Human Mutation* (2003) 21, 535-541
- Liu W, Liu Z, Hu X, Zhang Y, Yuan J, Zhao R, Li Z, Xu W, Gao Y, Deng X, and Li N: Construction and characterization of a novel 13.34-fold chicken bacterial artificial chromosome library. *Animal Biotechnology* (2003) 14, 145-153
- Liu Z, Reinhardt F, Bunger A, Reents R: Derivation and calculation of approximate reliabilities and daughter yield-deviations of a random regression test-day model for genetic evaluation of dairy cattle. *Journal of Dairy Science* (2004) 87, 1896-1907
- Liu Z, Reinhardt F, and Reents R: Estimating parameters of a random regression test day model for first three lactation milk production traits using the covariance function approach. *Interbull Bulletin* (2000) 25, 74-80
- Liu Z, Reinhardt F, and Reents R: The effective daughter contribution concept applied to multiple trait models for approximating reliability of estimated breeding values. *Interbull Bulletin* (2001a) 27, 41-47
- Liu Z, Reinhardt F, Bünger A, Dopp L, and Reents R: Application of a random regression model to genetic evaluations of test day yields and somatic cell scores in dairy cattle. *Interbull Bulletin* (2001b) 27, 159-166
- Livingstone KD, Lackney VK, Blauth JR, van Wijk R, and Jahn MK: Genome mapping in *Capsicum* and the evolution of genome structure in the Solanaceae. *Genetics* (1999) 152, 1183-1202
- Loftus RT, MacHugh DE, Bradley DG, Sharp PM, and Cunningham EP: Evidence for two independent domestications of cattle. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* (1994) 91, 2757-2761
- Loftus RT, Ertugrul O, Harba AH, El-Barody MAA, MacHugh DE, Park SDE, and Bradley DG: A microsatellite survey of cattle from a centre of origin: the Near East. *Molecular Evolution* (1999) 8, 2015-2022
- Lokki J and Saura A: Polyploidie in Insect Evolution. In: Lewis WH (ed) *Polyploidy. Biological Relevance*. Plenum Press, New York, NY, USA (1980)
- Looft C, Reinsch N, Karall-Albrecht C, Paul S, Brink M, Thomsen H, Brockmann G, Kühn C, Schwerin M, and Kalm E: A mammary gland EST showing linkage disequilibrium to a milk production QTL on bovine Chromosome 14. *Mammalian Genome* (2001) 12, 646-650
- Luan JA, Wong MY, Day NE, Wareham NJ: Sample size determination for studies of gene-environment interaction. *International Journal of Epidemiology* (2001) 30, 1035-1040
- Ludwig A, Belfiore NM, Pitra C, Svirsky V, and Jenneckens I: Genome Duplication Events and Functional Reduction of Ploidy Levels in Sturgeon (*Acipenser*, *Huso* and *Scaphirhynchus*). *Genetics* (2001) 158, 1203-1215
- Lucy MC, Savio JD, Badinga L, De La Sota RL, and Thatcher WW: Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *Journal of Animal Science* (1992) 70, 3615-3626

- Lunz B und Robeis J: Der Anschluss ist geschafft. Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Fachbeiträge aus dem Institut für Tierzucht (2007). Ein Beitrag aus dem Geschäftsbereich des Bayerischen Staatsministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten
[online: <http://www.lfl.bayern.de/itz/rind/26322/index.php>]
- Lynch M and Conery JS: The origins of genome complexity. *Science* (2003) 302, 1401-1404
- Lynch M and Conery JS: The Evolutionary Fate and Consequences of Duplicate Genes. *Science* (2000) 290, 1151-1155
- Ma RZ, Beaver JE, Da Y, Green CA, Russ I, Park C, Heyen DW, Everts RE, Fisher SR, Overton KM, Teale AJ, Kemp SJ, Hines HC, Guerin G, and Lewin HA: A male linkage map of the cattle (*Bos taurus*) Genome. *Journal of Heredity* (1996) 87, 261-271
- MacHugh DE, Loftus RT, Bradley DG, Sharp PM, and Cunningham P: Microsatellite variation within and among European cattle breeds. *Proceedings of the Royal Society of London B Biological Science* (1994) 256, 25-31
- MacHugh DE, Shriver MD, Loftus RT, Cunningham P, and Bradley D: Microsatellite DNA Variation and the Evolution, Domestication and Phylogeography of Taurine and Zebu Cattle (*Bos taurus* and *Bos indicus*). *Genetics* (1997) 146, 1071-1086
- MacHugh DE, Troy CS, McCormick F, Olsaker I, Eythórsdóttir E, and Bradley DG: Early medieval cattle remains from a Scandinavian settlement in Dublin: genetic analysis and comparison with extant breeds. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* (1999) 354, 99-109
- Mackinnon MJ and Georges MAJ: Marker-assisted preselection of young dairy sires prior to progeny-testing. *Livestock Production Science* (1998) 54, 229-250
- Mahtani MM, and Willard HF: Physical and genetic mapping of the human X chromosome centromere: repression of recombination. *Genome Research* (1998) 8(2), 100-110
- Majewski J and Ott J: GT repeats are associated with recombination on human chromosome 22. *Genome Research* (2000) 10, 1108-1114
- Makova KD and Li WH: Strong male-driven evolution of DNA sequences in humans and apes. *Nature* (2002) 416, 624-626
- Malkin I, Ginsburg E, and Elston RC: Increase in power of transmission-disequilibrium tests for quantitative traits. *Genetic Epidemiology* (2002) 23, 234-244
- Mamo S, Wimmers K, Gilles M, Kata SR, Schellander K, Ponsuksili S: Mapping of ESTs derived from pre-implantation stage cattle embryos to allocate 16 new additions to the ordered comparative map of cattle and human. *Animal Genetics* (2003) 34, 449-452
- Marques E, Schnabel RD, Stothard P, Kolbehdari D, Wang Z, Taylor JF, and Moore SS: High density linkage disequilibrium maps of chromosome 14 in Holstein and Angus cattle. *BMC Genetics* (2008) 9, 45
- Marra MA, Kucaba TA, Dietrich NL, Green ED, Brownstein B, Wilson RK, McDonald KM, Hillier LW, McPherson JD, and Waterston RH: High throughput fingerprint analysis of large-insert clones. *Genome Research* (1997) 7, 1072-1084
- Mascarello JT and Hsu TC: Chromosome evolution in woodrats, genus *Neotoma* (Rodentia: Cricetidae). *Evolution* (1976) 30, 152-169
- Mattapallil MJ and Ali S: Analysis of conserved microsatellite sequences suggests closer relationship between water buffalo *Bubalus bubalis* and sheep *Ovis aries*. *DNA Cell Biology* (1999) 18, 513-519
- Mather J and Barnes D (eds): *Methods in Cell Biology, Animal Cell Culture Methods, Volume 57*. Academic Press, San Diego, CA, USA (1998)
- Mathew PA, Mason JI, Trant JM, Sanders D, and Waterman MR: Amino Acid Substitutions Phe66→Leu and Ser126→Pro Abolish Cortisol and Aldosterone Synthesis by Bovine Cytochrome P45011β. *Journal of Biological Chemistry* (1990) 265, 20228-20233
- Matocha MF and Waterman MR: Synthesis and processing of mitochondrial steroid hydroxylases. In vivo maturation of the precursor forms of cytochrome P-450scc, cytochrome P-450(11)beta, and adrenodoxin. *Journal of Biological Chemistry* (1985) 260, 12259-12265
- Mattick JS: Challenging the dogma: the hidden layer of non-protein-coding RNAs in complex organisms. *BioEssays* (2003) 25, 930-939

- Mayr E: Populations, species, and evolution. Belknap Press, Cambridge, MA, USA (1970)
- McKay SD, Schnabel RD, Murdoch BM, Matukumalli LK, Aerts J, Coppeters W, Crews D, Dias Neto E, Gill CA, Gao C, Mannen H, Stothard P, Wang Z, Van Tassell CP, Williams JL, Taylor JF, and Moore SS: Whole genome linkage disequilibrium maps in cattle. *BMC Genetics* (2007) 8,74
- McMahon CD, Farr VC, Singh K, Weeler TT, and Davis SR: Decreased expression of beta1-integrin and focal adhesion kinase in epithelial cells may initiate involution of mammary glands. *Journal of Cell Physiology* (2004) 200, 318-325
- McMillen IC, Warnes KE, Adams MB, Robinson JS, Owens JA, and Coulter CL: Impact of restriction of placental and fetal growth on expression of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and type 2 messenger ribonucleic acid in the liver, kidney, and adrenal of the sheep fetus. *Endocrinology* (2000) 141, 539-543
- McPherron AC, Lawler AM, and Lee SJ: Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature* (1997) 387, 83-90
- McPherson JD, Dodgson J, Krumlauf R, and Pourquié O: Proposal to sequence the Genome of the Chicken. National Human Genome Research Institute (NIH), Bethesda, MD, USA, White Paper (2002) 1-10
- McRae AF, McEwan JC, Dodds KG, Wilson T, Crawford AM, and Slate J: Linkage disequilibrium in domestic sheep. *Genetics* (2002) 160, 1113-1122
- Medjugorac I, Kustermann W, Lazar P, Russ I, and Pirchner F: Marker-derived phylogeny of European cattle supports demic expansion of agriculture. *Animal Genetics* (1994) 25, Supplement 1, 19-27
- Meijering A: Dystocia and stillbirth in cattle - A review of causes, relations and implications. *Livestock Production Science* (1984) 11, 143-177
- Mellersh CS, Hitte C, Richman M, Vignaux F, Priat C, Jouquand S, Werner P, Andre C, DeRose S, Patterson DF, Ostrander EA, and Galibert F: An integrated linkage-radiation hybrid map of the canine genome. *Mammalian Genome* (2000) 11, 120-130
- Meuwissen THE: Accuracy of breeding values of 'unrelated' individuals predicted by dense SNP genotyping. *Genetics Selection Evolution* (2009) 41, 35
- Meuwissen THE: The Use of Marker Haplotypes in Animal Breeding Schemes. In: Conference 10 of the FAO Biotechnology Forum, Session II: Marker assisted selection in animals. Torino, Italy (2003). [www.fao.org/biotech/docs/Meuwissen.pdf]
- Meuwissen THE, Hayes BJ, and Goddard ME: Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics* (2001) 157: 1819-1829
- Meuwissen TH & Van Arendonk JA: Potential improvements in rate of genetic gain from marker-assisted selection in dairy cattle breeding schemes. *Journal of Dairy Science* (1992) 75, 1651-1659
- Meyerowitz EM, Guild GM, Prestidge LS, and Hogness DS: A new high-capacity cosmid vector and its use. *Gene* (1980) 11, 271-282
- MGD: Mouse Genome Database (URL 35)
- Miller RH, Clay JS, and Norman HD: Relationship of somatic cell score with fertility measures. *Journal of Dairy Science* (2001) 84, 2543-2548
- Miller SA, Dykes DD, and Polesky HF: A simple salting-out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* (1988) 16, 1215
- Min T: FISH techniques. *Methods in Molecular Biology* (2003) 220, 193-212
- Miner LL, Elmer GI, Pieper JO, and Marley RJ: Aggression modulates genetic influences on morphine analgesia as assessed using a classical Mendelian cross analysis. *Psychopharmacology (Berl)* (1993) 111, 17-22
- Miyata M, Gasparin G, Coutinho LL, Martinez ML, Machado MA, da Silva MVGB, Campos AL, Sonstegard TS, do Rosário MF, and de Almeida Regitano LC: Quantitative trait loci (QTL) mapping for growth traits on bovine chromosome 14. *Genetics and Molecular Biology* (2006) 30, 364-369
- Moazami-Goudarzi K, Laloë D, Furet JP, and Grosclaude F: Analysis of genetic relationships between 10 cattle breeds with 17 microsatellites. *Animal Genetics* (1997) 28, 338-345
- Monk M: Epigenetic programming of differential gene expression in development and evolution. *Developmental Genetics* (1995) 17,188-197

- Montaldo HH and Meza-Herrera CA: Use of molecular markers and major genes in the genetic improvement of livestock. *Journal of Biotechnology* (1998) 1, 83-89
- Montgomery GW and Kinghorn BP: Recent developments in gene mapping and progress towards marker-assisted selection in sheep. *Australian Journal of Agricultural Research* (1997) 48, 729-741
- Montgomery GW and Sise JA: Extraction of DNA from sheep white blood cells. *New Zealand Journal of Agricultural Research* (1990) 33, 437-441
- Moore SS, Barendse W, Berger KT, Armitage SM, and Hetzel DJ: Bovine and ovine DNA microsatellites from the EMBL and GENBANK databases. *Animal Genetics* (1992) 23, 463-467
- Moore SS, Byrne K, Berger KT, Barendse W, McCarthy F, Womack JE, and Hetzel DJS: Characterization of 65 bovine microsatellites. *Mammalian Genome* (1994) 5, 84-90
- Moore SS, Li C, Basarab J, Snelling WM, Kneeland J, Murdoch B, Hansen C, Benkel B: Fine mapping of quantitative trait loci and assessment of positional candidate genes for backfat on bovine chromosome 14 in a commercial line of *Bos taurus*. *Journal of Animal Science* (2003) 81, 1919-1925
- Morgan TH and Cattell E: Data for the study of sex-linked inheritance in *Drosophila*. *Journal of Experimental Zoology* (1912) 13, 79-101
- Mori N, Itoh N, and Salvaterra PM: Evolutionary origin of cholinergic macromolecules and thyroglobulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* (1987) 84, 2813-2817
- Morohashi K, Yoshioka H, Gotoh O, Okada Y, Yamamoto K, Miyata T, Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y, and Omura T: Molecular cloning and nucleotide sequence of DNA of mitochondrial cytochrome P-450 (11 beta) of bovine adrenal cortex. *Journal of Biochemistry (Tokyo)* (1987) 102, 559-568
- Morohashi K, Nonaka Y, Kirita S, Hatano O, Takakusu A, Okamoto M, and Omura T: Enzymatic activities of P-450(11 beta)s expressed by two cDNAs in COS-7 cells. *Journal of Biochemistry (Tokyo)* (1990) 107, 635-640
- Morris CA, Pitchford WS, Cullen NG, Hickey SM, Hyndman DL, Crawford AM, and Bottema CDK: Additive Effects of two Growth QTL on Cattle Chromosome 14. *Proceedings of the 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, (2002), Montpellier, France
- Morris AP, Whittaker JC, Xu CF, Hosking LK, and Balding DJ: Multipoint linkage-disequilibrium mapping narrows location interval and identifies mutation heterogeneity. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* (2003) 100, 13442-13446
- Mouw AR, Rice DA, Meade JC, Chua SC, White PC, Schimmer BP, Parker KL: Structural and functional analysis of the promoter region of the gene encoding mouse steroid 11 beta-hydroxylase. *Journal of Biological Chemistry* (1989) 264, 1305-1309
- Mouse Genome Sequencing Consortium: Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* (2002) 420, 520-562
- Mueller UG and Wolfenbarger LL: AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends in Ecology and Evolution* (1999) 14, 389-394
- Muhldorfer I and Hacker J: Genetic aspects of *Escherichia coli* virulence. *Microbial Pathogenesis* (1994) 16, 171-181
- Mellon SH, Bair SR, and Morris H: P450c11B3 mRNA, transcribed from a third p450c11 gene, is expressed in a tissuespecific, developmentally, and hormonally regulated fashion in the rodent adrenal and encodes a protein with both 11-hydroxylase and 18-hydroxylase activities. *Journal of Biochemistry (Tokyo)* (1995) 270, 1643-1649
- Muller J: Regulation of aldosterone biosynthesis: The end of the road? *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology. Supplement* 25, S79-S85
- Murphy WJ, Menotti-Raymond M, Lyons LA, Thompson MA, and O'Brien SJ: Development of a feline whole genome radiation hybrid panel and comparative mapping of human chromosome 12 and 22 loci. *Genomics* (1999) 57, 1-8
- Murray J, Buard J, Neil DL, Yeremian E, Tamaki K, Hollies C, and Jeffreys A: Comparative sequence analysis of human minisatellites showing meiotic instability. *Genome Research* (1999) 9, 130-136

- Muthusamy B and Pandey A: A roadmap of the mouse genome. *Trends in Genetics* (2002) 18, 553
- Nadeau JH: Single nucleotide polymorphisms: tackling complexity. *Nature* (2002) 420, 517-518
- Nadesalingam J, Plante Y, Gibson JP: Detection of QTL for milk production on Chromosomes 1 and 6 of Holstein cattle. *Mammalian Genome* (2001) 12, 27-31
- Nadler CF, Lyapunova EA, Hoffmann RS, Vorontsov NN, and Malygina NA: Chromosomal evolution in Holarctic ground squirrels (*Spermophilus*). 1. Giemsa-band homologies in *Spermophilus columbianus* and *S. unguates*. *Zeitschrift für Säugetierkunde* (1975) 40, 1-7
- Nadler CF, Lay DM, and Hassinger JD: Cytogenetic analysis of wild sheep populations in northern Iran. *Cytogenetics* 10, 137-152
- Nagy T, Wei H, Tang-Long S, Peng X, Liang CC, Gan B, and Guan JL: Mammary epithelial-specific deletion of Focal Adhesion Kinase gene leads to severe lobulo-alveolar hypoplasia and secretory immaturity of the murine mammary gland. *Journal of Biological Chemistry* (2007) 282, 31766-31776
- Naiki Y, Kawamoto T, Mitsuuchi Y, Miyahara K, Toda K, Oril T, Imura H, and Shizuta Y: A Nonsense Mutation (TGG[Trp116] → TAG [Stop] in CYP11B1 Causes Steroid 11 β -Hydroxylase Deficiency. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* (1993) 77, 1677-1682
- Nakamura Y: Isolation of p53-target genes and their functional analysis. *Cancer Science* (2004) 95, 7-11
- Nakashima H, Akahoshi M, Tanaka Y: Mutation detection using RT-PCR-RFLP. *Methods in Molecular Biology* (2003) 226, 319-322
- Nash DL, Rogers GW, Cooper JB, Hargrove GL, Keown JF, and Hansen LB: Heritability of clinical mastitis incidence and relationships with sire transmitting abilities for somatic cell score, udder type traits, productive life, and protein yield. *Journal of Dairy Science* (2000) 83, 2350–2360
- Näslund J, Fikse WF, Pielberg GR, and Lunden A: Frequency and Effect of the Bovine Acyl-CoA:Diacylglycerol Acyltransferase 1 (DGAT1) K232A Polymorphism in Swedish Dairy Cattle. *Journal of Animal Science* (2008) 91, 2127-2134
- Nebert DW and Gonzalez FJ: P450 Genes: Structure, Evolution, and Regulation. *Annual Review of Biochemistry* (1987) 56, 945-993
- Nei M: Genetic distance between populations. *The American Naturalist* (1972) 106, 283-292
- Nei M: Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* (1973) 70, 3321-3323
- Nei M, Maruyama T, and Chakraborty R: The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution* (1975) 29, 1-10
- Nei M: F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Annals of Human Genetics London* (1977) 41, 225-233
- Nei M: Relative roles of mutation and selection in the maintenance of genetic variability. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* (1988) 319, 615-629
- Nelson DR, Kamataki T, Waxman DJ, Guengerich FP, Estabrook RW, Feyereisen R, Gonzalez FJ, Coon MJ, Gunsalus IC, Gotoh O, Okuda K, and Nebert DW: The P450 Superfamily: Update on New Sequences, Gene Mapping, Accion Numbers, Early Trivial Names of Enzymes, and Nomenclature. *DNA and Cell Biology* (1993) 12, 1-51
- Nelson DR, Strobel HW: Evolution of cytochrome P-450 proteins. *Molecular Biology and Evolution* (1987) 4, 572-593
- Nevo E: Speciation: Chromosomal Mechanisms. *Encyclopedia of Life Science* (2001), 1-9
- Newton CR and Graham A: PCR. *Spectrum Berlin* (1994)
- Nicod JC and Largiadier CR: SNPs by AFLP (SBA): a rapid SNP isolation strategy for non-model organisms. *Nucleic Acids Research* (2003) 31, e19
- Nonaka Y, Okamoto M, Morohashi K, Kirita S, Hashimoto T, and Omura T: Functional expression of cDNAs for bovine 11 beta-hydroxylase-aldosterone synthases, P450(11 beta)-2 and -3 and their chimeras. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* (1992) 41, 779-80
- Nsengimana J, Baret P, Haley CS, and Visscher PM: Linkage Disequilibrium in the Domestic Pig. *Genetics* (2004a) 166, 1395-1404

- Nsengimana J and Baret J: Linkage disequilibrium and the genetic distance in livestock populations: the impact of inbreeding. *Genetics Selection Evolution* (2004b) 36, 281-296
- O'Brien SJ and Stanyon R: Ancestral primate viewed. *Nature* (1999) 402, 365-366
- Ovcharenko I, Boffelli D and Loots GG: eShadow: A Tool for Comparing Closely Related Sequences. *Genome Research* (2004) 14, 1191-1198
- Ogishima T, Mitani F, and Ishimura Y: Isolation of aldosterone synthase cytochrome P450 from zona glomerulosa mitochondria of rat adrenal cortex. *Journal of Biological Chemistry* (1989) 264, 10935-10938
- Ogishima T, Okada Y, Kominami S, Takemori S, and Omura T: Partial amino acid sequences of two mitochondrial and two microsomal cytochrome P-450's from adrenal cortex. *Journal of Biochemistry (Tokyo)* (1983) 94, 1711-1714
- Ohno S: *Evolution by Gene Duplication*. Allen and Unwin, London, UK (1970)
- Ohno S, Wolf U, and Atkin NB: Evolution from fish to mammals by gene duplication. *Hereditas* (1968) 59, 169-187
- Ollivier L: Scientific Challenges to Animal Breeding and Genetics. In: *From Jay Lush to Genomics: Visions For Animal Breeding and Genetics*, 16-18 May 1999, Ames, USA [edited by Dekkers JCM, Lamont SJ and Rothschild MF] *AgBiotechNet® Proceedings* 001 Paper 1.
- Olivier M: A haplotype map of the human genome. *Physiological Genomics* (2003) 13, 3-9
- Olivier M, Aggarwal A, Allen J, Almendras AA, Bajorek ES, Beasley EM, Brady SD, Bushard JM, Bustos VI, Chu A, Chung TR, De Witte A, Denys ME, Dominguez R, Fang NY, Foster BD, Freudenberg RW, Hadley D, Hamilton LR, Jeffrey TJ, Kelly L, Lazzeroni L, Levy MR, Lewis SC, Liu X, Lopez FJ, Louie B, Marquis JP, Martinez RA, Matsuura MK, Misherghi NS, Norton JA, Olshen A, Perkins SM, Perou AJ, Piercy C, Piercy M, Qin F, Reif T, Sheppard K, Shokoohi V, Smick GA, Sun WL, Stewart EA, Fernando J, Tejada, Tran NM, Trejo T, Vo NT, Yan SC, Zierten DL, Zhao S, Sachidanandam R, Trask BJ, Myers RM, Cox DR.: A high-resolution radiation hybrid map of the human genome draft sequence. *Science* (2001) 291, 1298-1302
- Omura T, Ishimura Y, and Fujii-Kuriyama Y: *Cytochrome P450*. 2nd Edition, Kodansha, Tokyo, Japan 1993
- O'Rourke K: And coming around the track looking promising ... the horse genome map. *Journal of the American Veterinary Medical Association* (2002) 221, 15-20
- Osoegawa K, Mammoser AG, Wu C, Frengen E, Zeng C, Catanese JJ, de Jong PJ: A bacterial artificial chromosome library for sequencing the complete human genome. *Genome Research* (2001) 11, 483-496
- Pagnacco G and Carta A: Animal breeding from infinitesimal model to MAS: the case of a backcross design in dairy sheep (Sarda x lacune) and its possible impact on selection. In: *Conference 10 of the FAO Biotechnology Forum, Session II: Marker assisted selection in animals*. Torino, Italy (2003). [www.fao.org/biotech/docs/PagnaccoCarta.pdf]
- Pál C and Hurst LD: Evidence for co-evolution of gene order and recombination rate. *Nature Genetics* (2003) 33, 392-395
- Pareek CS, Pareek RS, and Walawski K: Novel linkage mapping approach using DNA pooling in human and animal genetics. II. Detection of quantitative traits loci in dairy cattle. *Journal of Applied Genetics* (2002) 43, 309-318
- Park C, Russ I, Da Y, and Lewin HA: Genetic mapping of F13A to BTA23 by sperm typing: difference in recombination rate between bulls in the DYA-PRL interval. *Genomics* (1995) 27, 113-118
- Patton JL and Sherwood SW: Chromosome evolution and speciation in rodents. *Annual Review of Ecology and Systematics* (1983) 14, 139-158
- Pecon Slattery J and O'Brien SJ: Patterns of Y and X chromosome DNA sequence divergence during the Felidae radiation. *Genetics* (1998) 148, 1245-1255
- Pennacchio LA: Insights from human/mouse genome comparisons. *Mammalian Genome* (2003) 14, 429-436
- Pennisi E: Human genome. A low number wins the GeneSweep Pool. *Science* (2003) 300, 1484

- Pennisi E: Genomics. New sequence boosts rats' research appeal. *Science* (2004) 303, 455-458
- Pereira V: Gene history repeats itself. *Heredity* (2004) 93, 3-4
- Pevzner P and Tesler G: Human and mouse genomic sequences reveal extensive breakpoint reuse in mammalian evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* (2003) 100, 7672-7677
- Pfeffer, P: Le Mouflon de Corse (*Ovis ammon musimon* Schreber, 1792); position systématique, écologie et éthologie comparées. *Mammalia* (1967) 31, supplément
- Phillips MS, Lawrence R, Sachidanandam R, Morris AP, Balding DJ, Donaldson MA, Studebaker JF, Ankeney WM, Alfisi SV, Kuo FS, Camisa AL, Pazorov V, Scott K E, Carey BJ, Faith J, Katari G, Bhatti HA, Cyr JM, Derohannessian V, Elosua C, Forman AM, Grecco NM, Hock CR, Kuebler JM, Lathrop JA, Mockler MA, Nachtman EP, Restine SL, Varde SA, Hozza MJ, Gelfand CA, Broxholme J, Abecasis GR, Boyce-Jacino MT, and Cardon LR: Chromosome-wide distribution of haplotype blocks and the role of recombination hot spots. *Nature Genetics* (2003) 33, 382-387
- Pierce JC, Sauer B, and Sternberg N: A positive selection vector for cloning high molecular weight DNA by the bacteriophage P1 system: improved cloning efficacy. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* (1992) 89, 2056-2060
- Plante Y, Gibson JP, Nadesalingam J, Mehrabani-Yeganeh H, Lefebvre S, Vandervoort G, Jansen GB: Detection of quantitative trait loci affecting milk production traits on 10 chromosomes in Holstein cattle. *Journal of Dairy Science* (2001) 84, 1516-1524
- Popescu CP, Long S, Riggs P, Womack J, Schmutz S, Fries R, Gallagher DS: Standardization of cattle karyotype nomenclature: report of the committee for the standardization of the cattle karyotype. *Cytogenetics and Cell Genetics* (1996) 74, 259-61
- Porter V: *Cattle - A Handbook to the Breeds of the World*. Facts on File, Inc., New York, (1991), USA
- Porter V: *British Cattle*. Shire Publications, Princes Risborough, Bucks., (2001), UK
- Powell RL, Norman HD, and Sanders AH: Progeny Testing and Selection Intensity for Holstein Bulls in Different Countries. *Journal of Dairy Science* (2003) 86, 3386-3393
- Pray L: Researchers put linkage disequilibrium on the map. *The Scientist* (2003) 17, 30
- Primmer C, Saino N, Møller AP, and Ellegren H: Directional evolution in germline microsatellite mutation. *Nature Genetics* (1996) 13, 391-393
- Primmer CR, Raudsepp T, Chowdhary BP, Moller AP, and Ellegren H: Low frequency of microsatellites in the avian genome. *Genome Research* (1997) 7, 471-482
- Pryce JE, Royal MD, Garnsworthy PC, and Mao IL: Fertility in the high-producing dairy cow. *Livestock Production Science* (2004) 86, 125-135
- Pursley JR, Wiltbank MC, Stevenson JS, Ottobre JS, Garverick HA, and Anderson LL: Pregnancy rates per artificial insemination for cows and heifers inseminated at a synchronized ovulation or synchronized estrus. *Journal of Dairy Science* (1997) 80, 295-301
- Qian Y, Jin L, and Su B: Construction and characterization of bacterial artificial chromosome library of black-handed spider monkey (*Ateles geoffroyi*). *Genome* (2004) 47, 239-245
- Queller DC, Strassmann JE, and Hughes CR: Microsatellites and kinship. *Trends in Ecology Evolution* (1993) 8, 285
- Rauw WM, Kanis E, Noordhuizen-Stassen EN, and Grommers FJ: Undesirable side effects of selection for high production efficiency in farm animals: a review. *Livestock Production Science* (1998) 56, 15-33
- Raymond M and Rousset F: GENEPOP Version 1.2: population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* (1995) 86, 248-249
- Rebeiz M, Lewin HA: Compass of 47,787 cattle ESTs. *Animal Biotechnology* (2000) 11, 75-241
- Reif A and Lesch KP: Toward a molecular architecture of personality. *Behavior and Brain Research* (2003) 139, 1-20
- Renand G, Larzul C, Le Bihan-Duval E, Le Roy P: L'amélioration génétique de la qualité de la viande dans les différentes espèces: situation actuelle et perspectives à courte et moyen term. *INRA Production Animal* (2003) 16, 159-173

- Rexroad CE 3rd, Owens EK, Johnson JS, Womack JE: A 12,000 rad whole genome radiation hybrid panel for high resolution mapping in cattle: characterization of the centromeric end of chromosome 1. *Animal Genetics* (2000) 31, 262-265
- Reynolds WL, DeRouen TM, Moin S, Koonce KL: Factors influencing gestation length, birth weight and calf survival of Angus, Zebu and Zebu cross beef cattle. *Journal of Animal Science* (1980) 51, 860-867
- Rithidech K and Dunn JJ: Combining multiplex and touchdown PCR for microsatellite analysis. *Methods in Molecular Biology* (2003) 226, 295-300
- Rigby PWJ, Dieckmann M, Rhodes C, and Berg P: Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *Journal of Molecular Biology* (1977) 113, 237-251
- Riquet J, Coppeters W, Cambisano N, Arranz JJ, Berzi P, Davis SK, Grisart B, Farnir F, Karim L, Mni M, Simon P, Taylor JF, Vanmanshoven P, Wagenaar D, Womack JE, and Georges M: Fine-mapping of quantitative trait loci by identity by descent in outbred populations: application to milk production in dairy cattle. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* (1999) 96, 9252-9257
- Roberts RJ, Vincze T, Posfai J, Macelis D: REBASE: restriction enzymes and methyltransferases. *Nucleic Acids Research* (2003) 31, 418-420
- Roberson RL, Sanders JO, and Cartwright CT: Direct and maternal genetic effects on preweaning characters of Brahman, Hereford and Brahman-Hereford crossbred cattle. *Journal of Animal Science* (1986) 63, 438-446
- Robinson JAB, van der Voort G, Jansen GB, Byatt JC, Messer LA, Du FX, and Lohuis MM: Detection of QTL affecting milk production and conformation traits on six chromosomes in Holstein cattle. *Journal of Animal Science* (2003) 81, Supplement 1 (638)
- Robinson WP: The extent, mechanism, and consequences of genetic variation for recombination rate. *American Journal of Human Genetics* (1996) 116, 1175-1183
- Roche JF, Mackey D, Diskin MD: Reproductive management of postpartum cows. *Animal Reproduction Science* (2000) 60-61, 703-712
- Rodriguez-Zas SL, Southey BR, Heyen DW, Lewin HA: Interval and composite interval mapping of somatic cell score, yield, and components of milk in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* (2002a) 85, 3081-3091
- Rodriguez-Zas SL, Southey BR, Heyen DW, Lewin HA: Detection of quantitative trait loci influencing dairy traits using a model for longitudinal data. *Journal of Dairy Science* (2002b) 85, 2681-2691
- Rogel-Gaillard C, Bourgeaux N, Billault A, Vaiman M, Chardon P: Construction of a swine BAC library: application to the characterization and mapping of porcine type C endoviral elements. *Cytogenetics Cell Genetics* (1999) 85, 205-211
- Rogel-Gaillard C, Piumi F, Billault A, Bourgeaux N, Save JC, Urien C, Salmon J, Chardon P: Construction of a rabbit bacterial artificial chromosome (BAC) library: application to the mapping of the major histocompatibility complex to position 12q.1.1. *Mammalian Genome* (2001) 12, 253-255
- Rogers GW, Banos G, and Sander-Nielsen U: Genetic correlations among protein yield, productive life, and type traits from the United States and diseases other than mastitis from Denmark and Sweden. *Journal of Dairy Science* (1999) 82, 1331-1338
- Rogers GW and Hargrove GL: Absence of quadratic relationships between genetic evaluations for somatic cell scores and udder linear traits. *Journal of Dairy Science* (1993) 76, 3601-3606
- Rohlf EM, Louie DS, and Zeisel SH: Lipid synthesis and secretion by primary cultures of rat mammary epithelial cells. *Journal of Cell Physiology* (1993) 157, 469-480
- Rohrer GA, Alexander LJ, Keele JW, Smith TP, and Beattie CW: A microsatellite linkage map of the porcine genome. *Genetics* (1994) 136, 231-245
- Rohrer GA, Alexander LJ, Hu Z, Smith TP, Keele JW, and Beattie CW: A comprehensive map of the porcine genome. *Genome Research* (1996) 6, 371-391

- Rohrer GA, Beever JE, Rothschild MF, Schook L, Gibbs R, and Weinstock G: Porcine Genome Sequencing Initiative. Baylor College of Medicine, Human Genome Sequencing Center. White Paper (2004) 1-10
- Ron M, Heyen DW, Band M, Feldmesser E, Ochramenko H, Da Y, Wiggans GR, van Raden RM, Weller JL, and Lewin HA: Detection of individual loci affecting economic traits in the USA Holstein population with the aid of DNA microsatellites. Proceedings of the 25th Conference of the International Society of Animal Genetics (ISAG), Tours (1996), *Animal Genetics* 27, 105 (E017)
- Ron M, Heyen DW, Weller JL, Band M, Feldmesser E, Pasternak H, Da Y, Wiggans GR, Vanraden PM, Ezra E, and Lewin HA: Detection and analysis of a locus affecting milk concentration in the US and Israeli dairy cattle population. Proceedings of the 6th World Congress of Genetics and Applied Livestock Production Armindale, Australia (1998) 26, 422-425
- Ron M, Domochofsky R, Golik M, Seroussi E, Ezra E, Shturman C, and Weller JL: Analysis of Vaginal Swabs for Paternity Testing and Marker-Assisted Selection in Cattle. *Journal of Dairy Science* (2003) 86, 1818-1820
- Roschlau K, Kuwer A, Michaelis U, Kuhnt C, Roschlau D, Poppe P, and Reineke J: Wichtiges Instrument für die Rinderzucht - Embryotransfer wird 30 Jahre alt... 32. Jahrestagung der deutschsprachigen Arbeitsgemeinschaft Embryotransfer (AET-d) (2005), Neumünster
- Rosler A and White PC: Mutations in human 11 beta-hydroxylase genes: 11 beta-hydroxylase deficiency in Jews of Morocco and corticosterone methyl-oxidase II deficiency in Jews of Iran. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* (1993) 45, 99-106
- Rothschild MF and Soller M: Candidate gene analysis to detect traits of economic importance in domestic livestock. *Probe* (1997) 8, 13
- Royle NJ, Clarkson RE, Wong Z, and Jeffreys AJ: Clustering of hypervariable minisatellites in the proterminal regions of human autosomes. *Genomics* (1988) 3, 352-360
- Rozen S and Skaletsky HJ: Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S and Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, USA (2000)
- Ruane J and Colleau JJ: Marker assisted selection for genetic improvement of animal populations when a single QTL is marked. *Genetic Research* (1995) 66, 71-83
- Rubinsztein DC, Amos W, Leggo J, Goodburn S, Jain S, Li SH, Margolis RL, Ross CA, and Ferguson-Smith MA: Microsatellite evolution - evidence for directionality and variation in rate between species. *Nature Genetics* (1995) 10, 337-343
- Rukkwamsuk T, Kruip TA, and Wensing T: Relationship between overfeeding and overconditioning in the dry period and the problems of high producing dairy cows during the postparturient period. *Veterinary Quarterly* (1999) 21, 71-77
- Ruley JD: Paracel's New Search Tool Makes Sequence Alignment a BLAST. *The Scientist* (2004) 18, (15) 49
- Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD, Marth G, Sherry S, Mullikin JC, Mortimore BJ, Willey DL, Hunt SE, Cole CG, Coggill PC, Rice CM, Ning Z, Rogers J, Bentley DR, Kwok PY, Mardis ER, Yeh RT, Schultz B, Cook L, Davenport R, Dante M, Fulton L, Hillier L, Waterston RH, McPherson JD, Gilman B, Schaffner S, Van Etten WJ, Reich D, Higgins J, Daly MJ, Blumenstiel B, Baldwin J, Stange-Thomann N, Zody MC, Linton L, Lander ES, Altshuler D; International SNP Map Working Group: A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*. (2001) 409, 928-933
- Saiki RK, Scharf SJ, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, and Arnheim N: Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction analysis for diagnosis of sickle-cell anemia. *Science* (1985) 230, 1350-1354
- Saitou N and Nei M: The Neighbour-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Molecular Biology and Evolution* (1987) 4, 406-425
- Sambrook J, Fritsch FF, Maniatis T: *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd edition. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York

- Sanchez JJ, Borsting C, Hallenberg C, Buchard A, Hernandez A, and Morling N: Multiplex PCR and minisequencing of SNPs--a model with 35 Y chromosome SNPs. *Forensic Science International* (2003) 137, 74-84
- Sanger F, Nicklen S, and Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* (1977) 74, 5463-5467
- Sankoff D: Comparative Mapping and Genome Rearrangement. In: *From Jay Lush to Genomics: Visions For Animal Breeding and Genetics*, 16-18 May 1999, Ames, USA [edited by Dekkers JCM, Lamont SJ and Rothschild MF] AgBiotechNet® Proceedings 001 Paper 11.
- Sax K: The association of size differences with seed-coat pattern and pigmentation in *Phaseolus vulgaris*. *Genetics* (1923) 8, 552-560
- Schaeffer LR, Reents R, and Jamrozik J: Factors influencing international comparisons of dairy sires. *Journal of Dairy Science* (1996) 79, 1108-1116
- Schaeffer LR: Strategy for applying genome-wide selection in dairy cattle. *Journal of Animal Breeding* (2006) 123, 218-223
- Schaeffer LR: Multiple trait international bull comparison. *Livestock Production Science* (2001) 69, 145-153
- Scheetz TE, Raymond MR, Nishimura DY, McClain A, Roberts C, Birkett C, Gardiner J, Zhang J, Butters N, Sun C, Kwitek-Black A, Jacob H, Casavant TL, Soares MB, Sheffield VC.: Generation of a high-density rat est map. *Genome Research* (2001) 11, 497-502
- Schibler L, Vaiman D, Oustry A, Giraud-Delville C, and Cribiu EP: Comparative Gene Mapping: A Fine-Scale Survey of Chromosome Rearrangements between Ruminants and Humans. *Genome Research* (1998) 8, 901-915
- Schibler L, Roig A, Mahe MF, Save JC, Gautier M, Taourit S, Boichard D, Eggen A, and Cribiu EP: A first generation bovine BAC-based physical map. *Genetics Selection Evolution* (2004) 36, 105-122
- Schibler L, Vaiman D, Oustry A, Guinec N, Dangy-Caye AL, Billault A, Cribiu EP: Construction and extensive characterization of a goat bacterial artificial chromosome library with threefold genome coverage. *Mammalian Genome* (1998) 9, 119-124
- Schlaepfer DD and Mitra SK: Multiple connections link FAK to cell motility and invasion. *Current Opinion in Genetics and Development* (2004) 14, 92-101
- Schlötterer C: The evolution of molecular markers - just a matter of fashion? *Nature Reviews Genetics* (2004) 5, 63-69
- Schlötterer C and Tautz D: Slippage synthesis of simple dequence DNA. *Nucleic Acids Research* (1992) 20, 211-215
- Schlötterer C and Pemberton J: The use of microsatellites for genetic analysis of natural populations - a critical review. In: DeSalle R and Schierwater B [eds.] *Molecular approaches to individuals, populations and species*. Verlag Birkhäuser, Basel, CH (1998)
- Schlötterer C: Hitchhiking mapping - functional genomics from the population genetics perspective. *Trends in Genetics* (2003) 19, 32-38
- Schmid M, Nanda I, Guttenbach M, Steinlein C, Hoehn M, Scharl M, Haaf T, Weigend S, Fries R, Buerstedde JM, Wimmers K, Burt DW, Smith J, A'Hara S, Law A, Griffin DK, Bumstead N, Kaufman J, Thomson PA, Burke T, Groenen MA, Crooijmans RP, Vignal A, Fillon V, Morisson M, Pitel F, Tixier-Boichard M, Ladjali-Mohammedi K, Hillel J, Maki-Tanila A, Cheng HH, Delany ME, Burnside J, and Mizuno S: First report on chicken genes and chromosomes 2000. *Cytogenetics and Cell Genetics* (2000) 90, 169-218
- Schmitt J and Ulbrich F: Die Chromosomen verschiedener Caprini Simpson, 1945. *Zeitschrift für Säugetierkunde* (1968) 33, 180-186
- Schrooten C, Bovenhuis H, Coppieters W, and Van Arendonk JAM: Whole Genome Scan to detect Quantitative Trait Loci for Conformation and Functional Traits in Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science* (2000) 83, 795-806
- Schuler G, Hartung F, and Hoffmann B: Investigations on the use of C-21-steroids as precursors for placental oestrogen synthesis in the cow. *Experimental and Clinical Endocrinology* (1994) 102, 169-174.

- Schwenger B, Schober S, and Simon D: DUMPS cattle carry a point mutation in the uridine monophosphate synthase gene. *Genomics* (1993) 16, 241-244
- Schwerin M, Brockmann G, Vanselow J, and Seyfert HM: Perspectives of molecular genome analysis in livestock improvement. *Archiv für Tierzucht* (1995) 38, 21-31
- Schwerin M: Struktur und Funktion von Genen beim Nutztier. 18. Hülsenberger Gespräche, Schriftenreihe der H. Wilhelm Schaumann Stiftung (2000) 18, 28-34
- Schwerin M, Kühn CH, Brunner R, Goldammer T, Bennewitz J, Reinsch N, Xu N, Thomsen H, Looft C, Weimann C, Hiendleder S, Erhardt G, Medjugorac I, Förster M, Brenig B, Reinhardt F, Reents R, Russ I, Averdunk G, Blümel J, Kalm E: QTL mapping and mining functional candidate genes affecting health – the German ADR QTL Dairy Cattle Project. Presented at the Conference „Gene polymorphisms affecting health and production traits in farm animals” (2003), Jastrzębiec, Poland
- Schwerin M, Fries R, Simianer H, Swalve H, and Wimmers K: Die strukturelle und funktionelle Genomanalyse, neue Wege zum Verstehen des Phänotyps. Stand und Perspektiven. Arbeitsgruppe der Deutschen Gesellschaft für Züchtungskunde e.V. (DGfZ), Bonn (2006)
[www.dgfz-bonn.de/die_strukturelle_und_funktionelle_genomanalyse__ne.html]
- Seaton G, Haley CS, Knott SA, Kearsley M, Visscher PM: QTL Express: mapping quantitative trait loci in simple and complex pedigrees. *Bioinformatics* (2002) 18, 339-340
- Sgrò CM and Hoffmann AA: Genetic correlations, tradeoffs and environmental variation. *Heredity* (2004) 93, 241- 248
- Sham P, Bader JS, Craig I, O'Donovan M, and Owen M: DNA Pooling: a tool for large-scale association studies. *Nature Reviews Genetics* (2002) 3, 862-871
- Sharma D, Issac B, Raghava GP, Ramaswamy R: Spectral Repeat Finder (SRF): identification of repetitive sequences using Fourier transformation. *Bioinformatics* (2004) Feb 19 [Epub ahead of print]
- She K: So you want to work with Giants: The BAC Vector. *BioTeach Journal* (2003) 1, 69-74
- Shi LM, Ye YY, Duan XS, and Chen YZ: Comparative cytogenetic studies on the red deer, the Chinese deer and their hybrids. *Acta Genetica Sinica* (1979) 6, 72
- Shimmin LC, Chang BH, and Li WH: Male-driven evolution of DNA sequences. *Nature* (1993) 362, 745-747
- Shimono M, Condon J, Whorwood CB, and Stewart PM: Adrenal 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Endocrine Research* (1996a) 22, 771-780
- Shimono M, Whorwood CB, and Stewart PM: 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase in the rat adrenal. *Journal of Molecular Endocrinology* (1996b) 17, 121-130
- Shizuya H, Birren B, Kim U, Mancino V, Slepá T, Tachiiri Y, and Simon MI: Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* (1992) 89, 8794-8797
- Short TH, Lawlor TJ: Genetic parameters of conformation traits, milk yield, and herd life in Holsteins. *Journal of Dairy Science* (1992) 75, 1987-1998
- Shpigel NY, Chen R, Avidar Y, and Bogin E: Use of corticosteroids alone or combined with glucose to treat ketosis in dairy cows. *Journal of the American Veterinary Medical Association* (1996) 208, 1702-1704
- Shuster DE, Kehrlí ME Jr, Ackermann MR, and Gilbert RO: Identification and prevalence of a genetic defect that causes leukocyte adhesion deficiency in Holstein cattle. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* (1992) 89, 9225-9229
- Sigurdsson A & Banos G: Dependent Variables in International Sire Evaluations. *Acta Agriculturae Scandinavica. Section A, Animal science* (1995) 45, 209-217
- Silveira da Mota LSL and Bicudo da Silva RA: Centric fusion in goats (*Capra hircus*): Identification of a 6/15 translocation by high resolution chromosome banding. *Genetics and Molecular Biology* (1998) 21, 1-7
- Silver LM: *Mouse Genetics*. Oxford University Press, Oxford, UK (1995)
- Simianer H, Szyda J, Ramon G, and Lien S: Evidence for individual and between family variability of the recombination rate in cattle. *Mammalian Genome* (1997) 8, 830-835

- Simillion C, Vandepoele K, Van Montagu MC, Zabeau M, and Van de Peer Y : The hidden duplication past of *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* (2002) 99, 13627-13632
- Simm G: *Genetic Improvement of Cattle and Sheep*. Farming Press, Ipswich, UK (1998)
- Sirard MA, Dufort I, Coenen K, Tremblay K, Massicotte L, and Robert C: The use of genomics and proteomics to understand oocyte and early embryo functions in farm animals. *Reproduction* (2003) Supplement 61, 117-129
- Slate J, Marshall T, and Pemberton J: A retrospective assessment of the accuracy of the paternity inference program CERVUS. *Molecular Ecology* (2000) 9, 801-808
- Smith HW: Survival of orally administered *E. coli* K 12 in alimentary tract of man. *Nature* (1975) 255, 500-502
- Smith SJ, Cases S, Jensen DR, Chen HC, Sande E, Tow B, Sanan DA, Raber J, Eckel RH, and Farese RV Jr: Obesity resistance and multiple mechanisms of triglyceride synthesis in mice lacking DGAT. *Nature Genetics* (2000) 25, 87-90
- Smith J, Paton IR, Bruley CK, Windsor D, Burke D, Ponce de Leon FA, and Burt DW: Integration of the genetic and physical maps of the chicken macrochromosomes. *Animal Genetics* (2000) 31, 20-27
- Smith J and Burt DW: Parameters of the chicken genome (*Gallus gallus*). *Animal Genetics* (1998) 29, 290-294
- Smith M and Szathmáry E: The origine of chromosomes. I Selection for Linkage. *Journal of theoretical Biology* (1993) 164, 437-446
- Smith TB, Wayne RK, Girman DJ, and Bruford MW: A role for ecotones in generating rainforest biodiversity. *Science* (1997) 276, 1855-1857
- Smith TP, Lopez-Corrales NL, Kappes SM, and Sonstegard TS: Myostatin maps to the interval containing the bovine mh locus. *Mammalian Genome* (1997) 8, 742-744
- Smith LM, Sanders JZ, Kaiser RJ, Hughes P, Dodd C, Connell CR, Heiner C, Kent SB, Hood LE: Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* (1986) 321(6071):674-679
- Smouse PE and Chevillon C: Analytical aspects of population-specific DNA fingerprinting for individuals. *Journal of Heredity* (1998) 89, 143-150
- Solinas-Toldo S, Lengauer C, und Fries R.: Comparative genome map of human and cattle. *Genomics* (1995) 27,489-496
- Soller M and Medjugorac I: A Successful Marriage: Making the Transition from Quantitative Trait Locus Mapping to Marker-Assisted Selection. In: *From Jay Lush to Genomics: Visions For Animal Breeding and Genetics*, 16-18 May 1999, Ames, USA [edited by Dekkers JCM, Lamont SJ and Rothschild MF] *AgBiotechNet® Proceedings 001 Paper 7*.
- Soller M and Beckmann JS: Towards an understanding of the genetic basis of trypanotolerance in the N'Dama cattle of West Africa. Consultation Report submitted to FAO (1987), Rom, Italy
- Sonesson AK: Possibilities for Marker-Assisted Selection in Fish Breeding Schemes. In: *Conference 10 of the FAO Biotechnology Forum, Session II: Marker assisted selection in animals*. Torino, Italy (2003). [www.fao.org/biotech/docs/Sonesson.pdf]
- Sonesson AK and Meuwissen THE: Testing strategies for genomic selection in aquaculture breeding programs. *Genetics Selection Evolution* (2009) 41, 37
- Sorensen AC, Pong-Wong R, Windig JJ, and Woolliams JA: Precision of methods for calculating identity-by-descent matrices using multiple markers. *Genetics Selection Evolution* (2002) 34, 557-579
- Spalting RW, Everett RE, and Foote RH: Fertility in New York artificially inseminated Holstein herds in dairy herd improvement. *Journal of Dairy Science* (1974) 58, 718-723
- Spelman RJ, Ford CA, McElhinney P, Gregory GC, and Snell RG: Characterization of the DGAT1 Gene in the New Zealand Dairy Population. *Journal of Dairy Science* (2002) 85, 3514-3517
- Spelman RJ, Garrick DJ, and van Arendonk JAM: Utilisation of genetic variation by marker assisted selection in commercial dairy cattle populations. *Livestock Production Science* (1999) 59, 51-60

- Spelman RJ, Huisman AE, Singireddy SR, Coppieters W, Arranz J, Georges M, and Garrick DJ: Short Communication: Quantitative trait loci analysis on seventeen nonproduction traits in the New Zealand dairy population. *Journal of Dairy Science* (1999) 82, 2514-2516
- Spelman RJ, Coppieters W, Karim I, van Arendonk JAM, and Bovenhuis H: Quantitative trait loci analysis for five milk production traits on autosome six in the Dutch Holstein-Friesian population. *Genetics* (1996) 144:1799–1808
- Stella A, Lohuis MM, Pagnacco G, and Jansen GB: Strategies for continual application of marker-assisted selection in an open nucleus population. *Journal of Dairy Science* (2002) 85, 2358-2367
- Stefanová I, Horejsí V, Ansotegui IJ, Knapp W, Stockinger H: GPI-anchored cell-surface molecules complexed to protein tyrosine kinases. *Science* (1991) 254(5034), 1016-9
- Steven P, Suchyta S, Sipkovsky R, Kruska AJA, McNulty MJ, Coussens RJ, Tempelman RGH, Peter MS, Dale E, Bauman YR, Boisclair JL, Burton RJ, Collier EJ, DePeters TA, Ferris MC, Lucy MA, McGuire JF, Medrano TR, Overton TP, Smith GW, Smith TS, Sonstegard JN, Spain DE, Spiers JY, and Coussens PM: Development and testing of a high-density cDNA microarray resource for cattle. *Physiological Genomics* (2003) 15, 158-164
- Stangassinger M: Physiologische Grundlagen von Merkmalsantagonismen. *Hülsenberger Gespräche* 2006, Schriftenreihe der H. Wilhelm Schaumann Stiftung, Hamburg, 48-66
- Stone RT, Keele JW, Shackelford SD, Kappes SM, Koohmaraie M: A primary screen of the bovine genome for quantitative trait loci affecting carcass and growth traits. *Journal of Animal Science* (1999) 77, 1379-1384
- Storz G: An expanding universe of noncoding RNAs. *Science* (2002) 296, 1260-1263
- Stothard P: The Sequence Manipulation Suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *Biotechniques* (2000) 28, 1102-1104
- Strachan T and Read AP: *Human Molecular Genetics 2*. BIOS Scientific Publishers, Oxford, Oxon., UK (1999)
- Stroncek DF, Caruccio L, Bettinotti M: CD177: A member of the Ly-6 gene superfamily involved with neutrophil proliferation and polycythemia vera. *Journal of Translational Medicine* (2004) 2, 8
- Stryer L: *Biochemistry*, 4th edition, WH Freeman and Company, New York, (1999), USA
- Sturtevant AH: *A History of Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA (1967) [www.esp.org]
- Stylianou IM, Christians JK, Keightley PD, Bunger L, Clinton M, Bulfield G, and Horvat S: Genetic complexity of an obesity QTL (Fob3) revealed by detailed genetic mapping. *Mammalian Genome* (2004) 15, 472-481
- Subramanian S and Kumar S: Neutral substitutions occur at a faster rate in exons than in noncoding DNA in primate genomes. *Genome Research* (2003) 13, 838-844
- Suchyta SP, Sipkovsky S, Halgren RG, Kruska R, Elftman M, Weber-Nielsen M, Vandehaar MJ, Xiao L, Tempelman RJ, and Coussens PM: Bovine mammary gene expression profiling using a cDNA microarray enhanced for mammary-specific transcripts *Physiological Genomics* (2003) 16, 8-18
- Suggs SV, Wallace RB, Hirose T, Kawashima EH, and Itakura K: Use of synthetic oligonucleotides as hybridization probes: isolation of cloned cDNA sequences for human beta 2-microglobulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* (1981) 78, 6613-6617
- Sun T, Zhao Y, Nonaka Y, Okamoto M. Cloning and expression of cytochrome P450(11 beta) of porcine adrenal cortex. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* (1995) 52, 227-232
- Suzuki K, Asakawa S, Iida M, Shimanuki S, Fujishima N, Hiraiwa H, Murakami Y, Shimizu N, Yasue H: Construction and evaluation of a porcine bacterial artificial chromosome library. *Animal Genetics* (2000) 31, 8-12
- Switonski M, Szczerbal I, and Nowacka J: The dog genome map and its use in mammalian comparative genomics. *Journal of Applied Genetics* (2004) 45, 195-214

- Switonski M: Molecular genetics in beef cattle breeding - a review. *Animal Science Papers and Reports* (2002) 20, Supplement 1, 7-18
- Syvanen AC: Accessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nature Reviews Genetics* (2001) 2, 930-942
- Szathmary E and Smith JM: The evolution of chromosomes. II Molecular mechanism. *Journal of theoretical Biology* (1993) 164, 447-454
- Szyda J, Liu Z, Maschka R, Reinhardt F, and Reents R: Computer system for routine QTL detection and genetic evaluation under a mixed inheritance model in dairy cattle. *Proceedings of the 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, (2002), Montpellier, France, 749-750
- Szyda J, Liu Z, Reinhardt F, and Reents R: Incorporation of QTL information into routine estimation of breeding values for German Holstein dairy cattle. *54th Annual meeting of the European Association for Animal Production - EAAP*, (2003), Rome, Italy
- Takagi Y, Omura T, and Go M: Evolutionary origin of thyroglobulin by duplication of esterase gene. *FEBS Letters* (1991) 282, 17-22
- Takano A, Mizoshita K, Nagai S, Tatsuda K, Mizoguchi Y, Takasuga A, and Sugimoto Y: A 1.4 Mb-critical region for carcass weight QTL on BTA 14 (CW-1) identified in Japanese black cattle population using IBD-based analysis and association study. *Proceedings 29th ISAG, International Conference on Animal Genetics*, Tokio, Japan, 2004, (F044), Abstracts, p. 136
- Takeda J and Kinoshita T: GPI-anchor biosynthesis. *Trends in Biochemical Science* (1995) 20, 367-71
- Tantia MS, Vijn RK, Mishra BP, Mishra B, Kumar STB, and Sodhi M: DGAT1 and ABCG2 polymorphism in Indian cattle (*Bos indicus*) and buffalo (*Bubalus bubalis*) breeds. *BMC Veterinary Research* (2006) 2, 32-37
- Tatusova TA and Madden TL: Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. *FEMS Microbiology Letters* (1999) 174, 247-250
- Tautz D, Trick M, and Dover GA: Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation. *Nature* (1986) 322, 652-656
- Tautz D: Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research* (1989) 17, 6434-6471
- Tautz D and Schlötterer C: Simple sequences. *Current Opinion in Genetics and Development* (1994) 4, 832-837
- Taymans SE, Pack S, Pak E, Torpy DJ, Zhuang Z, Stratakis CA: Human CYP11B2 (aldosterone synthase) maps to chromosome 8q24.3. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* (1998) 83, 1033-1036
- Teichmann SA and Babu MM: Gene regulatory network growth by duplication. *Nature Genetics* (2004) 36, 492-496
- Tellier R, Bukh J, Emerson SU, and Purcell RH: Long PCR methodology. *Methods in Molecular Biology* (2003) 226:173-8 2003
- Thach DC, Lin B, Walter E, Kruselock R, Rowley RK, Tibbetts C, and Stenger DA: Assessment of two methods for handling blood in collection tubes with RNA stabilizing agent for surveillance of gene expression profiles with high density microarrays. *Journal of Immunological Methods* (2003) 283, 269-279
- Thaller G: *Praktische Bedeutung der molekularen Tierzucht*. 21. Hülsenberger Gespräche (2006) Lübeck
- Thaller G & Fries R: Einfluss der Kandidatengene DGAT1 und Thyroglobulin auf den intramuskulären Fettgehalt beim Rind. *Vortragsfolien* (2004). Online Publikation der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft -Tierzucht [www.lfl.bayern.de/itz/schwein/08415/linkurl_0_1.pdf]
- Thaller G, Kramer W, Winter A, Kaupe B, Erhardt G, and Fries R: Effects of DGAT1 variants on milk production traits in German cattle breeds. *Journal of Animal Science* (2003) 81, 1911-1918
- Thaller G, Kühn C, Winter A, Ewald G, Bellmann O, Wegner J, Zuhlke H, and Fries R: DGAT1, a new positional and functional candidate gene for intramuscular fat deposition in cattle. *Animal Genetics* (2003) 34, 354-357

- Thein SL and Wallace RB: The use of synthetic oligonucleotides as specific hybridization probes in the diagnosis of genetic disorders. In: Davis KE (ed) *Human Genetic diseases: A practical approach*. IRL Press, Herson, VA, USA (1986)
- Thibier M and Wagner HG: World statistics for artificial insemination in cattle. *Livestock Production Science* (2002) 74, 203-212
- Thomas CA: The genetic organization of chromosomes. *Annual Review of Genetics* (1971) 5, 237-256
- Thomas JW, Prasad AB, Summers TJ, Lee-Lin SQ, Maduro VV, Idol JR, Ryan JF, Thomas PJ, McDowell JC, Green ED: Parallel construction of orthologous sequence-ready clone contig maps in multiple species. *Genome Research* (2002) 12, 1277-1285
- Thomas JW, Touchman JW, Blakesley RW, Bouffard GG, Beckstrom-Sternberg SM, Margulies EH, Blanchette M, Siepel AC, Thomas PJ, McDowell JC, Maskeri B, Hansen NF, Schwartz MS, Weber RJ, Kent WJ, Karolchik D, Bruen TC, Bevan R, Cutler DJ, Schwartz S, Elnitski L, Idol JR, Prasad AB, Lee-Lin SQ, Maduro VV, Summers TJ, Portnoy ME, Dietrich NL, Akhter N, Ayele K, Benjamin B, Cariaga K, Brinkley CP, Brooks SY, Granite S, Guan X, Gupta J, Haghighi P, Ho SL, Huang MC, Karlins E, Laric PL, Legaspi R, Lim MJ, Maduro QL, Masiello CA, Mastrian SD, McCloskey JC, Pearson R, Stantripop S, Tiongson EE, Tran JT, Tsurgeon C, Vogt JL, Walker MA, Wetherby KD, Wiggins LS, Young AC, Zhang LH, Osoegawa K, Zhu B, Zhao B, Shu CL, De Jong PJ, Lawrence CE, Smit AF, Chakravarti A, Haussler D, Green P, Miller W, Green ED: Comparative analyses of multi-species sequences from targeted genomic regions. *Nature* (2003a) 424, 788-793
- Thomas JW, Schueler MG, Summers TJ, Blakesley RW, McDowell JC, Thomas PJ, Idol JR, Maduro VV, Lee-Lin SQ, Touchman JW, Bouffard GG, Beckstrom-Sternberg SM, and Green ED: Pericentromeric duplications in the laboratory mouse. *Genome Research* (2003b) 13, 55-63.
- Thomsen H, Reinsch N, Xu N, Looft C, Gruppe S, Kühn C, Brockmann GA, Schwerin M, Leyhe-Horn B, Hiendleder S, Erhardt G, Medjugorac I, Russ I, Förster M, Brenig B, Reinhardt F, Reents R, Blümel J, Averdunk G, and Kalm E: A male linkage map for the ADR granddaughter design. *Journal of Animal Breeding and Genetics* (2000) 117, 289-306
- Thomsen H, Reinsch N, Xu N, Bennewitz J, Looft C, Grupe S, Kühn C, Brockmann GA, Schwerin M, Leyhe-Horn B, Hiendleder S, Erhardt G, Medjugorac I, Russ I, Förster M, Brenig B, Reinhardt F, Reents R, Blümel J, Averdunk G, and Kalm: A whole genome scan for differences in recombination rates among three *Bos taurus* breeds. *Mammalian Genome* (2001a) 12, 724-728
- Thomsen H, Reinsch N, Xu N, Looft C, Gruppe S, Kühn C, Brockmann GA, Schwerin M, Leyhe-Horn B, Hiendleder S, Erhardt G, Medjugorac I, Russ I, Förster M, Brenig B, Reinhardt F, Reents R, Blümel J, Averdunk G, and Kalm E: Comparison of estimated breeding values, daughter yield deviations and de-regressed proofs within a whole genome scan for QTL. *Journal of Animal Breeding and Genetics* (2001b) 118, 357-370
- Torrents D, Suyama M, Zdobnov E, Bork P: A genome-wide survey of human pseudogenes. *Genome Research* (2003) 12, 2559-2567
- Tost J, Brandt O, Boussicault F, Derbala D, Caloustian C, and Lechner D: Gut I G Molecular haplotyping at high throughput. *Nucleic Acids Research* (2002) 30, e96
- Trappmann W und Tholen E: Markergestützte Selektion in Nutztierzuchtprogrammen. Vortrag anlässlich der 51. Hochschultagung der Landwirtschaftlichen Fakultät der Universität Bonn (1999)
- Troy CS, MacHugh DE, Bailey JF, Magee DA, Loftus RT, Cunningham P, Chamberlain AT, Sykes BC, and Bradley DG: Genetic evidence for Near-Eastern origins of European cattle. *Nature* (2001) 410, 1088-1091
- Tsuji S, Itoh K, Sasazaki S, Mannen H, Oyama K, Shoji M, Mukai F: An association study using AFLP markers and application to a beef cattle breeding population. *Animal Genetics* (2004) 35, 40-43

- Turri MG, Henderson ND, DeFries JC, and Flint J: Quantitative trait locus mapping in laboratory mice derived from a replicated selection experiment for open-field activity. *Genetics* (2001) 158, 1217-1226
- Udenfriend S and Kodukula K: How glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins are made. *Annual Reviews in Biochemistry* (1995) 64, 563-91
- Ueda K, Miyoshi Y, Tokino T, Watatani M, and Nakamura Y: Induction of apoptosis in T98G glioblastoma cells by transfection of GML, a p53 target gene. *Oncology Research* (1999) 11, 125-132
- Ussery DW and Hallin PF: Genome Update: AT content in sequenced prokaryotic genomes. *Microbiology* (2004) 150, 749-752
- Vaiman D, Schibler L, Bourgeois F, Oustry A, Amigues Y, and Crihiu EP: A genetic linkage map of the male goat genome. *Genetics* (1996) 144, 279-305
- Vaiman D, Billault A, Tabet-Aoul K, Schibler L, Vilette D, Oustry-Vaiman A, Soravito C, Crihiu EP: Construction and characterization of a sheep BAC library of three genome equivalents. *Mammalian Genome* (1999) 10, 585-587
- Valdes AM, Slatkin M, and Freimer NB: Allele frequencies at microsatellite loci: the stepwise mutation model revisited. *Genetics* (1993) 133, 737-49
- Van der Beek: Estimating the Between Country Genetic Correlation Using Four Different Methods. *Interbull Bulletins* 16 (1997)
- Van Deynze AE, Dubcovsky J, Gill KS, Nelson JC, Sorrells ME, Dvorak J, Gill BS, Lagudah ES, McCouch SR, and Appels R: Molecular-genetic maps for chromosome 1 in Triticeae species and their relation to chromosomes in rice and oats. *Genome* (1995) 38, 47-59
- Van Eenennaam AL: DNA Based Biotechnologies. University of California, Davis (2204) [animalscience.ucdavis.edu/animalbiotech/Outreach/]
- Van Etten WJ, Steen RG, Nguyen H, Castle AB, Slonim DK, Ge B, Nusbaum C, Schuler GD, Lander ES, Hudson TJ.: Radiation hybrid map of the mouse genome. *Nature Genetics* (1999) 22, 384-387
- Van Heelsum AM, Haley CS, and Visscher PM: Marker-assisted introgression using non-unique marker alleles II: selection on probability of presence of the introgressed allele. *Animal Genetics* (2003) 28, 188-194
- VanRaden PM and Wiggans GR: Derivation, calculation, and use of national animal model information. *Journal of Dairy Science* (1991) 74, 2737-2746
- Van Tassell CP, Ashwell MS, Sonstegard TS: Detection of putative loci affecting milk, health, and conformation traits in a US Holstein population using 105 microsatellite markers. *Journal of Dairy Science* (2000) 83, 1865-1872
- Veerkamp RF, Beerda B, and van der Lende T: Effects of genetic selection for milk yield on energy balance, levels of hormones, and metabolites in lactating cattle, and possible links to reduced fertility. *Livestock Production Science* (2003) 83, 257-275
- Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD, Amanatides P, Ballew RM, Huson DH, Wortman JR, Zhang Q, Kodira CD, Zheng XH, Chen L, Skupski M, Subramanian G, Thomas PD, Zhang J, Gabor Miklos GL, Nelson C, Broder S, Clark AG, Nadeau J, McKusick VA, Zinder N, Levine AJ, Roberts RJ, Simon M, Slayman C, Hunkapiller M, Bolanos R, Delcher A, Dew I, Fasulo D, Flanigan M, Florea L, Halpern A, Hannenhalli S, Kravitz S, Levy S, Mobarry C, Reinert K, Remington K, Abu-Threideh J, Beasley E, Biddick K, Bonazzi V, Brandon R, Cargill M, Chandramouliswaran I, Charlab R, Chaturvedi K, Deng Z, Di Francesco V, Dunn P, Eilbeck K, Evangelista C, Gabrielian AE, Gan W, Ge W, Gong F, Gu Z, Guan P, Heiman TJ, Higgins ME, Ji RR, Ke Z, Ketchum KA, Lai Z, Lei Y, Li Z, Li J, Liang Y, Lin X, Lu F, Merkulov GV, Milshina N, Moore HM, Naik AK, Narayan VA, Neelam B, Nusskern D, Rusch DB, Salzberg S, Shao W, Shue B, Sun J, Wang Z, Wang A, Wang X, Wang J, Wei M, Wides R, Xiao C, Yan C, Yao A, Ye J, Zhan M, Zhang W, Zhang H, Zhao Q, Zheng L, Zhong F, Zhong W, Zhu S, Zhao S, Gilbert D, Baumhueter S, Spier G, Carter C, Cravchik A, Woodage T, Ali F, An H, Awe A, Baldwin D, Baden H, Barnstead M, Barrow I, Beeson K, Busam D, Carver A, Center A, Cheng ML, Curry L, Danaher S, Davenport L, Desilets R, Dietz S, Dodson K, Doup L, Ferriera S, Garg N, Gluecksmann A, Hart B, Haynes J, Haynes

- C, Heiner C, Hladun S, Hostin D, Houck J, Howland T, Ibegwam C, Johnson J, Kalush F, Kline L, Koduru S, Love A, Mann F, May D, McCawley S, McIntosh T, McMullen I, Moy M, Moy L, Murphy B, Nelson K, Pfannkoch C, Pratts E, Puri V, Qureshi H, Reardon M, Rodriguez R, Rogers YH, Romblad D, Ruhfel B, Scott R, Sitter C, Smallwood M, Stewart E, Strong R, Suh E, Thomas R, Tint NN, Tse S, Vech C, Wang G, Wetter J, Williams S, Williams M, Windsor S, Winn-Deen E, Wolfe K, Zaveri J, Zaveri K, Abril JF, Guigo R, Campbell MJ, Sjolander KV, Karlak B, Kejariwal A, Mi H, Lazareva B, Hatton T, Narechania A, Diemer K, Muruganujan A, Guo N, Sato S, Bafna V, Istrail S, Lippert R, Schwartz R, Walenz B, Yooseph S, Allen D, Basu A, Baxendale J, Blick L, Caminha M, Carnes-Stine J, Caulk P, Chiang YH, Coyne M, Dahlke C, Mays A, Dombroski M, Donnelly M, Ely D, Esparham S, Fosler C, Gire H, Glanowski S, Glasser K, Glodek A, Gorokhov M, Graham K, Gropman B, Harris M, Heil J, Henderson S, Hoover J, Jennings D, Jordan C, Jordan J, Kasha J, Kagan L, Kraft C, Levitsky A, Lewis M, Liu X, Lopez J, Ma D, Majoros W, McDaniel J, Murphy S, Newman M, Nguyen T, Nguyen N, Nodell M, Pan S, Peck J, Peterson M, Rowe W, Sanders R, Scott J, Simpson M, Smith T, Sprague A, Stockwell T, Turner R, Venter E, Wang M, Wen M, Wu D, Wu M, Xia A, Zandieh A, and Zhu X: The sequence of the human genome. *Science* (2001) 291, 1304-1351
- Verbyla KL, Calus MP, Mulder HA, de Haas Y, and Veerkamp RF: Predicting energy balance for dairy cows using high-density single nucleotide polymorphism information. *Journal of Dairy Science* (2010) 93:2757-2764
- Vergnaud G, Gauguier D, Schott JJ, Lepetit D, Lauthier V, Mariat D, Buard J: Detection, cloning, and distribution of minisatellites in some mammalian genomes. *Experientia* (1993) 67, 47-57
- Verkerk GA, Phipps AM, Carragher JF, Matthews LR, and Stelwagen K: Characterization of milk cortisol concentrations as a measure of short-term stress responses in lactating dairy cows. *Journal of Animal Welfare* (1998) 7, 77-86
- Vernon RG and Finlay E: Endocrine control of lipogenesis in adipose tissue from lactating sheep. *Biochemical Society Transactions* (1986)14, 635-636
- Vila C, Seddon J, and Ellegren H: Genes of domestic mammals augmented by backcrossing with wild ancestors. *Trends in Genetics* (2005) 21, 214-218
- Villumsen TM, Janss L, and Lund MS: The importance of haplotype length and heritability using genomic selection in dairy cattle. *Journal of Animal Breeding and Genetics* (2009) 126, 3-13
- Vereinigte Informationssysteme Tierhaltung (VIT): Beschreibung der Zuchtwertschätzung Milchrind [http://www.vit.de/fileadmin/user_upload/vit-fuers-rind/zuchtwertschaetzung/milchrinder-zws-online/Zws_Bes1004_deu.pdf] Verden (2010)
- Vollema AR and Groen AF: Genetic correlations between longevity and conformation traits in an upgrading dairy cattle population. *Journal of Dairy Science* (1996) 80, 3006-3014
- Von Mering C, Huynen M, Jaeggi D, Schmidt S, Bork P, and Snel B: STRING: a database of predicted functional associations between proteins. *Nucleic Acids Research* 31, 258-61
- Vos H and Groen AF: Altering milk protein/fat-ratio: results of a selection experiment in dairy cattle. *Livestock Production Science* (1998) 53, 49-55
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, and Zabeau M: AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* (1995) 23, 4407-4414
- Wada A, Ohnishi T, Nonaka Y, Okamoto M, and Yamano T: Synthesis of aldosterone by a reconstituted system of cytochrome P-45011 beta from bovine adrenocortical mitochondria. *Journal of Biochemistry* (1985) 98, 245-256
- Wagner MJ, Ge Y, Siciliano M, and Wells DE: A hybrid cell mapping panel for regional localization of probes to human chromosome 8. *Genomics* (1991) 10, 114-125
- Wahls WP: Meiotic recombination hotspots: Shaping the genome and insights into hypervariable minisatellite DNA change. *Current Topics in Developmental Biology* (1998) 37, 37-75

- Wallace CA, Ali S, Glazier AM, Norsworthy PJ, Carlos DC, Scott J, Freeman TC, Stanton LW, Kwitek AE, Aitman TJ: Radiation hybrid mapping of 70 rat genes from a data set of differentially expressed genes. *Mammalian Genome* (2002) 13, 194-197
- Wang M, Chen XN, Shouse S, Manson J, Wu Q, Li R, Wrestler J, Noya D, Sun ZG, Korenberg J, and Lai E: Construction and characterization of a human chromosome 2-specific BAC library. *Genomics* (1994) 24, 527-534
- Wang Y, Miller SP, Wilton JW, Sullivan P, and Banks LR: The relationship between birth weight and calving ease in a beef herd. *Ontario Beef Research Update* (2000/2001) Technical reports genetics
- Warren W, Smith TP, Rexroad CE 3rd, Fahrenkrug SC, Allison T, Shu CL, Catanese J, and de Jong PJ: Construction and characterization of a new bovine bacterial artificial chromosome library with 10 genome-equivalent coverage. *Mammalian Genome* (2000) 11, 662-663
- Waterstone RH, Lindblad-Toh K, Birney E, Rogers J, Abril JF, Agarwal P, Agarwala R, Ainscough R, Alexandersson M, An P, Antonarakis SE, Attwood J, Baertsch R, Bailey J, Barlow K, Beck S, Berry E, Birren B, Bloom T, Bork P, Botcherby M, Bray N, Brent MR, Brown DG, Brown SD, Bult C, Burton J, Butler J, Campbell RD, Carninci P, Cawley S, Chiaromonte F, Chinwalla AT, Church DM, Clamp M, Clee C, Collins FS, Cook LL, Copley RR, Coulson A, Couronne O, Cuff J, Curwen V, Cutts T, Daly M, David R, Davies J, Delehaunty KD, Deri J, Dermitzakis ET, Dewey C, Dickens NJ, Diekhans M, Dodge S, Dubchak I, Dunn DM, Eddy SR, Elnitski L, Emes RD, Eswara P, Eyraas E, Felsenfeld A, Fewell GA, Flicek P, Foley K, Frankel WN, Fulton LA, Fulton RS, Furey TS, Gage D, Gibbs RA, Glusman G, Gnerre S, Goldman N, Goodstadt L, Grafham D, Graves TA, Green ED, Gregory S, Guigo R, Guyer M, Hardison RC, Haussler D, Hayashizaki Y, Hillier LW, Hinrichs A, Hlavina W, Holzer T, Hsu F, Hua A, Hubbard T, Hunt A, Jackson I, Jaffe DB, Johnson LS, Jones M, Jones TA, Joy A, Kamal M, Karlsson EK, Karolchik D, Kasprzyk A, Kawai J, Keibler E, Kells C, Kent WJ, Kirby A, Kolbe DL, Korf I, Kucherlapati RS, Kulbokas EJ, Kulp D, Landers T, Leger JP, Leonard S, Letunic I, Levine R, Li J, Li M, Lloyd C, Lucas S, Ma B, Maglott DR, Mardis ER, Matthews L, Mauceli E, Mayer JH, McCarthy M, McCombie WR, McLaren S, McLay K, McPherson JD, Meldrim J, Meredith B, Mesirov JP, Miller W, Miner TL, Mongin E, Montgomery KT, Morgan M, Mott R, Mullikin JC, Muzny DM, Nash WE, Nelson JO, Nhan MN, Nicol R, Ning Z, Nusbaum C, O'Connor MJ, Okazaki Y, Oliver K, Overton-Larty E, Pachter L, Parra G, Pepin KH, Peterson J, Pevzner P, Plumb R, Pohl CS, Poliakov A, Ponce TC, Ponting CP, Potter S, Quail M, Reymond A, Roe BA, Roskin KM, Rubin EM, Rust AG, Santos R, Sapojnikov V, Schultz B, Schultz J, Schwartz MS, Schwartz S, Scott C, Seaman S, Searle S, Sharpe T, Sheridan A, Shownkeen R, Sims S, Singer JB, Slater G, Smit A, Smith DR, Spencer B, Stabenau A, Stange-Thomann N, Sugnet C, Suyama M, Tesler G, Thompson J, Torrents D, Trevaskis E, Tromp J, Ucla C, Ureta-Vidal A, Vinson JP, Von Niederhausern AC, Wade CM, Wall M, Weber RJ, Weiss RB, Wendl MC, West AP, Wetterstrand K, Wheeler R, Whelan S, Wierzbowski J, Willey D, Williams S, Wilson RK, Winter E, Worley KC, Wyman D, Yang S, Yang SP, Zdobnov EM, Zody MC, and Lander ES: Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* (2002) 420, 520-562
- Weber JL and May PE: Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal of Human Genetics* (1989) 44, 388-396
- Weigel K, Rekaya R, Zwald NR, and Fikse WF: International genetic evaluation of dairy sires using a multiple-trait model with individual animal performance records. *Journal of Dairy Science* (2001) 84, 2789-2795
- Weiler U, Claus R, Schnoebelen-Combes S, and Louveau I: Influence of age and genotype on endocrine parameters and growth performance: a comparative study in Wild boars, Meishan and Large White boars. *Livestock Production Science* (1998) 54, 21-31

- Weimann C, Kraus M, Gauly M, and Erhardt G: Differences in recombination rates on chromosome 23 between German Angus and German Simmental and breed specific linkage mapping. *Animal Genetics* (2003) 34, 229-231
- Weir BS and Cockerham CC: Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* (1984) 38, 1358-1370
- Weir BS: *Genetic Data analysis II, Methods for discrete population genetic data*. Sinauer Associates, Inc. Publishers Sunderland, Massachusetts, USA (1996)
- Weller JI, Soller M, and Korol AB: *Detection of Quantitative Trait Loci and Marker-Assisted Selection. Course Notes and Abstracts*. Kibbutz Mitzpeh Rachel Guesthouse, Jerusalem, Israel (1997)
- Weller JI, Kashi Y, and Soller M: Power of daughter and granddaughter designs for determining linkage between marker loci and quantitative trait loci in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* (1990) 73, 2525-2537
- Weller JI: *Quantitative Trait Loci Analysis in Animals*. CABI Publishing, Wallingford, Oxon, UK (2001)
- Weller JI, Weller H, Kliger D, and Ron M: Estimation of Quantitative Trait Locus Allele Frequency via a Modified Granddaughter Design. *Genetics* (2002) 162, 841-849
- Weller JI, Golik M, Seroussi E, Ezra E, and Ron M: Population-Wide Analysis of a QTL Affecting Milk-Fat Production in the Israeli Holstein Population. *Journal of Dairy Science* (2003) 86, 2219-2227
- Weller JL: *Marker-assisted Selection in Animals*. Business Briefing Life Sciences Technology. (ohne Datum)
- Werner FAO, Durstewitz G, Habermann FA, Thaller G, Krämer W, Kollers S, Buitkamp J, Georges M, Brem G, Mosner J, and Fries R: Detection and characterization of SNPs useful for identity control and parentage testing in major European dairy breeds. *Animal Genetics* (2004) 35, 44-49
- Werner P, Raducha MG, Prociuk U, Henthorn PS, and Patterson DF: A comparative approach to physical and linkage mapping of genes on canine chromosomes using gene-associated simple sequence repeat polymorphisms illustrated by studies of dog chromosome 9. *Journal of Heredity* (1999) 90, 39-42
- Westwood CT, Lean IJ, Garvin JK: Factors influencing fertility of Holstein dairy cows: a multivariate description. *Journal of Dairy Science* (2002) 85, 3225-3237
- Wheeler DL, Church DM, Federhen S, Lash AE, Madden TL, Pontius JU, Schuler GD, Schriml LM, Sequeira E, Tatusova TA, and Wagner L: Database resources of the National Center for Biotechnology. *Nucleic Acids Research* (2003) 31, 28-33
- Whitaker SM, Jeffrey SL, Willett LB, Borger DC, Neiswander RL, Schanbacher FL, and Weiss WP: The Effect of Cortisol and Time of First Feeding on Immunoglobulin Absorption in Holstein Calves. *Bulletin - Animal Sciences Research and Reviews (Special Circular 156)*, (2000), The Ohio State University
- White MJD: *Modes of Speciation*. Freeman and Company, San Fransisco, CA, USA (1978)
- White R, Lalouel JM, Leppert M, Lathrop M, Nakamura Y, and O'Connell P: Linkage maps of human chromosomes. *Genome* (1989) 31, 1066-1072
- Wibowo TA, Michal JJ, and Jiang Z: Corticotropin releasing hormone is a promising candidate gene for marbling and subcutaneous fat depth in beef cattle. *Genome* (2007) 50, 939-945
- Wibowo TA, Gaskins CT, Newberry RC, Thorgaard GH, Michal JJ, and Jiang Z: Genome Assembly Anchored QTL Map of Bovine Chromosome 14. *International Journal of Biological Sciences* (2008) 4, 406-414
- Wiener P, Burton D, and Williams JL: Breed relationships and definition in British cattle: a genetic analysis. *Heredity* (2004) 93, 597-602
- Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, and Tingey SV: DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* (1990) 18,6531-6535
- Williams JL, Eggen A, Ferretti L, Farr CJ, Gautier M, Amati G, Ball G, Caramorr T, Critcher R, Costa S, Hextall P, Hills D, Jeulin A, Kiguwa SL, Ross O, Smith AL, Saunier K,

- Urquhart B, Waddington D: A bovine whole-genome radiation hybrid panel and outline map. *Mammalian Genome* (2002) 13, 469-474
- Wilkens J, Bünger A, and Reinhardt F: Marker assisted selection in German Holstein, *Methods and Application*. 10th QTL-MAS workshop, Salzburg, Austria, (2006)
- Winship PR: An improvement method for directly decontaminating PCR amplified material using dimethylsulfoxid. *Nucleic Acids Research* (1989) 17, 1266
- Winter A, Krämer W, Werner FAO, Kollers S, Kata S, Durstewitz G, Buitkamp J, Womack JE, Thaller G, and Fries R: Association of a lysine-232/alanine polymorphism in a bovine gene encoding acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase (DGAT1) with variation at a quantitative trait locus for milk fat content. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* (2002) 16, 9252-9257
- Winter A, Alzinger A, and Fries R: Assessment of the gene content of the chromosomal regions flanking bovine DGAT1. *Genomics* (2004) 83, 172-180
- Wintero AK, Fredholm M, and Thomsen PD: Variable (dG-dT)n.(dC-dA)n sequences in the porcine genome. *Genomics* (1992) 12, 281-288
- Wierda A, Verhoeff J, Dorresteyn J, Wensing T, and van Dijk S: Effects of glucocorticoids on milk yield and biochemical measurements in healthy and ketotic cows. *Veterinary Record* (1987) 120,297-299
- Woldehawariat G, Talamantes MA, Petty jr RR, and Cartwright TC: A summary of genetic and environmental statistics for growth and conformation characters in young beef cattle. (II Ed.) Texas Agricultural Experimental Station Department Technical Report No. 103. Zitiert in: Bourdon RM and Brinks JS: Genetic, environmental and phenotypic relationships among gestation length, birth weight, growth traits and age at first calving in beef cattle. *Journal of Animal Science* (1982) 55, 543-553
- Wolf JB, Vaughn TT, Pletscher LS, and Cheverud JM: Contribution of maternal effect QTL to genetic architecture of early growth in mice. *Heredity* (2002) 89, 300-310
- Wöhlke A: Finemapping of the genomic region of the bovine polled locus. (Dissertation, TiHo-Hannover, 2004)
- Womack JE, Johnson JS, Owens EK, Rexroad CE 3rd, Schlapfer J, Yang YP: A whole-genome radiation hybrid panel for bovine gene mapping. *Mammalian Genome* (1997) 8, 854-856
- Wright DH: What is Burkitt's lymphoma? *Journal of Pathology* (1997) 182, 125-127
- Wright S: Evolution in Mendelian Populations. *Genetics* (1931) 16: 97- 159
- Wright S: Breeding structure of populations in relation to speciation. *American Naturalist* (1940) 74, 232-248
- Wu DY, Ugozzoli L, Pal BK, Qian J, and Wallace RB: The effect of temperature and oligonucleotide primer length on the specificity and efficiency of amplification by the polymerase chain reaction. *DNA and Cell Biology* (1991) 10, 233-238
- Wu R, Ma CX, Zhao W, and Casella G: Functional mapping for quantitative trait loci governing growth rates: a parametric model *Physiological Genomics* (2003) 14, 241-249
- Wurster DH and Benirschke K: Chromosome studies in the superfamily Bovidae. *Chromosoma* (1968) 25, 152-171
- Wurster DH and Benirschke K: Indian muntjak, *Muntiacus muntjak*: A deer with a low diploid chromosome number. *Science* (1970) 168, 1364-1366
- Xiong M and Guo SW: Fine-scale genetic mapping based on linkage disequilibrium: theory and applications. *American Journal of Human Genetics* (1997) 60, 1513-1531
- Xu LH, Yang X, Bradham CA, Brenner DA, Baldwin AS, Craven RJ, and Cance WG: The focal adhesion kinase suppresses transformation-associated, anchorage-independent apoptosis in human breast cancer cells. *Journal of Biological Chemistry* (2000) 275, 30597-30604
- Xu H, Sha MY, Wong EY, Uphoff J, Xu Y, Treadway JA, Truong A, O'Brien E, Asquith S, Stubbins M, Spurr NK, Lai EH, and Mahoney W: Multiplexed SNP genotyping using the Qbead system: a quantum dot-encoded microsphere-based assay. *Nucleic Acids Research* (2003) 31, e43

- Xu HL, Qian YP, Nie WH, Chi JX, Yang FT, and Su B: Construction, characterization and chromosomal mapping of bacterial artificial chromosome (BAC) library of Yunnan snub-nosed monkey (*Rhinopithecus bieti*). *Chromosome Research* (2004) 12, 251-262
- Yanai I and DeLisi C: The society of genes: networks of functional links between genes from comparative genomics. *Genome Biology* (2002) 3, research0064
- Yang K: Regulation of gene expression in the ovine fetus. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* (1992) 45, 85-95
- Yang K, Langlois DA, Campbell LE, Challis JRG, Krkosek M, and Yu M: Cellular localization and developmental regulation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 β -HSD1) gene expression in ovine placenta. *Placenta* (1997) 18, 503-509
- Yu YH, Zhang Y, Oelkers P, Sturley SL, Rader DJ, and Ginsberg HN: Posttranscriptional control of the expression and function of diacylglycerol acyltransferase-1 in mouse adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* (2002) 277, 50876-50884
- Yu CW, Borgaonkar DS, and Bolling DR: Break points in human chromosomes. *Human Heredity* (1978) 28, 210-225
- Zachary I: Focal adhesion kinase. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* (1997) 29, 929-934.
- Zane L, Bargelloni L, Patarnello T: Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* (2002) 11, 1-16
- Zarzynska J and Motyl T: Apoptosis and autophagy in involuting bovine mammary gland. *Journal of Physiology and Pharmacology* (2008) 59, Suppl 9, 275-288
- Zhang K, Calabrese P, Nordborg M, and Sun F: Haplotype block structure and its applications to association studies: power and study designs. *American Journal of Human Genetics* (2002) 71, 1386-1394
- Zhang Q, Boichard D, Hoeschele I, Ernst C, Eggen A, Murkve B, Pfister-Genskow M, Witte LA, Grignola FE, Uimari P, Thaller G, and Bishop MD: Mapping quantitative trait loci for milk production and health of dairy cattle in a large outbred pedigree. *Genetics* (1998) 149, 1959-1973
- Zhang W, Collins A, Maniatis N, Tapper W, and Morton NE: Properties of linkage disequilibrium (LD) maps. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* (2002) 99:17004-17007
- Zhang Z, Harrison PM, Liu Y, and Gerstein M: Millions of years of evolution preserved: a comprehensive catalog of the processed pseudogenes in the human genome. *Genome Research* (2003) 13, 2541-2558
- Zhang Z, Carriero N, and Gerstein M: Comparative Analysis of Processed Pseudogenes in the Mouse and Human Genomes. *Trends in Genetics* (2004) 20, 62-67
- Zhao H, Nettleton D, Dekkers JC: Evaluation of linkage disequilibrium measures between multi-allelic markers as predictors of linkage disequilibrium between single nucleotide polymorphisms. *Genetic Research* (2007) 89, 1-6
- Zhao H, Nettleton D, Soller M, and Dekkers JC: Evaluation of linkage disequilibrium measures between multi-allelic markers as predictors of linkage disequilibrium between markers and QTL. *Genetic Research* (2005) 86, 77-87
- Zhao Y, Wang ZB, and Xu JX: Effect of Cytochrome c on the Generation and Elimination of O₂ and H₂O₂ in Mitochondria. *Journal of Biological Chemistry* (2003) 278, 2356-2360
- Zhu X, Zhang S, Zhao H, and Cooper RS: Association mapping using a mixture model for complex traits. *Genetic Epidemiology* (2002) 23, 181-196
- Zhu B, Smith JA, Tracey SM, Konfortov BA, Welzel K, Schalkwyk LC, Lehrach H, Kollers S, Masabanda J, Buitkamp J, Fries R, Williams JL, and Miller JR: A 5x genome coverage bovine BAC library: production, characterization, and distribution. *Mammalian Genome* (1999) 10, 706-709
- Zimmer R, Verrinder Gibbins AM: Construction and characterization of a large-fragment chicken bacterial artificial chromosome library. *Genomics* (1997) 42, 217-226
- Zouros E: On the Role of Chromosomal Inversions in speciation. *Evolution* (1982) 36, 414-416

Danksagung

Mein besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. G. Erhardt für die Überlassung des Themas und die gewährte Unterstützung. Im Besonderen gebührt Dank, seiner Vorsorge für zusätzliche finanzielle Förderung meiner Promotion, seinem bemerkenswert großen Interesse an dieser Arbeit und ihrer Konzeption, seiner intensiven und zu jeder Zeit bereitwillig und geduldig gewährten Betreuung im Labor, sowie der exzellenten technischen Ausstattung zur Genomanalyse des Rindes. Ebenso für die fachliche Unterstützung bei der Veröffentlichung mehrerer wissenschaftlicher Aufsätze und die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Herrn Prof. Dr. V. Dzapo danke ich herzlich für die Übernahme des zweiten Referates.

Herrn Prof. Dr. W. Friedt danke ich herzlich für die Übernahme des dritten Referates.

Herrn Prof. Dr. R. Fries danke ich für die Betreuung während des ersten Jahres meiner Einarbeitung in das Thema und die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes am Lehrstuhl für Tierzucht der TU-München.

Herrn Prof. Dr. H. Brandt danke ich für die enthusiastische Hilfe bei der Analyse der Daten und die gewährte Unterstützung bei der Erstellung einer wissenschaftlichen Publikation.

Herrn Dr. J. Buitkamp danke ich für die Unterweisung in die BAC-Bank Technologie.

Frau Dr. S. Kollers danke ich herzlich für die Unterstützung bei den FISH-Kartierungen und bei der Analyse der Daten, sowie für ihren Beitrag zu einer wissenschaftlichen Publikation.

Frau Dr. Chr. Weimann danke ich herzlich für ihr großes Interesse am Erfolg der Ihr Anvertrauten und für vielfältige Unterstützung im Labor-Alltag.

Frau Dr. E-M. Prinzenberg danke ich für ihre Unterstützung bei der Nachweisführung der Selektivität von *CYP11B1*-Primern und für ihren Beitrag zu einer wissenschaftlichen Publikation.

Ich danke ferner allen Freunden, Kollegen und Mitarbeitern der Tierzuchtinstitute der JLU-Giessen und TU-München, die mir in irgendeiner Form Unterstützung während der Durchführung der Arbeit haben zukommen lassen. Für ausgezeichnete technische Assistenz im Labor geht mein besonderer Dank an Frau R. Latzke-Reinhardt, MTA.

Der Arbeitsgemeinschaft Deutscher Rinderzüchter e.V. (ADR) Bonn, danke ich für die Bereitstellung der DNA-Sammlung in Form eines "Granddaughter-Design" der Rinderrassen Deutsche Holstein und Fleckvieh. Dem Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie (BMBF) danke ich für die Bereitstellung der finanziellen Mittel.

Der H. Wilhelm Schaumann Stiftung, Hamburg danke ich herzlichst für die Förderung meiner Promotion in Form eines Stipendiums über die Dauer von sechs Monaten.

Versicherung

Ich erkläre: Ich habe die vorliegende Dissertation selbständig 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 Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Hedersleben, 15. April 2011

Bernhard Kaupe