



Molekulargenetische Charakterisierung funktioneller Kandidatengene für Moderhinkeempfänglichkeit beim Schaf

Helen Yvonne Helmers

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



Bibliografische Informationen der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen
Nationalbibliografie;
Detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Auflage 2012

© 2012 by Verlag: **Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH**,
Gießen
Printed in Germany

ISBN 978-3-86345-099-1

Verlag: DVG Service GmbH
Friedrichstraße 17
35392 Gießen
0641/24466
geschaeftsstelle@dvg.net
www.dvg.net

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

Betreuer: Prof. Dr. G. Erhardt

Molekulargenetische Charakterisierung funktioneller Kandidatengene für Moderhinkeempfindlichkeit beim Schaf

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

Eingereicht von
Helen Yvonne Helmers

Tierärztin aus Bühl/Baden

Gießen, 2012

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

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

Gutachter:

Prof. Dr. G. Erhardt

Prof. Dr. Dr. habil. K. Doll

Tag der Disputation: 28. Juni 2012

Die Neugier ist die mächtigste Antriebskraft im Universum, weil sie die beiden größten Bremskräfte im Universum überwinden kann, die Vernunft und die Angst.

Walter Moers

Diese Arbeit wurde im Rahmen des FUGATO-plus Verbundprojekts (Funktionelle Genomanalyse im tierischen Organismus) in der Gruppe GENE-FL (Molekulargenetische Grundlagen der Fundamentstabilität bei Rind, Schwein, Pferd und Schaf) des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) durchgeführt.

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abbildungen	IV
Verzeichnis der Tabellen.....	VI
Verzeichnis der Abkürzungen.....	IX
1 EINLEITUNG	1
2 LITERATURÜBERSICHT	3
2.1 MODERHINKE	3
2.1.1 Definition und Bedeutung	3
2.1.2 Ätiologie.....	4
2.1.3 Pathogenese.....	5
2.1.4 Epidemiologie.....	6
2.1.4.1 Umweltfaktoren	6
2.1.4.2 Tierindividuelle Faktoren	6
2.1.4.3 Infektionsquellen und Übertragung.....	8
2.1.5 Klinisches Bild und Diagnose	9
2.1.6 Behandlung	11
2.1.6.1 Klauenschnitt.....	11
2.1.6.2 Klauenbad	13
2.1.6.3 Antibiose	13
2.1.6.4 Kurative Impfung	14
2.1.7 Prävention.....	14
2.1.7.1 Immunisierung.....	14
2.1.7.2 Eradikation.....	16
2.1.7.3 Heritabilitäten (h ²)	17
2.1.7.4 Resistenzzucht.....	18
2.1.7.5 Footrot Gene-Marker Test	18
2.2 MOLEKULARGENETISCHE CHARAKTERISIERUNG DES GENOMS	19
2.2.1 Untersuchung von Polymorphismen auf DNA-Basis	19
2.2.1.1 Sequenzierung.....	20
2.2.2. Assoziation von Genotyp und Phänotyp	21
2.2.2.1 Kandidatengenansatz.....	22
2.2.3. Stand der Genomanalyse beim Schaf	22
2.3 KANDIDATENGENE FÜR MODERHINKEEMPFÄNGLICHKEIT	24
2.3.1 Transglutaminase 1 (<i>TGM1</i>).....	24
2.3.2 Loricrin (<i>LOR</i>)	25
2.3.3 γ 2-Untereinheit des Laminin-332 (<i>LAMC2</i>).....	26
2.3.4 Keratinocyte growth factor (<i>KGF</i>).....	28

3	MATERIAL UND METHODEN	30
3.1	Probenmaterial	30
3.1.1	Probenmaterial für die Sequenzierung	30
3.1.2	Probenmaterial für die Assoziationsstudien	30
3.1.3	Probenmaterial für die Allelfrequenzbestimmung	31
3.2	Verbrauchsmaterialien	32
3.2.1	Chemikalien	33
3.2.2	DNA-Größenmarker	34
3.2.3	Enzyme	34
3.2.4	Kommerzielle Kits	34
3.2.5	Oligonukleotide	35
3.3	Geräte	35
3.4	Computerprogramme	36
3.5	Datenbanken	37
3.6	Genbank-Sequenzen	37
3.7	Externe Laboratorien	37
3.8	Methoden	38
3.8.1	Blutentnahme und Aufbereitung der Blutproben	38
3.8.2	DNA-Extraktion	38
3.8.3	Etablierung der Polymerasekettenreaktion zur Amplifikation einzelner Genabschnitte	38
3.8.3.1	Auswahl der Primer	38
3.8.3.2	Etablierung der PCR	41
3.8.4	Amplifikation bestimmter Abschnitte der Kandidatengene	42
3.8.5	Aufreinigung der PCR-Produkte	43
3.8.6	Agarosegelelektrophorese	43
3.8.6.1	Überprüfen der PCR	43
3.8.6.2	Konzentrationssschätzung nach Aufreinigung der PCR-Produkte	44
3.8.7	Sequenzierung	44
3.8.7.1	Sequenzierreaktion	46
3.8.7.2	Sequenzierung mit dem ABI GeneticAnalyzer 3130	47
3.8.8	Untersuchung der SNPs	47
3.8.8.1	Genotypisierung	47
3.8.9	Statistische Methoden	49
3.8.9.1	Vergleich der Genotypfrequenzen	49
3.8.9.2	Varianzanalyse	50
3.8.10	Allelfrequenzbestimmung	50
4	ERGEBNISSE	51
4.1	Sequenzierung	51
4.1.1	TGM1	51
4.1.2	LOR	54
4.1.3	KGF	55
4.1.4	LAMC2	57
4.2	Moderhinke-Prävalenz auf den Betrieben	62
4.3	Genotypisierung	63

Inhaltsverzeichnis

4.3.1 <i>TGMI</i>	64
4.3.1.1 Ergebnis von χ^2 - und Fisher's Exact Test	64
4.3.1.2 Ergebnis der Varianzanalyse	65
4.3.1.3 Genotypfrequenzen signifikanter SNPs auf den Betrieben	65
4.3.1.4 Allel- und Genotypfrequenzen	66
4.3.2 <i>LOR</i>	69
4.3.2.1 Ergebnis von χ^2 - und Fisher's Exact Test	69
4.3.2.2 Ergebnis der Varianzanalyse	69
4.3.2.3 Genotypfrequenzen des SNPs auf Betrieb 2	70
4.3.2.4 Allel- und Genotypfrequenzen	70
4.3.3 <i>KGF</i>	71
4.3.3.1 Ergebnis von χ^2 - und Fisher's Exact Test	71
4.3.3.2 Ergebnis der Varianzanalyse	72
4.3.3.3 Genotypfrequenzen des SNPs <i>KGF_1</i> auf Betrieb 1	73
4.3.3.4 Allel- und Genotypfrequenzen	73
4.3.4 <i>LAMC2</i>	75
4.3.4.1 Ergebnis von χ^2 - und Fisher's Exact Test	75
4.3.4.2 Ergebnis der Varianzanalyse	79
4.3.4.3 Genotypfrequenzen signifikanter SNPs auf den Betrieben	80
4.3.4.4 Allel- und Genotypfrequenzen	84
5 DISKUSSION	96
6 ZUSAMMENFASSUNG	119
7 SUMMARY	121
8 LITERATURVERZEICHNIS	123
9 ANHANG	147

Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 2-1	Schematische Darstellung der Ausbreitung einer Moderhinkeinfektion. Ansicht einer Schaffklaue von ventral; A = Zwischenklauenspalt; B = Ballen; C = Klauenspitze; D = Weiße Linie.	9
Abb. 2-2	Darstellung der Beziehung zwischen dem Moderhinke-Score des „footrot gene-marker test“ und dem Risiko eines Schafes, an Moderhinke zu erkranken (www.lincoln.ac.nz/gene-marker-lab). Auf der X-Achse ist der aus der Genotypisierung ermittelte Moderhinke-Score dargestellt, auf der y-Achse die relative Wahrscheinlichkeit des Tieres, an Moderhinke zu erkranken.	19
Abb. 4-1	Sequenz des ovinen <i>TGM1</i> -Gens. SNPs sind unterstrichen und fett gedruckt (R= A/G; Y = C/T; K = G/T; M = A/C; S = C/G; W = A/T), die Basen der Introns sind in Kleinbuchstaben, die der Exons in Großbuchstaben. Die kodierenden Bereiche sind grau hinterlegt, die nicht sequenzierten Intronbereiche mit [gap] gekennzeichnet.	51
Abb. 4-2	Sequenz des ovinen <i>LOR</i> -Gens. Die Basen der Introns sind in Kleinbuchstaben, die der Exons in Großbuchstaben. Die kodierenden Bereiche sind grau hinterlegt, die nicht sequenzierten Intronbereiche mit [gap] gekennzeichnet.	54
Abb. 4-3	Sequenz des ovinen <i>KGF</i> -Gens. SNPs sind unterstrichen und fett gedruckt (R= A/G; Y = C/T; K = G/T; M = A/C; S = C/G; W = A/T), die Basen der Introns sind in Kleinbuchstaben, die der Exons in Großbuchstaben. Die kodierenden Bereiche sind grau hinterlegt, die nicht sequenzierten Intronbereiche mit [gap] gekennzeichnet.	55
Abb. 4-4	Sequenz des ovinen <i>LAMC2</i> -Gens. SNPs sind unterstrichen und fett gedruckt (R= A/G; Y = C/T; K = G/T; M = A/C; S = C/G; W = A/T), die Basen der Introns sind in Kleinbuchstaben, die der Exons in Großbuchstaben. Die kodierenden Bereiche sind grau hinterlegt, die nicht sequenzierten Intronbereiche mit [gap] gekennzeichnet.	57
Abb. 4-5	Gegenüberstellung der Genotypen zwischen moderhinkepositiven und -negativen Tieren auf Betrieb 1 und 2 für den SNP TGM1_5.	66
Abb. 4-6	Gegenüberstellung der Allelfrequenzen des SNPs TGM1_3 in den einzelnen Rassen.	67
Abb. 4-7	Gegenüberstellung der Allelfrequenzen des SNPs TGM1_5 in den einzelnen Rassen.	68
Abb. 4-8	Gegenüberstellung der Genotypen zwischen moderhinkepositiven und -negativen Tieren auf Betrieb 2 für den SNP LOR_chip.	70
Abb. 4-9	Gegenüberstellung der Allelfrequenzen des SNPs LOR_chip in den einzelnen Rassen.	71
Abb. 4-10	Gegenüberstellung der Allelfrequenzen des SNPs KGF_1 in den einzelnen Rassen.	74

Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 4-11	Gegenüberstellung der Allelfrequenzen des SNPs KGF_2 in den einzelnen Rassen.	75
Abb. 4-12	Gegenüberstellung der Genotypen zwischen moderhinkepositiven und -negativen Tieren auf Betrieb 1 bei der Momentaufnahme für den SNP LAMC2_1.	81
Abb. 4-13	Gegenüberstellung der Genotypen zwischen Tieren mit Klauenbehandlung und ohne auf Betrieb 3 für den SNP LAMC2_14.	82
Abb. 4-14	Gegenüberstellung der Genotypen zwischen moderhinkepositiven und -negativen Tieren in Betrieb 2 und Tieren mit und ohne Klauenbehandlung auf Betrieb 3 für den SNP LAMC2_15.	83
Abb. 4-15	Gegenüberstellung der Genotypen zwischen Tieren mit Klauenbehandlung und ohne auf Betrieb 3 für den SNP LAMC2_48.	83
Abb. 4-16	Gegenüberstellung der Allelfrequenzen des SNPs LAMC2_1 in den einzelnen Rassen.	84
Abb. 4-17	Gegenüberstellung der Allelfrequenzen des SNPs LAMC2_42 in den einzelnen Rassen.	85
Abb. 4-18	Gegenüberstellung der Allelfrequenzen des SNPs LAMC2_4 in den einzelnen Rassen.	86
Abb. 4-19	Gegenüberstellung der Allelfrequenzen des SNPs LAMC2_14 in den einzelnen Rassen.	88
Abb. 4-20	Gegenüberstellung der Allelfrequenzen des SNPs LAMC2_15 in den einzelnen Rassen.	89
Abb. 4-21	Gegenüberstellung der Allelfrequenzen des SNPs LAMC2_18 in den einzelnen Rassen.	90
Abb. 4-22	Gegenüberstellung der Allelfrequenzen des SNPs LAMC2_23 in den einzelnen Rassen.	91
Abb. 4-23	Gegenüberstellung der Allelfrequenzen des SNPs LAMC2_48 in den einzelnen Rassen.	92
Abb. 4-24	Gegenüberstellung der Allelfrequenzen des SNPs LAMC2_51 in den einzelnen Rassen.	94
Abb. 4-25	Gegenüberstellung der Allelfrequenzen des SNPs LAMC2_30 in den einzelnen Rassen.	95

Verzeichnis der Tabellen

Tab. 3-1	Übersicht über die verwendeten Proben mit Angaben zur Rasse, Anzahl und Herkunft. Zahlen in Klammern geben die Anzahl der für die Genotypisierung tatsächlich verwendeten Proben an.	31
Tab. 3-2	Verwendete Genbank-Sequenzen, Art der Sequenz, Ursprungstierart sowie Herkunft der Sequenzinformationen.	37
Tab. 3-3	Verwendete Primer für die Gene <i>TGM1</i> , <i>LOR</i> , <i>KGF</i> und <i>LAMC2</i> , Zielabschnitt des Gens und Größe des amplifizierten Bereichs.	39
Tab. 3-4	Protokoll für den 15 µl Standard-Testansatz mit 1,0 µl DNA.	41
Tab. 3-5	Standard-Cyclerprogramm zum Testen der Primer in Abhängigkeit von der Länge des zu erwartenden PCR-Produkts.	41
Tab. 3-6	Bedingungen für die PCR der einzelnen Genabschnitte (Magnesiumkonzentration = Mg ²⁺ -Konz., Annealingtemperatur = AT, Annealingzeit = AZ und Elongationszeit = EZ) sowie <i>Taq</i> -Polymerasehersteller.	42
Tab. 3-7	Für die Sequenzierung der einzelnen Genabschnitte hauptsächlich verwendeter Primer. Für Exon 3* des <i>TGM1</i> -Gens wurde ein spezieller Sequenzierprimer gewählt, die übrigen Abschnitte aller Gene wurden mit den Primern der PCR sequenziert.	44
Tab. 3-8	Übersicht über die genotypisierten SNPs in den Genen <i>TGM1</i> , <i>LOR</i> , <i>KGF</i> und <i>LAMC2</i> .	48
Tab. 4-1	Im <i>TGM1</i> -Gen identifizierte SNPs mit SNP-Name, Lokalisation im Gen, Art des Austausches und Besonderheiten. FR = flankierender Bereich, ncds = nichtkodierender Bereich des Exons, cds = kodierender Bereich.	54
Tab. 4-2	Im <i>KGF</i> -Gen identifizierte SNPs mit SNP-Name, Lokalisation im Gen, Art des Austausches und Besonderheiten. FR = flankierender Bereich, ncds = nichtkodierender Bereich des Exons, cds = kodierender Bereich.	56
Tab. 4-3	Im <i>LAMC2</i> -Gen identifizierte SNPs mit SNP-Name, Lokalisation im Gen, Art des Austausches und Besonderheiten. FR = flankierender Bereich, ncds = nichtkodierender Bereich des Exons, cds = kodierender Bereich.	61
Tab. 4-4	Gesamtzahl aller Tiere mit absoluter und prozentualer Anzahl an moderhinkenegativen und -positiven Schafen sowie solchen, die keiner der beiden Gruppen zugeordnet werden konnten („fraglich“) und die Verteilung der Körpergewichte innerhalb der beiden Gruppen auf Betrieb 1 und 2.	62
Tab. 4-5	Anzahl der moderhinkepositiven und -negativen Schafe bzw. Schafe ohne (nein) und mit (ja) Klauenbehandlung je Betrieb, die Genotypfrequenzen der untersuchten SNPs TGM1_1, TGM1_3 und TGM1_5 sowie die Ergebnisse von χ^2 - und Fisher's Exact Test.	64
Tab. 4-6	Signifikanzniveaus für den Einfluss des Genotyps der SNPs TGM1_1, TGM1_3 und TGM1_5, der Rasse und des Gewichts auf den Moderhinkestatus.	65

Verzeichnis der Tabellen

Tab. 4-7	Allel- und Genotypfrequenzen des SNPs TGM1_1 (<i>call rate</i> 95,1%).	66
Tab. 4-8	Allel- und Genotypfrequenzen des SNPs TGM1_3 (<i>call rate</i> 94,7%).	67
Tab. 4-9	Allel- und Genotypfrequenzen des SNPs TGM1_5 (<i>call rate</i> 81,4%).	68
Tab. 4-10	Anzahl der moderhinkepositiven und –negativen Schafe bzw. Schafe ohne (nein) und mit (ja) Klauenbehandlung je Betrieb, die Genotypfrequenzen des untersuchten SNPs LOR_chip sowie die Ergebnisse von χ^2 - und Fisher's Exact Test.	69
Tab. 4-11	Allel- und Genotypfrequenz des SNPs LOR_chip (<i>call rate</i> 95,6%).	71
Tab. 4-12	Anzahl der moderhinkepositiven und –negativen Schafe bzw. Schafe ohne (nein) und mit (ja) Klauenbehandlung je Betrieb, die Genotypfrequenzen der untersuchten SNPs KGF_1 und KGF_2 sowie die Ergebnisse von χ^2 - und Fisher's Exact Test.	72
Tab. 4-13	Signifikanzniveaus für den Einfluss des Genotyps der SNPs KGF_1 und KGF_2, der Rasse und des Gewichts auf den Moderhinkestatus.	72
Tab. 4-14	Allel- und Genotypfrequenzen des SNPs KGF_1 (<i>call rate</i> 95,2%).	73
Tab. 4-15	Allel- und Genotypfrequenzen des SNPs KGF_2 (<i>call rate</i> 83,2%).	75
Tab. 4-16	Anzahl der moderhinkepositiven und –negativen Schafe bzw. Schafe ohne (nein) und mit (ja) Klauenbehandlung je Betrieb, die Genotypfrequenzen der untersuchten SNPs LAMC2_1, LAMC2_42, LAMC2_4, LAMC2_14, LAMC2_15, LAMC2_18, LAMC2_23, LAMC2_48, LAMC2_51 und LAMC2_30 sowie die Ergebnisse von χ^2 - und Fisher's Exact Test.	77
Tab. 4-17	Signifikanzniveaus für den Einfluss des Genotyps der SNPs LAMC2_1, LAMC2_42, LAMC2_4, LAMC2_14, LAMC2_15, LAMC2_18, LAMC2_23, LAMC2_48, LAMC2_51 und LAMC2_30, der Rasse und des Gewichts auf den Moderhinkestatus.	80
Tab. 4-18	Allel- und Genotypfrequenzen des SNPs LAMC2_1 (<i>call rate</i> 94,4%).	84
Tab. 4-19	Allel- und Genotypfrequenzen des SNPs LAMC2_42 (<i>call rate</i> 93,5%).	85
Tab. 4-20	Allel- und Genotypfrequenzen des SNPs LAMC2_4 (<i>call rate</i> 95,7%).	86
Tab. 4-21	Allel- und Genotypfrequenzen des SNPs LAMC2_14 (<i>call rate</i> 94,4%).	87
Tab. 4-22	Allel- und Genotypfrequenzen des SNPs LAMC2_15 (<i>call rate</i> 89,6%).	89
Tab. 4-23	Allel- und Genotypfrequenzen des SNPs LAMC2_18 (<i>call rate</i> 94,3%).	90
Tab. 4-24	Allel- und Genotypfrequenzen des SNPs LAMC2_23 (<i>call rate</i> 94,4%).	91
Tab. 4-25	Allel- und Genotypfrequenzen des SNPs LAMC2_48 (<i>call rate</i> 94,4%).	92
Tab. 4-26	Allel- und Genotypfrequenzen des SNPs LAMC2_51 (<i>call rate</i> 95,2%).	93
Tab. 4-27	Allel- und Genotypfrequenzen des SNPs LAMC2_30 (<i>call rate</i> 90,8%).	94

Tab. 5-1	SNPs im <i>LAMC2</i> -Gen, welche zu einer Änderung der Aminosäuresequenz führen.	99
Tab. 5-2	Darstellung der SNPs, für die χ^2 -Test und Fisher's Exact Test in mindestens einem Betrieb signifikante Genotypfrequenzen mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit unter $p=0,10$ ergaben.	105
Tab. 5-3	Darstellung der SNPs, die bei der Varianzanalyse ein Signifikanzniveau unter $p=0,05$ ergaben.	105
Tab. 9-1	Genotypen der sequenzierten Schafe für das <i>TGM1</i> -Gen unter Angabe der Rasse. T = Thymin, A = Adenin, C = Cytosin, G = Guanin, n. a. = nicht analysierbar.	147
Tab. 9-2	Genotypen der sequenzierten Schafe für das <i>KGF</i> -Gen unter Angabe der Rasse. T = Thymin, A = Adenin, C = Cytosin, G = Guanin, n. a. = nicht analysierbar.	148
Tab. 9-3	Genotypen der sequenzierten Schafe für das <i>LAMC2</i> -Gen unter Angabe der Rasse. T = Thymin, A = Adenin, C = Cytosin, G = Guanin, / = Deletion, n. a. = nicht analysierbar. Die Nummerierungen <i>LAMC2_3</i> , <i>LAMC2_6</i> , <i>LAMC2_40</i> und <i>LAMC2_50</i> wurden nicht vergeben.	149

Verzeichnis der Abkürzungen

%	Prozent
° C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	mikromolar
3'FR	3' flankierende Region
5'FR	5' flankierende Region
A	Adenin-Allel
ASPE	allele-specific primer extension (Minisequenzierung)
AUS	Australien
BBS	Braunes Bergschaf
BENT	Bentheimer Landschaf
BGK	Beratungs- und Gesundheitsdienst für Kleinwiederkäuer
bp	Basenpaare
BT	<i>Bos taurus</i>
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin-Allel
cDNA	coding desoxyribonucleic acid (kodierende Desoxyribonukleinsäure)
cm	Zentimeter
COF	Coburger Fuchsschaf
CSIRO	Australia's Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization
<i>D. nodosus</i>	<i>Dichelobacter nodosus</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desocyrbonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
EBJ	Epidermolysis bullosa junctionalis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
engl.	englisch
<i>et al.</i>	<i>et alia</i> (und Andere)
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
<i>F. necrophorum</i>	<i>Fusobacterium necrophorum</i>
FGF	fibroblast growth factor
FGFR2	fibroblast growth factor receptor 2
G	Guanin-Allel
GGH	Graue Gehörnte Heidschnucke
h ²	Heritabilität
HPLC	high performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
ISGC	International Sheep Genomics Consortium
K	Guanin oder Thymin
kb	Kilobase
KGF	keratinocyte growth factor (Keratinozyten Wachstumsfaktor)
KGFR	keratinocyte growth factor receptor
kV	Kilovolt
LAMC2	γ-2 Untereinheit des Laminin 332
LD	linkage disequilibrium (Kopplungsungleichgewicht)
LOR	Loricrin
LS	Leineschaf

LuF	Lehr- und Forschungsstation
M	Adenin oder Cytosin
MALDI	matrix assisted laser desorption ionization (Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation)
MFS	Merinofleischschaf
Mg ²⁺	Magnesium
MHC	major histokompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
min	Minute
ML	Merinolandschaf
ml	Milliliter
MLX	Merinolandschafkreuzung
mM	millimolar
mRNA	Messenger-RNA
MS	Massenspektrometrie
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nm	Nanometer
NSAID	non steroidal anti inflammatory drugs (nicht-steroidale Entzündungshemmer)
NZ	Neuseeland
OA	<i>Ovis aries</i>
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
pers. Mitteilung	persönliche Mitteilung
pH	<i>potentia hydrogenii</i> (pH-Wert)
pmol	Picomol
QTL	quantitative trait locus/loci
R	Adenin oder Guanin
RFLP	Restriktionslängen-Polmorphismus
RH	Rhönschaf
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
S	Cytosin oder Guanin
sec	Sekunde
SKF	Schwarzköpfiges Fleischschaf
SNP	single nucleotide polymorphism
<i>spp.</i>	Subspezies
SSCP	single-strand conformation polymorphism
T	Thymin-Allel
TBE	Tris-Borsäure/EDTA
TE	Tris-EDTA
<i>TGM1</i>	Transglutaminase 1
TOF	time of flight
U	Unit (Einheit)
u. a.	unter anderem
UV	ultraviolett
uvm.	und viele(s) mehr
W	Adenin oder Thymin
WGA	whole-genome amplification
Y	Cytosin oder Thymin
z. B.	zum Beispiel

1 Einleitung

Die Zahl der gehaltenen Schafe in Deutschland ist seit vielen Jahren rückläufig, die Anzahl an Schafen pro Betrieb nimmt jedoch zu. Die Tiere werden überwiegend in standortgebundener Koppelhaltung gehalten, gefolgt von Wanderschäfereien zur Landschaftspflege (Eurostat 2011 <http://ec.europa.eu/eurostat>, Statistisches Bundesamt Deutschland 2011 <http://www.destatis.de>).

Sowohl für die Weide- als auch die Wanderschafhaltung ist ein intakter Bewegungsapparat von entscheidender Bedeutung. Lahmheiten stellen somit ein großes Problem dar. Störungen des Bewegungsapparates gehen mit Leistungsminderung wie verringerter Zunahme, schlechteren Ablammergebnissen und geringerer Wollqualität einher und führen so zu wirtschaftlichen Einbußen. Hinzu kommt die zeit- und kostenintensive Behandlung erkrankter Tiere (Strobel 2009). Eine der wichtigsten Ursachen für Lahmheiten ist die Moderhinke, eine seit über 100 Jahren bekannte infektiöse Klauenerkrankung, die auch Ziegen und Wildwiederkäuer betreffen kann (Ghimire *et al.* 2002, Belloy *et al.* 2007). Sie wird durch mindestens zwei Bakterienarten ausgelöst, *Dichelobacter nodosus* und *Fusobacterium necrophorum* (Beveridge 1941).

Trotz prophylaktischen Möglichkeiten wie z. B. Klauenbad, Klauenschnitt oder Impfung, ist die Bekämpfung der Erkrankung noch immer ein Problem. Der Umwelteinfluss ist groß und die Effekte der einzelnen Behandlungsmaßnahmen sind gering. Dies macht eine Kombination mehrerer Verfahren notwendig was wiederum zu einem höheren Zeitaufwand führt. An der Entwicklung wirkungsvoller Möglichkeiten vor allem zur Vorbeugung mit geringen Nebenwirkungen wird weiterhin geforscht (Bennett & Hickford 2011).

Dass auch eine genetische Komponente bei einer Erkrankung eine Rolle spielt ist seit vielen Jahrzehnten bekannt (Emery *et al.* 1984). Darauf beruht auch der in Neuseeland entwickelte „Footrot Gene Marker Test“, bei welchem Varianten im MHC-II Gen und somit im Immunsystem untersucht werden (Gene-Marker Laboratory, Lincoln University, New Zealand, <http://www.lincoln.ac.nz/gene-marker-lab>).

Die vorliegende Arbeit soll Hinweise auf Merkmale für eine geringere Empfänglichkeit gegenüber einer Moderhinkeerkrankung geben. Dazu werden funktionelle Kandidatengene für den Aufbau des Klauenhorns molekulargenetisch untersucht. Varianten in diesen Genen werden dann auf eine mögliche Assoziation mit der Erkrankung untersucht. Zusätzlich werden ihre Frequenzen in als moderhinkeunempfindlicher geltenden Rassen betrachtet. Diese SNPs können dann bei der Zucht auf weniger empfängliche Tiere berücksichtigt werden.

2 Literaturübersicht

2.1 Moderhinke

2.1.1 Definition und Bedeutung

Moderhinke (*Dermatitis contagiosa interdigitalis*; engl.: *footrot*) ist eine weltweit verbreitete, chronische Infektionskrankheit der Wiederkäuerklaue mit einer sehr großen wirtschaftlichen (Greer 2005, Nieuwhof & Bishop 2005, Byrne *et al.* 2010) wie auch tierschutzrechtlichen Bedeutung (Kümper & Stumpf 2000). Obwohl sie bereits seit über 100 Jahren bekannt ist und seit 1941 von Beveridge auch wissenschaftlich beschrieben ist, stellt die Moderhinke bis heute ein Problem in der Schafhaltung dar. Morgan beklagte bereits 1987, dass nicht genügend Anstrengungen unternommen werden, der Erkrankung Herr zu werden.

Betroffene Tierarten sind neben Schaf (Beveridge 1941) auch Ziege, Rind, Steinbock und Muffelwild (Delétraz 2002, Ghimire *et al.* 2002, Ganter & Lottner 2004, Belloy *et al.* 2007, Volmer *et al.* 2008).

Typischerweise beginnt die Infektion immer im Interdigitalspalt und kann sich von dort auf den gesamten Klauenbereich ausweiten (Egerton *et al.* 1969). Dieser Verlauf hilft, eine Moderhinkeinfektion von anderen Lahmheitsursachen wie Stoppellähme, hohle Wand oder Klauenabszess sowie systemischen Erkrankungen wie *Ecthyma contagiosum* und Blauzungenkrankheit zu unterscheiden (Selbitz 2001).

Moderhinke wird durch das Zusammenspiel des gramnegativen Bakteriums *Dichelobacter (D.) nodosus* (Dewhirst *et al.* 1990) mit weiteren Erregern, allen voran *Fusobacterium (F.) necrophorum*, ausgelöst (Beveridge 1941, Egerton *et al.* 1969). Die Beteiligung weiterer Bakterien wird diskutiert, z. B. Spirochäten und *Treponema spp.*, die immer wieder im Zusammenhang mit Moderhinke gefunden werden (Naylor *et al.* 1998, Demirkan *et al.* 2001, Dhawi *et al.* 2005, Bennett & Hickford 2011). Zusätzlich müssen einige begünstigende Umweltbedingungen gegeben sein, damit diese Faktorenerkrankung ausbricht. Unter optimalen Bedingungen für die beteiligten Erreger ist die Infektion hoch kontagiös, die Prävalenz kann bis auf 100% steigen

(Egerton 2007). Conington *et al.* (2008) berichten von Herdenprävalenzen in England von bis zu 59%.

Vorbeuge- und Bekämpfungsmaßnahmen sind mit hohen Kosten für den Schäfer verbunden. Auch kommt es zu Leistungseinbußen bei erkrankten Tieren, z. B. durch eine schlechtere Wollqualität, eine geringere Gewichtszunahme und niedrigere Abhammergebnisse. Durch eine Moderhinkeinfektion geschwächte Tiere sind außerdem anfälliger für weitere Erkrankungen und ihre Nutzungsdauer ist verkürzt (Nieuwhof *et al.* 2008a, Strobel 2009). Somit hat die Moderhinke auch eine große wirtschaftliche Bedeutung.

2.1.2 Ätiologie

D. nodosus ist ein anaerobes Stäbchenbakterium. Es ist der Haupterreger der Moderhinke und kann als einziger alleine Moderhinke auslösen (Beveridge 1941). Das Bakterium ist ein obligater Parasit der Wiederkäuerklaue. Zu seiner Überlebenszeit außerhalb des Klauenhorns gibt es sehr unterschiedliche Aussagen. Laut Whittington (1995) kann das Bakterium bei optimalen Bedingungen maximal zehn Tage auf der Weide und bis zu sechs Wochen in Klauenstücken nach der Klauenpflege überleben. Morgan (1987) gibt eine Überlebenszeit des Erregers von bis zu zwei Wochen außerhalb des Schafs an, Selbitz (2001) spricht von 30 Tagen. Ganter und Lottner (2004) wiederum berichten, dass der Erreger bis zu drei Jahre in den Klauen infizierter Schafe, auch unter trockenen Bedingungen, überleben kann.

D. nodosus hat als Haupt-Virulenzfaktoren Typ IV-Fimbrien (Strom & Lory 1993). Durch Agglutination kann der Erreger auf Basis seiner Fimbrien-Antigene in zehn Serogruppen (A-I und M) und mindestens 16 Serotypen unterschieden werden (Claxton *et al.* 1983, Chetwin *et al.* 1991, Mattick *et al.* 1991, Zhou *et al.* 2010). Die Serogruppen sind weltweit und auch innerhalb einer Herde unterschiedlich verteilt (Gradin *et al.* 1993, Ghimire *et al.* 1998, Wani *et al.* 2007, Buller *et al.* 2010). Ihre größte Bedeutung haben sie in Bezug auf die Effektivität einer Impfung (Stewart 1978, Wani & Samanta 2006).

Zusätzlich bilden die Bakterien eine thermostabile oder eine thermolabile Protease (Green 1985). Die thermostabile Protease ist mit dem Erscheinungsbild der virulenten

bzw. bösartigen Moderhinke assoziiert (Depiazzi *et al.* 1991). Green (1985) untersuchte die bakteriellen Proteasen nicht nur vom Schaf, sondern auch von Rindern mit interdigitaler Dermatitis, Rothirschen mit unterminiertem Klauenhorn und Ziegen mit Moderhinke. Die Stämme, die dabei von Rind, Rothirsch und Ziege isoliert werden konnten, gehörten alle zur Gruppe derer, welche thermolabilere Proteasen bilden.

Die Anzucht von *D. nodosus* ist schwierig weswegen der sicherste Nachweis des Erregers mit PCR gelingt (La Fontaine *et al.* 1993, Moore *et al.* 2005, Belloy *et al.* 2007).

2.1.3 Pathogenese

Die Entstehung der Krankheit ist sehr komplex und beruht vor allem auf dem Zusammenspiel von *D. nodosus* und *F. necrophorum* (Beveridge 1941, Roberts & Egerton 1969). Ist die Haut im Interdigitalspalt vorgeschädigt oder über einen längeren Zeitraum feucht, kann der ubiquitär vorkommende Boden- und Fäkalkeim *F. necrophorum* einwandern und sich festsetzen. Dies führt zu einer Entzündung der Haut im Zwischenklauenspalt (*Dermatitis interdigitalis*). Der Keim produziert außerdem eine Reihe von Toxinen, die zur Nekrose der obersten Hautschichten führen und ein mikro- bis anaerobes Klima schaffen (Beveridge 1941, Graham & Egerton 1968). *D. nodosus* kann sich dort ansiedeln und bildet keratinolytische Proteasen, welche die Zellen der Dermis verflüssigen. Dies führt zur Trennung der Dermis von der Basalmembran. Der Prozess beginnt immer im Interdigitalspalt und kann sich von dort aus über Ballen und Sohle bis zur abaxialen Klauenwand ausbreiten, was zum Ausschuhlen der Klaue führt (Egerton *et al.* 1969). Die Infektion mit *D. nodosus* fördert wiederum ein noch tieferes Eindringen in das Gewebe durch *F. necrophorum* (Abbott & Lewis 2005). Die beiden Keime unterstützen sich gegenseitig durch die Schäden, die sie verursachen. So kommt es, dass die Krankheit immer weiter fortschreitet (Beveridge 1941, Roberts & Egerton 1969). Weitere Bakterien, besonders ubiquitäre Umweltkeime, können beteiligt sein (siehe Kapitel 2.1.1).

Egerton *et al.* (1969) konnten zeigen, dass auch durch das Verletzen der Haut im Interdigitalspalt und das Auftragen von *D. nodosus* eine Moderhinkeinfektion ausgelöst werden kann, wenn zusätzlich ein anaerobes Klima, z. B. durch Einbandagieren,

geschaffen wird. Bei keinem der anderen Keime, die bei Moderhinke auf der Klaue gefunden wurde, ist dies möglich. *D. nodosus* selbst kann in die Haut nicht eindringen wenn diese nicht bereits geschädigt ist (Beveridge 1941). Das bedeutet, dass der Keim auf der Klaue vorhanden sein kann ohne dass eine Moderhinke-erkrankung besteht.

2.1.4 Epidemiologie

2.1.4.1 Umweltfaktoren

Beveridge beschreibt bereits 1941 die Umweltfaktoren, die sich begünstigend auf ein Festsetzen von *D. nodosus* auswirken und so Wegbereiter für eine Moderhinke-erkrankung sind. Untersuchungen in späteren Jahren konnten diese Beobachtungen bestätigen und teilweise ergänzen (Roberts & Egerton 1969, Whittington 1995). Die Faktoren sind:

- eine durchschnittliche Tagestemperatur von mindestens +10° Celsius
- ein feuchtes Klima und dadurch eine feuchte Haut im Interdigitalspalt, z. B. durch Niederschläge oder durchweichte Böden
- harte, steinige Böden, die zu Läsion der Zwischenklauenhaut führen können.

Der Einfluss der Umwelt wird deutlich, wenn man die Situation in verschiedenen Klimabereichen vergleichend betrachtet, z. B. den Westen Australiens und England. In England, wo das Klima kontinuierlich feucht ist und es keine längeren Trockenperioden gibt, tritt Moderhinke das ganze Jahr über mit nur minimalen jahreszeitlichen Schwankungen auf. In Westaustralien dagegen gibt es in den Sommermonaten eine Periode starker Trockenheit, während der keine Neuinfektionen auftreten (Wassink *et al.* 2003).

2.1.4.2 Tierindividuelle Faktoren

Über die Empfänglichkeit des einzelnen Tieres wurde bereits viel geforscht, häufig mit widersprüchlichen Ergebnissen. Bei Untersuchungen von Woolaston (1993) und Conington *et al.* (2008) zeigte sich, dass die Tiere mit zunehmendem Alter häufiger und/oder stärker an Moderhinke erkrankten. Nieuwhof *et al.* (2008b) hingegen

stellten fest, dass bei ihrer Studie an Scottish Blackface Schafen die Lämmer häufiger und stärker erkrankten als die Mutterschafe.

Tiere mit einem höheren Körpergewicht scheinen empfänglicher zu sein (Beveridge 1941, Skerman *et al.* 1988, Nieuwhof *et al.* 2008b), was auch mit den Berichten in Verbindung stehen kann, dass Böcke empfänglicher als weibliche Schafe seien (Skerman *et al.* 1988). Ein weiterer Grund dafür könnte sein, dass die Gesamtfläche der Klauenhornröhrchen bei weiblichen Tieren rasseunabhängig größer ist als bei männlichen Tieren, wodurch das Wasseraufnahmevermögen bei ihnen geringer ist (Erlewein 2002). Allerdings konnte Schuler (1996) bei seinen Untersuchungen in Tiroler Bergschafzuchten weder Geschlechts- noch Altersunterschiede ermitteln.

Kaler *et al.* (2010) fanden heraus, dass die Wahrscheinlichkeit an Moderhinke zu erkranken für ein Tier geringer war, je länger die letzte Moderhinkeinfektion zurücklag.

Über Rasseunterschiede gibt es teilweise widersprüchliche Berichte. Allgemein gelten die feinwolligen Merinoschafe als am empfänglichsten (Emery *et al.* 1984, Jopp *et al.* 1984a, Morgan 1987). Bei den Untersuchungen von Emery *et al.* (1984) an fünf Schafrassen waren Tiere der Rasse Romney am resistentesten. Die australische Rasse Broomfield Corridales, eine Rasse, die auf Moderhinkereselektivierung selektiert wurde, wird als am unempänglichsten angesehen (Skerman & Moorhouse 1987). Bei ihren Untersuchungen mit Tieren der Rassen Dorset, Dorper, Gulf Coast Native, Katahdin und St. Croix konnten Burke & Parker (2007) keinen Rasseeinfluss erkennen.

Aus Deutschland berichtete Rahmann (2003) von drei Herden, bei denen die schwersten Moderhinkefälle bei Merinolandschafen auftraten. Coburger Fuchsschafe sowie Schwarzköpfige Fleischschafe, Bentheimer Landschaft und Rhönschafe erkrankten seltener und schwächer und die Infektion war bei ihnen leichter wieder in den Griff zu bekommen. Bei den Bentheimer Landschaften wird die geringere Moderhinkeanfälligkeit auch bei der Beschreibung des Rassebilds hervorgehoben (Sambras 2010). Die erhöhte Anfälligkeit der Merinolandschafe gegenüber sogenannten Landrassen und Kreuzungstieren konnten auch Thoms (2006) sowie Kuhleemann (2011) bei ihren Untersuchungen an deutschen Herden beobachten.

Unterschiede bei der Immunantwort und im Immunsystem der Tiere werden immer wieder vermutet und wurden bereits untersucht. Escayg (1995) und Escayg *et al.* (1997) kamen in ihren Untersuchungen zu dem Schluss, dass der MHC-Klasse-II-Komplex (Haupthistokompatibilitätskomplex) einen Einfluss auf Häufigkeit und Ausprägung einer Moderhinkeerkrankung hat. Dagegen halten Emery *et al.* (1984) die Haut als Barriere für den wichtigsten Faktor. Sie fanden vor der Unterminierung des Klauenhorns keine Unterschiede in der Immunantwort.

2.1.4.3 Infektionsquellen und Übertragung

Aufgrund der kurzen Überlebenszeit des Erregers außerhalb der Schafklaue ist die Übertragung von Schaf zu Schaf von größter Bedeutung (Lottner 2006). Besonders subklinisch und chronisch kranke Tiere stellen eine große Gefahr dar. Sie zeigen unter Umständen selbst keine Lahmheit, können den Erreger aber über eine lange Zeit im Bestand verbreiten und Weideflächen kontaminieren (Depiazzi *et al.* 1991, Whittington 1995, Ganter & Lottner 2004). Eine indirekte Übertragung auf Weideflächen wurde bisher allerdings nur dann gesichert nachgewiesen, wenn die Kontamination weniger als 24h zurück lag (Whittington 1995).

Eine weitere Infektionsquelle sind ungenügend gereinigte Klauenmesser, besonders bei der Behandlung im Rahmen einer Moderhinkesanie rung. Das Einschleppen über Schuhe und Kleidung scheint eher unwahrscheinlich (Lottner 2006).

Die Übertragung durch andere Tierarten ist eine weitere wichtige Infektionsquelle. Besonders Ziegen, bei denen die Erkrankung in der Regel wesentlich milder verläuft als beim Schaf, stellen ein hohes Risiko dar (Ghimire *et al.* 1999). Diesen mildereren Verlauf erklären Ghimire *et al.* (1999) dadurch, dass die Haut im Interdigitalspalt der Ziege wesentlich dicker ist als die des Schafes. Zudem haben Ziegen eine angeborene Resistenz gegen schwerwiegende Ablösungen des Klauenhorns.

Als eine weitere Infektionsquelle kommen Wildwiederkäuer wie Mufflons oder auch der Steinbock in Frage. Bei Steinböcken scheint die Übertragung vom Schaf auf das Wildtier die größere Rolle zu spielen, da sich die Erkrankung in Wildpopulationen nicht hält (Ryser & Hoby 2004).

Auch von Rinderklauen können häufig *D. nodosus*-Stämme isoliert werden. Die betroffenen Tiere zeigen dabei keine gravierenderen Krankheitssymptome als eine geringgradige Dermatitis und auch dies nur selten (Richards *et al.* 1980, Bennett *et al.* 2009). Bei Schafen lösen diese Stämme des Erregers die gutartige Moderhinke aus (Laing & Egerton 1978, Richards *et al.* 1980, Egerton 2007).

2.1.5 Klinisches Bild und Diagnose

Prinzipiell können ein bis vier Gliedmaßen betroffen sein. Die Erkrankung beginnt im Interdigitalspalt mit einer interdigitalen Dermatitis. Im weiteren Krankheitsverlauf breitet sie sich von dort bis zur Klauenspitze aus (Abb. 2-1). Dabei lösen sich Klauen- und Sohlenhorn immer weiter voneinander, was zum Ausschuhren der Tiere führen kann. Betroffene Tiere zeigen teilweise hochgradige Lahmheit (Stützbeinlahmheit) und verlieren, wenn die Krankheit über einen längeren Zeitraum besteht, deutlich an Gewicht. Durch die keratinolytischen Prozesse im Zwischenklauenspalt (siehe Kapitel 2.1.3) kommt es zu dem typischen süßlichen Geruch und der Ansammlung einer schmierigen, grau-weißen, pastösen Masse (Egerton 2007).

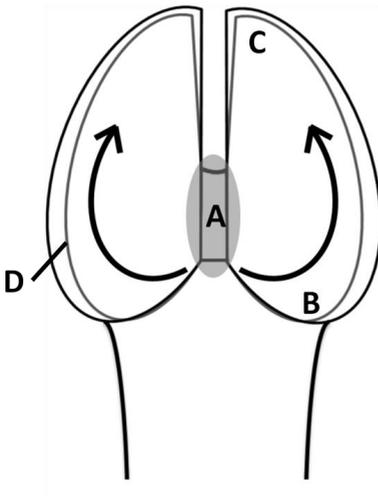


Abb. 2-1: Schematische Darstellung der Ausbreitung einer Moderhinkeinfektion. Ansicht einer Schafklaue von ventral; A = Zwischenklauenspalt; B = Ballen; C = Klauenspitze; D = Weiße Linie

Es wird eine gutartige (benigne) und eine bösartige (virulente) Form der Moderhinke unterschieden. Ätiologisch handelt es sich dabei um Infektionen mit unterschiedlichen Stämmen des Erregers *D. nodosus* (Egerton & Parsonson 1969, Liu 1994). Zusätzlich wird, besonders in Australien, noch von einer intermediären Form gesprochen. Sie liegt in ihrer Ausprägung zwischen den beiden erstgenannten und wird von subvirulenten Stämmen ausgelöst (Liu 1994, Abbott & Egerton 2003). Untersuchungen aus England und Wales kommen allerdings zu dem Schluss, dass diese Einteilung dort nicht einfach übernommen werden kann, da die Bakterienstämme und das von ihnen ausgelöste klinische Bild nicht zu diesem Schema passen (Moore *et al.* 2005).

Die Unterscheidung von benignen und virulenten Stämmen kann zum einen mittels eines Gel-Tests auf die bei virulenten Stämmen vorkommende hitzestabile Protease geschehen. Zudem gibt es die Möglichkeit mit PCR *intA*, ein Fimbrien-Antigen von virulenten Stämmen, nachzuweisen (Cheetham *et al.* 1995, Cheetham *et al.* 2006).

Bei der gutartigen Moderhinke steht die interdigitale Dermatitis im Vordergrund. Nur sehr selten kommt es bei einzelnen Tieren, nicht mehr als 1-2% der Herde, zu einer geringgradigen Unterminierung des Klauenhorns. Eine Behandlung schlägt bei dieser Form gut an (Egerton 2007). Ein Problem ergibt sich dadurch, dass die Erregerstämme auch lange unerkannt in der Klaue persistieren können (Egerton & Parsonson 1969, Depiazzi *et al.* 1998).

Bei der bösartigen Moderhinke ist die Herdenprävalenz deutlich höher als bei der gutartigen Form und sehr viele Tiere zeigen eine hochgradige Unterminierung des Klauenhorns. Diese Form der Moderhinke ist am einfachsten und schon bei der Untersuchung weniger Schafe einer Herde zu erkennen (Egerton 2007).

Selbsteheilungen können in allen Stadien vorkommen, vor allem wenn die Klimabedingungen für *D. nodosus* ungünstig sind wie z. B. während Perioden längerer Trockenheit oder Frost (Egerton 2007).

Differentialdiagnostisch sind Verletzungen und sonstige Lahmheitsursachen im Bereich der Klaue zu berücksichtigen, außerdem systemische Erkrankungen, die ebenfalls die Klaue betreffen können. Bei genauer Betrachtung sind diese meist sehr

einfach auszuschließen (Egerton 2007), auch da die Moderhinke durch ihre hohe Kontagiösität in der Regel nur als Herdenerkrankung auftritt (Strobel 2009).

Die einzelnen Stadien der Krankheit können in Schweregrade eingeteilt werden. Ein einfaches System, bei welchem jede Klaue einzeln betrachtet wird, wurde von Egerton & Roberts (1971) entwickelt. Es besteht aus den Graden 1 und 2 für eine leichte bzw. schwere interdigitale Dermatitis sowie 3 bei Ablösung des Horns, 4 wenn diese Unterminierung sich bis zur abaxialen Wand fortsetzt. Eine Reihe von Autoren habe diese Einteilung, teilweise modifiziert, übernommen (u. a. Woolaston 1993, Thoms 2006, Conington *et al.* 2008). Eine Einschätzung der Effektivität und Genauigkeit der unterschiedlichen Methoden einer Gradeinteilung bei Moderhinke geben Whittington & Nicholls (1995). Sie stellten fest, dass das einfache Modell von Egerton & Roberts am praktikabelsten sei. Sowohl Conington *et al.* (2008) als auch Nieuwhof *et al.* (2008b) halten die Gradeinteilung nach Egerton & Roberts für ein gutes Kriterium um weniger empfängliche Tiere für die Zucht auszuwählen. Thoms (2006) sieht den Nutzen der Einteilung in Scores besonders zu Beginn einer Bestandsanierung um die Erkrankungsinzidenz festzustellen und Entscheidungen über Merzungen einzelner Tiere zu treffen. Nieuwhof *et al.* (2008b) weisen darauf hin, dass auch bei ausgebildeten Personen signifikante Unterschiede bei der Einteilung in Schweregrade bestehen und dieser Effekt bei der Beurteilung mit berücksichtigt werden muss. Außerdem sinkt die Sicherheit der Aussage, je seltener die Klauen der Tiere untersucht werden, da dann der Verlauf der Erkrankung nicht klar ist.

2.1.6 Behandlung

Für die Bekämpfung der Moderhinke bestehen eine Reihe an Behandlungsempfehlungen sowohl für das Einzeltier als auch auf Herdenbasis (Hosie 2004, Lottner & Ganter 2004, Abbott & Lewis 2005, Strobel 2009, Bennett & Hickford 2011). Über die effektivste Vorgehensweise herrscht jedoch Uneinigkeit.

2.1.6.1 Klauenschnitt

Beim Klauenschnitt werden überstehende, lose oder verwachsene Hufhornanteile entfernt. Es gibt bei einer an Moderhinke erkrankten Herde zwei Vorgehensweisen

(Strobel 2009). Zum einen den „sanften“ Klauenschnitt (Moderhinke-Schnitt), bei dem nur vorsichtig verwachsene und gelöste Hornstücke entfernt werden und Blutungen unbedingt vermieden werden sollen. Dieser ist vorzuziehen, wenn zusätzlich eine systemische Antibiose und/oder Klauenbäder zum Einsatz kommen. Zum anderen steht der chirurgische Klauenschnitt zur Wahl. Dabei werden radikal alle losen Hornstücke bis zum gesunden Gewebe entfernt. Bei diesem Vorgehen kommt es häufiger zu Blutungen. Soll vor allem mit oberflächlich wirksamen, versiegelnden Mitteln zur lokalen Anwendung weiter behandelt werden (z. B. CTC Blauspray®, Novartis Tiergesundheit GmbH), eignet sich eher der chirurgische Schnitt. Die Notwendigkeit und der Nutzen des Klauenschnitts sind nicht unumstritten. Hosie (2004) rät nur im äußersten Notfall zu dieser Methode. Sollen die Klauen geschnitten werden, empfiehlt er dies nur kurz vor einem Klauenbad und nur bei deutlich deformierten Klauen. Er weist auch auf die Infektionsgefahr hin, die von Hornteilen infizierter Tiere ausgeht. Bei gesunden Klauen hält er einen Klauenschnitt für überflüssig. Auch Kuhleemann (2011) konnte in ihren Untersuchungen keinen Vorteil durch die Klauenpflege bei der Moderhinkebekämpfung nachweisen. Ebenso war kein Zusammenhang zwischen der Frequenz der Klauenpflege und dem Auftreten einer Moderhinkeerkrankung zu erkennen.

Studien aus dem Vereinigten Königreich haben gezeigt, dass viele Schäfer die Klauen ihrer Schafe regelmäßig schneiden, um einer Moderhinkeinfektion vorzubeugen (Wassink & Green 2001). Für die Wirksamkeit dieser Annahme sehen Wassink *et al.* (2003), Abbott & Lewis (2005) und Strobel (2009) jedoch keine wissenschaftlich belegbaren Beweise. Wassink *et al.* (2003) stellten fest, dass eine häufige Klauenkorrektur die Moderhinkeprävalenz in Betrieben steigen lässt und raten dazu eine Herdenbehandlung nicht häufiger als einmal pro Jahr durchzuführen.

2010 machten Kaler *et al.* in einer Studie die Beobachtung, dass Tiere umso länger gesunde Klauen haben, je länger ihre Klauen bereits in gutem Zustand sind. Tiere mit schlechten Klauen hingegen entwickelten eher eine Lahmheit. Zudem sank die Wahrscheinlichkeit, an einer Lahmheit zu erkranken, je länger die Tiere bereits lahmfrei waren. Abbot & Lewis (2005) sehen die verwachsenen und deformierten Klauen eher als ein Resultat der Erkrankung denn ihre Ursache.

2.1.6.2 Klauenbad

Das Klauenbad ist eine schnelle Methode um eine große Anzahl an Tieren zu behandeln (Strobel 2009). Die am häufigsten empfohlenen und eingesetzten Wirkstoffe sind Zinksulfat (10%), Kupfersulfat (5-10%) und Formalin (maximal 5%) (Lottner & Ganter 2004, Strobel 2009). Probleme ergeben sich dadurch, dass in Deutschland momentan kein Klauenbad als Tierarzneimittel zur Behandlung von Klauenkrankungen zugelassen ist. Klauenbäder können jedoch verwendet werden, wenn sie durch einen Tierarzt, nach Umwidmung bei Therapienotstand, verschrieben werden. Das Klauenbad kann dann in einer Apotheke auf Rezept hergestellt werden (§ 56a Arzneimittelgesetz (AMG) vom 24.08.1976, letzte Änderung 19.07.2011).

Wichtige Faktoren bei der Wirksamkeit eines Klauenbades sind (Lottner & Ganter 2004):

- Behandlung an einem trockenen Tag, nicht bei Regen oder Matsch,
- korrekte Konzentration über einen entsprechend langen Zeitraum,
- bei stark verschmutzten Klauen vorheriges Säubern (Klauenpflege, Treiben durch eine wassergefüllte Wanne),
- stehen der Tiere auf trockenem Untergrund für mindestens eine Stunde nach dem Klauenbad,
- anschließend Verbringen der Tiere auf eine Weide, die mindestens fünf Tage frei von Schafen war.

Für das genaue Vorgehen sowie die Einrichtung eines Fußbades gibt es einige Anleitungen (z. B. Lottner & Ganter 2004, Strobel 2009).

2.1.6.3 Antibiose

Für die Antibiose stehen sowohl lokal aufzubringende Antibiotika (z. B. Chlorhexatetracyclinhydrochlorid, CTC Blauspray®) als auch systemische Mittel zur Verfügung. Die lokale Behandlung wird häufig an den Klauenschnitt angeschlossen, wenn für die Tiere kein Klauenbad zur Verfügung steht (Strobel 2009).

Laut Hosie (2004) wird häufig Penicillin-Streptomycin, in höheren Dosen als sonst üblich, gegeben. Abhängig von den Umweltbedingungen kann damit eine Heilung bei mindestens 90% der Tiere erreicht werden (Hosie 2004). Dieser Erfolg ist

allerdings selten langfristig. Häufig kommt es innerhalb kurzer Zeit wieder zu Krankheitsfällen, da kein Schutz vor Reinfektion besteht (Lottner & Ganter 2004). Behandlungen mit Antibiotika sind mit hohen Kosten verbunden und im Anschluss müssen immer Wartezeiten eingehalten werden.

Wassink *et al.* (2010) geben an, dass in Betrieben, die Tiere bereits bei den ersten Anzeichen einer Moderhinkeinfektion mit parenteraler Antibiose versorgen, die Prävalenz unter 2% beträgt. Wird nur der Klauenschnitt als Behandlung angewendet beträgt sie 9%. Eine weitere Studie von Kaler *et al.* (2010) verglich die Wirkung der Behandlung mit Antibiotika (Oxytetracyclin), Klauenschnitt und nicht-steroidalen Antiphlogistika (NSAIDs, Flunixinmeglumin) miteinander. Den schnellsten Heilungserfolg gab es nach der Gabe von Antibiotika. Die Gabe von NSAIDs hingegen beeinflusste weder die Heilungsrate noch den Heilungserfolg.

2.1.6.4 Kurative Impfung

Die kommerziell erhältliche Vakzine Footvax® (*Intervet*) kann auch bei einer bereits bestehenden Erkrankung eingesetzt werden. Der Effekt der Behandlung kann schon wenige Tage nach der Injektion beobachtet werden und kann, bei einer zweimaligen Injektion, bei 80% der behandelten Tiere zu einer Abheilung der Läsionen führen (Hosie 2004).

2.1.7 Prävention

2.1.7.1 Immunisierung

Nach einer überstandenen Moderhinkeinfektion zeigen Schafe eine kurzzeitige protektive Immunität gegen Reinfektion (Beveridge 1941; Egerton & Roberts 1971; Emery 1984).

Der einzige in Deutschland momentan zugelassene kommerzielle Moderhinkeimpfstoff ist Footvax® der Firma *Intervet*. Er enthält die inaktivierten Serotypen A, B1, B2, C, D, E, F, G und H (jeweils 10 µg Pili/ml) sowie I (5 × 10⁸ Zellen/ml) und deckt damit 95% des in Deutschland vorhandenen Erregerspektrums ab (Lottner & Ganter 2004, Strobel 2009). Der Hersteller empfiehlt zwei Impfungen im Abstand von

4 - 6 Wochen und eine Nachimpfung alle sechs Monate, in besonders gefährdeten Gebieten alle 4 - 5 Monate. Tritt die Erkrankung nur einmal jährlich auf, reicht in der Regel eine einmalige Nachimpfung etwa sechs Wochen vor Beginn der kritischen Jahreszeit. Lämmer können ab einem Alter von zwölf Wochen geimpft werden.

Ein großes Problem des Impfstoffs ist, dass die Vakzine Mineralöl enthält und deshalb nur streng subkutan appliziert werden darf. Besonders in Gelenken und in Gelenksnähe, aber nicht nur dort, kann das Mineralöl zu erheblichen Problemen und Schäden führen. Auch bei bestimmungsgemäßer Anwendung bereitet das Adjuvants Probleme. Lottner (2006) beobachtete vier Wochen nach der ersten Injektion bei bis zu 44% der Tiere lokale Reaktionen wie Schwellungen und Abszesse. Bei einer Untersuchung von Lambell (1986) hatten sogar 93,5% der Schafe Läsionen an der Injektionsstelle. Ohne Zahlen zu nennen weisen auch andere Autoren auf die häufigen und teilweise starken Impfreaktionen bei Anwendung von Footvax® hin (Abbott & Lewis 2005, Nuss & Janett 2007, Strobel 2009).

Durch die Kombination vieler *D. nodosus* Serotypen soll ein möglichst breiter Schutz erreicht werden. Es hat sich allerdings gezeigt, dass die immunologische Antwort auf jeden einzelnen Serotyp geringer ausfällt als bei Impfungen mit nur einem Serotyp (O'Meara *et al.* 1993, Hunt *et al.* 1994, Raadsma *et al.* 1999).

Eine weitere Möglichkeit der Vakzination ist die Herstellung eines bestandspezifischen Impfstoffs. Dies ist ein inaktivierter Impfstoff, der unter Verwendung eines in einem bestimmten Bestand isolierten Krankheitserregers hergestellt wird und nur in diesem Bestand angewendet wird. Die Herstellung wird von der Verordnung über Sera, Impfstoffe und Antigene (TierImpfStV vom 24.10.2006, letzte Änderung 17.07.2009) und dem Tierseuchengesetz (TierSG vom 26.06.1909, letzte Änderung 09.12.2010) geregelt.

Versuche haben gezeigt, dass stallspezifische Impfstoffe gegen Moderhinke gut wirksam sind (Gurung *et al.* 2006, Lottner 2006).

Lottner (2006) verglich den kommerziellen Impfstoff mit einer bestandspezifischen Vakzine. Sie zeigte, dass beide effektiv in der Bekämpfung und Vorbeugung gegen eine Moderhinkeinfektion waren. Schafe, die mit einem bestandspezifischen Impf-

stoff immunisiert wurden, hatten vier Wochen nach der ersten Injektion deutlich weniger lokale Hautveränderungen an der Impfstelle (13%) als die mit Footvax® geimpften Tiere (44%). 16 Wochen nach der Impfung hatten noch 20% der mit Footvax® geimpften Tiere einen palpatorischen Befund an der Impfstelle, im Gegensatz zu 1% in der anderen Gruppe. Der stallspezifische Impfstoff war in dieser Untersuchung effektiver. Die Moderhinke-Prävalenz verringerte sich um 20% im Vergleich zu 10% bei den Tieren, die mit der kommerziellen Vakzine geimpft wurden. Zudem kam es seltener zu Unterminierungen des Klauenhorns.

2.1.7.2 Eradikation

Die Eradikation der Erkrankung ist prinzipiell möglich, da der Erreger nicht länger als sieben Tage außerhalb der Klaue überleben kann und die bösartige Moderhinke nicht subklinisch vorkommt (Beveridge 1941, Abbott & Lewis 2005).

Für die Sanierung eines Betriebes ist die einfachste Methode, den Hof für mindestens sieben Tage frei von Schafen und Ziegen zu halten und danach gesunde, nicht infizierte Tieren neu einzustallen (Abbott & Lewis 2005).

Will man eine Herde frei von Moderhinke bekommen kann das erreicht werden ohne alle Tiere zu keulen. Dazu müssen alle Tiere untersucht und erkrankte Schafe erfolgreich behandelt oder aus dem Betrieb entfernt werden. Um den moderhinkefreien Status aufrecht zu halten dürfen neue Tiere nur in die Herde integriert werden, wenn sie aus einem nachgewiesenen moderhinkefreien Betrieb kommen. Alternativ können auch Tiere mit unklarem Moderhinkestatus nach einer Quarantäneperiode in die Herde aufgenommen werden. Die Dauer der Quarantäne ist abhängig davon, ob die Tiere in dieser Zeit prophylaktisch gegen Moderhinke behandelt werden und ob es Jahreszeiten gibt, in denen keine Übertragung der Erkrankung stattfindet (Abbott & Lewis 2005).

Bereits in den 1940er Jahren wurden in Australien Strategien zur Tilgung entwickelt, welche im Laufe der Jahrzehnte immer wieder durch neue Diagnosemöglichkeiten und Behandlungsstrategien erweitert und ergänzt wurden (Western Australia Department of Agriculture 2001). In New South Wales konnte so die Herdenprävalenz für bösartige Moderhinke auf unter 1% gesenkt werden (Macdonald 2009).

Ähnliche Bestrebungen in Großbritannien waren bisher erfolglos. Die Strategie aus Australien kann nicht einfach übernommen werden, da sich zum einen das Klima stark von dem in New South Wales und Western Australia unterscheidet und zum anderen die Mitarbeit der Schäfer geringer ist (Wassink *et al.* 2005, Green & George 2008). In Australien und Neuseeland gibt es Jahreszeiten, in denen keine Übertragung des Erregers stattfindet (Jopp *et al.* 1984a, 1984b). In Großbritannien, wie auch in Deutschland gibt es solche Perioden jedoch nicht (Hosie 2004).

Die Schweiz arbeitet ebenso daran, die Moderhinke komplett auszurotten. Janett (1993) berichtet von einer Gemeinde im Kanton Graubünden, in welcher dies innerhalb eines Jahres erreicht werden konnte. Dazu wurden die Tiere in eine gesunde und eine kranke Herde eingeteilt. Die Behandlung erfolgte mit einer Kombination aus Klauenschnitt, Klauenbad und Antibiotikagabe bei schweren Fällen sowie Impfung der Zuchttiere und vierwöchiger Quarantäne für Neuzugänge. Der Beratungs- und Gesundheitsdienst für Kleinwiederkäuer (BGK) bietet seit wenigen Jahren zudem ein Moderhinke-Sanierungsprogramm für Schafe an (<http://bgk.caprovis.ch/cms09/showsingle.asp?lang=1&urlid=9>).

2.1.7.3 Heritabilitäten (h^2)

Heritabilitätsschätzungen wurden bereits häufig durchgeführt. Die höchsten Werte ermittelten Skerman *et al.* (1988) für Schafe der Rasse Romney mit $h^2 = 0,28$ und Woolaston (1993) an Merinoschafen mit $h^2 = 0,20 \pm 0,14$. Lottner (2006) gibt für die Moderhinkeanfälligkeit bei Merinolandschafen Werte von $0,07 \pm 0,13$ an. h^2 -Werte von $0,04 - 0,08$ schätzten Russell *et al.* (2010) in einer Studie an Lämmern mehrerer Rassen und auch Kreuzungstieren auf einem Betrieb in Großbritannien. Weitere Schätzungen in Großbritannien für Berggrassen und langwollige Rassen kommen zu h^2 -Werten von $0,045$ bzw. $0,05$ (Sawalha *et al.* 2010). Das Vergleichen der Werte ist jedoch schwierig, da sich die Versuchsbedingungen und Kriterien für die Einteilung „gesund“ und „krank“ teilweise deutlich unterscheiden.

2.1.7.4 Resistenzzucht

Eine Zucht mit dem Haupt-Selektionskriterium „Moderhinkerresistenz“ wurde auf einem Betrieb in Neuseeland durchgeführt. Die Ursprungspopulation bestand aus 40 Tieren der Rasse Corriedale im Jahr 1967. Ab 1971/72 kaufte der Betrieb keine Tiere mehr zu. Es gab keine Moderhinkeprophylaxe und alle Tiere, die an Moderhinke erkrankten wurden gekeult, so dass nur noch mit Tieren ohne klinisch apparente Moderhinke gezüchtet wurde. Skerman & Moorehouse (1987) machten mit Tieren dieser neuen Linie „Broomfield Corriedale“ Infektionsversuche. Dabei zeigte sich, dass Tiere dieser Linie wesentlich seltener an Moderhinke erkrankten und wenn doch, die Infektion wesentlich milder verlief als bei Tieren der Vergleichsrassen Merino und Corriedale.

2.1.7.5 Footrot Gene-Marker Test

Assoziationsstudien für Moderhinke (Outteridge *et al.* 1989, Escayg 1995, Escayg *et al.* 1997) haben eine Beziehung zwischen Haplotypen des hoch polymorphen DQA_2 -Gens des MHC-Klasse-II-Komplexes (Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse II) und einer Moderhinkeerkrankung gefunden. Auf Basis dieser Ergebnisse wurde an der neuseeländischen Lincoln Universität der „Footrot Gene-Marker Test“ entwickelt (Gene-Marker Laboratory, <http://www.lincoln.ac.nz/gene-marker-lab>). In Neuseeland werden die Ergebnisse dieses Tests im Rahmen der Zucht auf Moderhinkerresistenz eingesetzt. Ein Scoring System gibt Hinweise über die Empfänglichkeit des untersuchten Schafes für Moderhinke (Abb. 2-2). Die Durchführung des Tests ist zurzeit nur am Department of Agricultural Science der Lincoln Universität in Neuseeland möglich.

Studien aus Deutschland (Lottner 2006) und Griechenland (Gelasakis *et al.* 2010) konnten diese Ergebnisse für Schafpopulationen im entsprechenden Land allerdings nicht oder nur eingeschränkt bestätigen. Dies kann auch mit den unterschiedlichen Serogruppen des Erregers *D. nodosus* und deren regional sehr unterschiedlichen Verteilung zusammenhängen. Ennen *et al.* (2009) empfehlen eine Kombination von Vakzination und genetischer Selektion. Bennett & Hickford (2011) weisen in diesem Zusammenhang darauf hin, dass der Nutzen eines Gentests außerhalb der Rassen und Population, in denen er entwickelt wurde, problematisch sein kann.

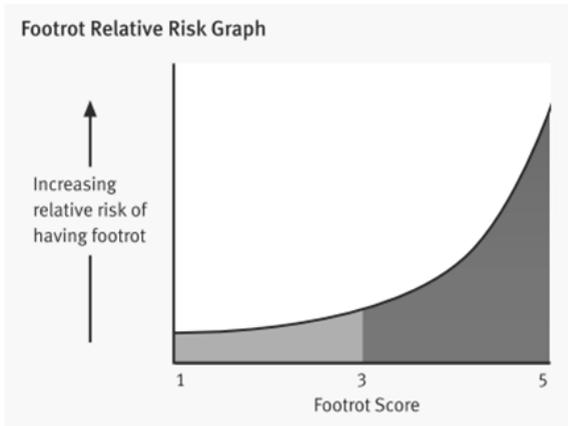


Abb. 2-2: Darstellung der Beziehung zwischen dem Moderhinke-Score des „footrot gene-marker test“ und dem Risiko eines Schafes, an Moderhinke zu erkranken (www.lincoln.ac.nz/gene-marker-lab). Auf der X-Achse ist der aus der Genotypisierung ermittelte Moderhinke-Score dargestellt, auf der y-Achse die relative Wahrscheinlichkeit des Tieres, an Moderhinke zu erkranken.

2.2 Molekulargenetische Charakterisierung des Genoms

2.2.1 Untersuchung von Polymorphismen auf DNA-Basis

Sequenzvarianten der DNA können ganze Gen- und Chromosomenabschnitte betreffen oder nur einzelne Basen, sogenannte single nucleotide polymorphisms (SNPs). Diese SNPs haben den größten Anteil an den Unterschieden zwischen zwei Individuen derselben Art (Kwok 2001) und treten im Schnitt in einem Abstand von 500-1000 Basen auf (Bentley 2004). Sie sind jedoch nicht regelmäßig über das Genom verteilt sondern konzentrieren sich in manchen Regionen wohingegen andere kaum Veränderungen aufweisen. Die wenigsten SNPs haben biologische Konsequenzen und direkt sichtbare funktionelle Effekte, die überwiegende Mehrzahl befindet sich in nichtkodierenden Regionen (Jorde *et al.* 2000). Eine Datenbank mit allen bekannten SNPs findet sich unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>.

Andere mögliche Veränderungen der DNA sind Deletion oder Substitution längerer Abschnitte. Dies kann bereits seit den 1960er Jahren indirekt dargestellt werden, zum Beispiel durch Allozyme (eine Wortkreation aus dem Satz „allelic variants of

enzymes“) (Schlötterer 2004). Der Durchbruch für die Untersuchung der DNA kam mit der Entdeckung und Entwicklung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Mullis & Faloona 1987). Diese führte nicht nur zur Entwicklung neuer Methoden, sondern eröffnete auch bei bereits genutzten Methoden wie Restriktionslängen-Poly-morphismus (RFLP) neue Möglichkeiten (Schlötterer 2004).

2.2.1.1 Sequenzierung

Der Standard bei der Sequenzierung ist die von Sanger *et al.* 1977 entwickelte Ketten-abbruchmethode. Dabei wird die zu sequenzierende DNA in vier Ansätzen amplifiziert. Pro Ansatz ist jeweils eines der Didesoxynucleotiden (dNTPs) so verändert, dass kein weiteres Nukleotid angeknüpft werden kann. Anschließend werden die Produkte in einem denaturierenden Polyacrylamidgel entsprechend ihrer Länge aufgetrennt. Über die Laufstrecke der einzelnen Fragmente kann die Sequenz des DNA-Abschnitts bestimmt werden. Diese Technik hat sich seit der ersten Beschreibung stetig weiterentwickelt. In der Zwischenzeit sind automatische DNA-Sequenziergeräte weit verbreitet. Durch die Verwendung von Kapillaren anstelle flacher Gele konnte die Feldstärke bei der Elektrophorese erhöht und dadurch die Laufzeit deutlich vermindert werden. So können jetzt in ein bis vier Stunden Sequenzen mit einer Länge von 500 bis 900 Nukleotiden gelesen werden (Bangsow *et al.* 2007). Die Sequenzierung wird in der Regel zur Analyse von DNA-Abschnitten und so zum Aufspüren von Mutationen verwendet, zum Beispiel im Rahmen von Kandidatengenstudien.

Eine Variante, die vor allem zur Sequenzierung ganzer Genome genutzt wird, ist die sogenannte Shotgun-Sequenzierung (Venter *et al.* 1998). Dabei wird die DNA in kleinen Stücken sequenziert. Auf die Gesamtsequenz wird anschließend vor allem mit Hilfe statistischer Methoden und Programme geschlossen. So konnte 2001 das erste menschliche Genom vollständig sequenziert werden (Venter *et al.* 2001). Diese Methode wurde auch vom International Sheep Genomics Consortium (Archibald *et al.* 2010) für die Referenzsequenz des Schafgenoms genutzt, genauso wie für die Sequenzierung des ovinen MHC-Klasse-II-Komplexes (Gao *et al.* 2010).

Will man bereits bekannte DNA-Varianten untersuchen, gibt es schnellere, einfachere und kostengünstigere Methoden als die Sequenzierung ganzer Gene oder Genabschnitte. Zum Beispiel die von Sokolov 1990 erstmals beschriebene Primer-extension (Minisequenzierung), bei welcher die DNA-Synthese auf maximal einen Schritt reduziert wird. Die Minisequenzierung kommt bei der DNA-Microarray Technik zum Einsatz.

2.2.2. Assoziation von Genotyp und Phänotyp

Variationen auf DNA-Ebene können Hinweise auf den zu erwartenden Phänotyp geben, z. B. Leistungsveranlagung oder Krankheitsanfälligkeit, und so züchterisch genutzt werden. Um diese Zusammenhänge aufzudecken, gibt es eine Reihe von schnellen und kostengünstigen Methoden, aus denen abhängig von der Fragestellung eine geeignete ausgewählt werden kann. Für Kopplungsanalysen, genetische Karten (u. a. Bancroft 1995, Vaiman *et al.* 1995) und in der Populationsgenetik (u. a. Arranz *et al.* 1998, Peter *et al.* 2007) werden auch heute noch Mikrosatellitenstudien eingesetzt. Ihren Höhepunkt hatten sie nach Entwicklung der PCR bis Ende der 1990er Jahre. Anwendungsbereiche für QTL-Studien (quantitative trait locus) liegen z. B. im Bereich der Fleischschafproduktion und den entsprechenden Leistungsmerkmalen (Raadsma *et al.* 2009a, Cavanagh *et al.* 2010) sowie bei Milchezusammensetzung und den Milcheigenschaften (Raadsma *et al.* 2009b) vor. Diese Studien liefern Hinweise auf Genregionen, die an der Ausprägung eines quantitativen Merkmals beteiligt sind (Geldermann 1975). Die neueste Entwicklung im Bereich der Genomanalyse ist die SNP Microarray-Technologie (SNP Chip) (Gunderson *et al.* 2005). Sie macht sich das Kopplungsungleichgewicht (linkage disequilibrium, LD) und somit die Bildung von Haplotypen zunutze (Gabriel *et al.* 2002). Auch in den Tierwissenschaften wird die Technik genutzt. Kommerzielle SNP Chips sind für die Maus (*Affymetrix*® Mouse Diversity Genotyping Array), den Hund (CanineHD, *Illumina, Inc.*), das Schwein (PorcineSNP60, *Illumina, Inc.*), das Rind (BovineHD BeadChip, *Illumina, Inc.*) und das Pferd (EquineSNP50, *Illumina, Inc.*) verfügbar.

Seit Anfang 2009 gibt es zudem auch für das Schaf einen von *Illumina, Inc.* in Zusammenarbeit mit dem International Sheep Genomics Consortium (ISGC, <https://isgcdata.agresearch.co.nz/>) entwickelten SNP Microarray (OvineSNP 50 BeadChip). Er enthält Daten von 54 241 SNPs mit einem durchschnittlichen Abstand von 50,9 kb. Die Daten stammen von 75 *Ovis aries* Rassen sowie einiger weiterer *Ovis*-Spezies (u. a. *Ovis musimon*/Mufflon). Aus Deutschland flossen unter anderem Informationen der Rassen Ostfriesisches Milchschaaf, Merinolandschaaf, Braunes Bergschaaf, Romanov und Texel in die Entwicklung des Chips mit ein (Illumina Data Sheet, http://www.illumina.com/documents/%5Cproducts%5Cdatasheets%5Cdatasheet_ovinesnp50.pdf).

2.2.2.1 Kandidatengenansatz

Genetische Faktoren, welche die Ausprägung eines Merkmals beeinflussen, können auf zwei Arten untersucht werden. Entweder indirekt, indem man ihre Assoziation mit Markern überprüft, oder direkt durch die Untersuchung von Genen, die mit dem Merkmal in Beziehung stehen (Lusis 1988). Die Wahl eines potenziell ursächlichen Gens kann zum einen über seine Position innerhalb eines quantitative trait locus (QTL) erfolgen, es wird dann als positionelles Kandidatengen bezeichnet. Eine andere Möglichkeit ist die Analyse funktioneller Kandidatengene, welche auf Basis der biologischen und physiologischen Funktion ausgewählt werden.

Die so ausgewählten Gene werden systematisch auf Polymorphismen untersucht und diese wiederum mit den Phänotypen assoziiert. Der Kandidatengenansatz ist abhängig vom Wissen über die biologischen Vorgänge, welche zu dem Merkmal führen (Zhu & Zhao 2007).

Die Methode wurde vielfach erfolgreich eingesetzt, zum Beispiel bei der Mikrophthalmie des Texelschafes (Becker *et al.* 2010) oder bei der Untersuchung der Fruchtbarkeit bei kurzschwänzigen Han-Schafen (Chu *et al.* 2010).

2.2.3. Stand der Genomanalyse beim Schaf

Vor der rapiden Entwicklung der Sequenzierung in den letzten Jahren wurde das Genom mit Hilfe von Markern kartiert. Dabei fanden nicht nur Marker der Zieltierart Verwendung sondern auch Informationen von nah verwandten Arten, beim Schaf zum Beispiel Rind und andere Wiederkäuer (Crawford *et al.* 1995, de Gortari *et al.* 1998). Eine Karte, welche 75% des Schafgenoms umfasste, gab es bereits 1995 (Crawford *et al.* 1995), von den verwendeten Markern waren 33 bereits mit bekannten Genen assoziiert. Sechs Jahre später veröffentlichten Maddox *et al.* (2001) eine Karte, die mit 3600 cM etwa 98% des Schafgenoms umfasste.

2007 veröffentlichten Dalrymple *et al.* das erste virtuelle Schafgenom. Dabei wurden Sequenzen von Rind und Mensch in der Reihenfolge des Schafgenoms angeordnet (<http://www.livestockgenomics.csiro.au/sheep/vsheep.php>).

Im Jahr 2009 begannen die Forscher des International Sheep Genomics Consortium (ISGC, <http://www.sheephapmap.org/>) damit, eine vollständige Referenzsequenz des gesamten ovinen Genoms zu erstellen (Archibald *et al.* 2010). Forscher aus der ganzen Welt sind am ISGC beteiligt, u. a. aus Neuseeland (AgResearch), Australien (CSIRO, AGRF, sheepGENOMICS, University of Melbourne uvm.), Schottland (University of Edinburgh, Roslin Institute, Schottish Agricultural College) und Deutschland (Justus-Liebig-Universität Gießen, Tierärztliche Hochschule Hannover). Zu den Erfolgen des Consortiums zählen zum Beispiel die Erstellung eines virtuellen Schafgenoms und, in Zusammenarbeit mit *Illumina, Inc.*, die Entwicklung des ovinen 50k SNP BeadChips (<http://www.sheephapmap.org/goals.php>, Archibald *et al.* 2010).

Seit Februar 2010 gibt es die erste Shotgun-Sequenz des gesamten Schafgenoms (NCBI, GenBank: ACIV000000000.1), die circa 43% der Gesamtsequenzinformationen des ovinen Genoms enthält (<http://www.livestockgenomics.csiro.au/sheep/>, Abruf am 08.09.2011). Im Gegensatz zu dem bis dahin vorhandenen virtuellen Schafgenom, bei welchem noch bovine Informationen verwendet wurden, besteht diese Sequenz nur aus ovinen Daten bzw. Platzhaltern. Im März 2011 wurde die Schafsequenz Version 2.0 von CSIRO veröffentlicht. Sie basiert auf Sequenzinformationen von Texelschafen und deckt 91% des gesamten Schafgenoms ab. Die Version 3.0 war für die zweite Jahreshälfte 2011 angekündigt (<http://www.livestockgenomics.csiro.au/sheep/oar2.0.php>).

Einen Überblick über die Entwicklung der Genomanalyse des Schafes und aktuelle Untersuchungen gibt die Seite <http://rubens.its.unimelb.edu.au/~jillm/jill.htm>.

2.3 Kandidatengene für Moderhinkeempfänglichkeit

Assoziationsstudien zur Moderhinkeempfänglichkeit konzentrierten sich bisher vor allem auf die Immunantwort (Outteridge *et al.* 1989, Escayg 1995, Escayg *et al.* 1997). Basierend auf den Ergebnissen dieser Studien wurde der „Footrot Gene-Marker Test“ an der Lincoln Universität, Neuseeland, entwickelt (siehe Kapitel 2.1.7.5). Obwohl es Hinweise gibt, dass der Aufbau des Klauenhorns eine wichtige Rolle spielt (Erlewein 2002, Thoms 2006), gibt es bisher noch keine Untersuchungen über den Zusammenhang von Moderhinke und Genen, welche die Integrität der Klaue und des Klauenhorns beeinflussen.

2.3.1 Transglutaminase 1 (TGMI)

Transglutaminasen bilden eine Gruppe von Enzymen, die Kalzium-abhängig kovalente Bindungen innerhalb oder zwischen Proteinen katalysieren (Sarkar *et al.* 1957, Peterson *et al.* 1983). Dadurch leisten sie einen wichtigen Beitrag zu Aufbau und Stabilisierung von Zellen und Geweben. Bisher wurden neun Isozyme identifiziert: Transglutaminase 1-7 und Faktor XIII der Gerinnungskaskade sowie eine inaktive Transglutaminase in der Membran von Erythrozyten, das Protein Band 4.2 (Lorand & Graham 2003). Alle spielen bei einer Reihe wichtiger physiologischer Prozesse eine entscheidende Rolle.

Die Transglutaminase 1, bzw. Keratinozyten-Transglutaminase, kommt, zusammen mit Transglutaminase 3 (Kim *et al.* 1990) und 5 (Candi *et al.* 2002), in Epithelien vor (Chung & Folk 1972, Goldsmith *et al.* 1974). Sie wird von Keratinozyten exprimiert und ist überwiegend membrangebunden. Für die Aufrechterhaltung der Homöostase des Körpers durch Retention des Wassers ist die Verknüpfung von Proteinen wie Loricrin und Involucrin durch die Transglutaminase 1 essenziell (Nemes & Steinert 1999). So wird die unlösliche oberste Hornschicht der Haut gebildet, die für

die Widerstandsfähigkeit und Undurchlässigkeit der Haut sorgt. Auch bei der Wundheilung spielt die Transglutaminase 1 eine wichtige Rolle (Inada *et al.* 2000).

Sequenzvarianten im codierenden Gen für dieses Enzym, dem *TGM1*-Gen, sind verantwortlich für die Erkrankung der lamellären Ichthyose (Russell *et al.* 1994, Russell *et al.* 1995). Eine Vielzahl an Mutationen wurde bereits im Zusammenhang mit dieser Erkrankung entdeckt (Herman *et al.* 2009, Rodríguez-Pazos *et al.* 2009).

Ichthyosen bilden eine Gruppe von Erkrankungen, bei denen es zu Verhornungsstörungen der Haut mit Hyperkeratosen, besonders palmar und plantar, und vermehrter Schuppenbildung kommt. Desweiteren treten häufig Nageldystrophien auf (Küster 2005). Die lamelläre Ichthyose wird autosomal-rezessiv vererbt und in die Gruppe der kongenitalen Ichthyosen eingeordnet, sie ist bereits bei der Geburt sichtbar. Die betroffenen Kinder werden meistens mit einer sogenannten Kollodium-Membran geboren. Diese straffe Membran hat Ähnlichkeiten mit verdicktem Cellophan-Papier oder geöltem Pergament und kann, lokal oder über den ganzen Körper verbreitet, mehr oder weniger stark auftreten; sie löst sich in den ersten Lebenstagen oder -wochen (Höger 2007).

Auch in der Veterinärmedizin sind Ichthyosen seit langem bekannt (Baker & Ward 1985), unter anderem bei Maus (Jensen & Esterly 1977), Lama (Belknap & Dunstan 1990), Kudu (Chittick *et al.* 2002), Hund (Alhaidari *et al.* 1994), Katze (Credille *et al.* 1996) sowie beim Rind bzw. Kalb (Selmanowitz 1971). Untersuchungen zum Zusammenhang zwischen der Erkrankung und dem *TGM1*-Gen wurden bisher bei Hund (Credille *et al.* 2009) und Rind (Dardano *et al.* 2007) durchgeführt. Beim Hund wurde analog zum Menschen eine Mutation im *TGM1*-Gen als eine Ursache gefunden, beim Rind konnte diese Verbindung bisher nicht bestätigt werden.

2.3.2 Loricrin (*LOR*)

Loricrin ist ein Protein und, mit einem Anteil von 70-85%, Hauptbestandteil des direkt unter der Plasmamembran liegenden Cornified Envelope in den Keratinozyten der Haut (Buxman *et al.* 1976, Mehrel *et al.* 1990, Steinert & Marekov 1995). Der Cornified Envelope ist eine fast wasserunlösliche Struktur, die vor allem aus Involucrin und Loricrin besteht (Candi *et al.* 2005). Durch Transglutaminase 1, 3 und

5 wird Loricrin kovalent mit Keratin, Filaggrin, Small Prolin Rich Proteins (SPRs) und vor allem mit sich selbst verknüpft (Hohl *et al.* 1991, Candi *et al.* 1995, Candi *et al.* 2005).

Beim Menschen werden Mutationen im *LOR*-Gen bei der Keratosis palmoplantaris mutilans Vohwinkel (Vohwinkel Syndrom) in Verbindung mit einer leichten Ichthyose beobachtet (Maestrini *et al.* 1996, Korge *et al.* 1997). Die Erkrankung, die im Kindesalter erstmals auftritt, geht mit Hyperkeratosen vor allem an Handflächen und Fußsohlen einher. Im weiteren Verlauf der Erkrankung breiten diese sich auf Hand- und Fußrücken, Ellenbogen und Knie aus. Im Laufe der Jahre kommt es zu Schnürfurchen an den Finger- und Zehengelenken. Zusätzlich tritt eine beidseitige Innenohrschwerhörigkeit auf (Küster 2005).

Neben dem Vohwinkel Syndrom mit Ichthyose wurden Mutationen im *LOR*-Gen bei einer Reihe von unterschiedlichen palmo-plantaren Hyperkeratosen, wie z. B. Erythrokeratodermie, gefunden. Sie alle werden unter dem Überbegriff Loricrin-Keratoderma zusammengefasst (Ishida-Yamamoto *et al.* 1998, Ishida-Yamamoto 2003, Schmuth *et al.* 2004, Gedicke *et al.* 2006).

Anscheinend besitzt der Körper jedoch Möglichkeiten, ein defektes Loricrin-Protein zumindest teilweise zu kompensieren, wie Jarnik *et al.* (2002) bei Loricrin Knockout-Mäusen herausgefunden haben.

2.3.3 γ 2-Untereinheit des Laminin-332 (*LAMC2*)

LAMC2 ist das Gen, welches die γ -2 Untereinheit des heterotrimären Laminin-332, ein Glykoprotein der Gruppe der Laminine, kodiert (Kallunki *et al.* 1991).

Bisher sind 16 Lamininisoformen bekannt, die sich jeweils aus einer α -, β - und γ -Proteinkette zusammensetzen, wobei fünf verschiedene α -Ketten, vier β - und drei γ -Ketten beschrieben sind (Krügel & Miosge 2010). Auf Basis dieser Erkenntnisse und der möglichen Kombinationen dieser Untereinheiten wurde 1994 von Burgeson *et al.* und 2005 von Aumailley *et al.* eine Nomenklatur vorgeschlagen, bei der die Isoformen nach ihrer Zusammensetzung benannt werden. So wurde das frühere Laminin-5 (Kalinin, Nicein, Epiligrin) zum Laminin-332, da es aus einer α 3-, β 3- und γ 2-Kette besteht.

Laminine sind Teil der extrazellulären Matrix und, zusammen mit Kollagen IV (Rothbard & Watson 1972), der Hauptbestandteil aller Basalmembranen (Martin & Timpl 1987, Timpl *et al.* 1979). Das Laminin-332 kommt vor allem in der Basalmembran der äußeren Haut vor (Rousselle *et al.* 1991). Eine Basalmembran ist unter jeder Epithelschicht zu finden. Sie hat eine Dicke von 100-2000 nm, abhängig von Lokalisation und Tierart, und besteht aus 3 Schichten: Lamina lucida, Lamina densa (zusammen bilden sie die Basallamina) und Lamina fibroreticularis, die in ihrer Dicke sehr variabel ist (Gratzl & Wedlich 2005, Merker 1994).

Über eine Reihe von Rezeptoren, zum Beispiel aus der Integrin-Familie (Ghohestani *et al.* 2001), binden Laminine einzelne Zellen oder Zellschichten an die Basalmembran. Der Rezeptor für das Laminin-332 ist das Integrin $\alpha 6\beta 4$ (Ghohestani *et al.* 2001), ein Bestandteil von Hemidesmosomen. Laminin-332 bildet mit Laminin-311 (Laminin 6) und Laminin-321 (Laminin 7) einen Komplex. Dieser Laminin 5-6/7-Komplex interagiert mit Kollagen IV in der Basalmembran über Nidogen (Champlaud *et al.* 1996). Zusätzlich kann das Laminin-332 auch alleine und direkt Kollagen VII binden (Rousselle *et al.* 1997). Es gibt Untersuchungen, die vermuten lassen, dass Laminin-332 auch bei der Adhäsion im Rahmen der Wundheilung eine Rolle spielt (Nguyen *et al.* 2000, Ryan *et al.* 1994).

Wie wichtig Laminin-332 für den Zusammenhalt von Dermis und Epidermis ist, lässt sich daran erkennen, dass das teilweise oder vollständige Fehlen dieses Proteins die Epidermolysis bullosa junctionalis (EBJ) hervorruft. Mutationen werden in allen der drei kodierenden Gene seit Mitte der 1990er Jahre entdeckt (*LAMA3*: Kivirikko *et al.* 1995, *LAMB3*: Pulkkinen *et al.* 1995, *LAMC2*: Aberdam *et al.* 1994, Pulkkinen *et al.* 1994). Diese Vielzahl an möglichen Ursachen erklärt auch die Heterogenität des Erkrankungsbildes. Die EBJ wird rezessiv vererbt und ist gekennzeichnet durch die Trennung von Epidermis und Dermis in der Lamina lucida der Basalmembran, was makroskopisch in zum Teil hämorrhagischen Blasen sichtbar wird (Bruckner-Tuderman 2005). Die schwerste Form, die in der Regel innerhalb der ersten zwei Lebensjahre zum Tod führt, ist die Epidermolysis bullosa junctionalis Herlitz (Herlitz 1935). Die mildere nicht-letale Form ist die Epidermolysis bullosa junctionalis Non-Herlitz (Hintner & Wolff 1982, Hashimoto *et al.* 1976). Diese kann sowohl lokal als

auch generalisiert auftreten und ist in ihrem Erscheinungsbild sehr variabel (Bruckner-Tuderman 2005). Epidermiolysen sind bei Maus, Hund, Katze, Schaf, Rind und Pferd bekannt (Jiang & Uitto 2005). Eine nicht-synonyme Mutation in Exon 23 und eine Deletion in Exon 18 des *LAMC2*-Gens sind beim Schwarzköpfigen Fleischschaf ursächlich für das Auftreten der Epidermolysis bullosa junctionalis verantwortlich (Kerkmann 2008, Kerkmann *et al.* 2010, Mömke *et al.* 2011).

2.3.4 Keratinocyte growth factor (KGF)

Der keratinocyte growth factor gehört zur Gruppe der Fibroblasten Wachstumsfaktoren und heißt auch fibroblast growth factor 7 (Rubin *et al.* 1989, Finch *et al.* 1989). Bisher wurden 22 Wachstumsfaktoren in dieser Gruppe gefunden, dazu sind vier korrespondierende Rezeptoren bekannt (Johnson & Williams 1993, Itoh & Ornitz 2011). Sie sind wesentlich für die embryonale Entwicklung und wirken nicht nur auf Fibroblasten, sondern auf eine ganze Reihe von Zellen (Itoh & Ornitz, 2011).

Der Keratinozyten Wachstumsfaktor bindet an den keratinocyte growth factor receptor (*KGFR*), welcher durch alternatives Splicing des fibroblast growth factor receptor 2 (*FGFR2*) entsteht (Miki *et al.* 1992). Er gehört zur Gruppe der parakrin wirkenden Fibroblasten Wachstumsfaktoren. Zusammen mit Heparin oder Heparansulfat als Cofaktor bindet er an den zellständigen Rezeptor *KGFR* (Bottaro *et al.* 1990, Ornitz *et al.* 1992). Er wird kontinuierlich von Keratinozyten exprimiert. Zudem konnte schon früh gezeigt werden, dass seine Konzentration in der Haut während der Wundheilung stark ansteigt (Werner 1998).

Der keratinocyte growth factor ist sehr potent und stimuliert die mitogene Aktivität von Keratinozyten in der Haut, wobei er keine/kaum Wirkung auf Fibroblasten oder Endothelzellen hat (Bottaro *et al.* 1990). Seine Hauptaufgabe hat er während der Reepithelisierung im Rahmen der Wundheilung (Werner 1998, Marchese *et al.* 1995).

KGF wurde bei Ruminanten bereits im Zusammenhang mit der Mammogenese untersucht (Hovey *et al.* 2001) und im Zusammenhang mit der Formierung der Keratinozyten in der Kronrandregion des Rindes (Mills *et al.* 2009a). In einer Studie von Mills *et al.* (2009b) wurde unter anderem die Konzentration und Rolle des keratinocyte growth factors und seines Rezeptors bei Rindern mit und ohne Klauen-

erkrankungen sowie in Abhängigkeit des Lebensalters untersucht. Diese Studie zeigte, dass die Konzentration des Wachstumsfaktors und des Rezeptors abhängig ist vom Gesundheitszustand der Klaue. Die Transkripte des *KGFRs* in einer Klaue mit Sohlengeschwür waren deutlich erhöht, die Konzentration von keratinocyte growth factor jedoch sank. Die Autoren argumentieren, dass diese für sie unerwartete Änderung vermutlich auf eine erhöhte Sensibilisierung der Zellen gegenüber dem Wachstumsfaktor zurückzuführen sei; bereits geringe Mengen von *KGF* reichten so aus, um die Proliferation der Keratinozyten zu steigern. Eine weitere Überlegung basiert darauf, dass die Expression von *KGF* in einer sehr frühen Phase der Wundheilung ansteigt und dann langsam abfällt wohingegen *KGFR* sich genau gegenteilig verhält (Finch *et al.* 1997). Das Ergebnis der Studie von Mills *et al.* (2009b) ließe sich somit erklären, da Sohlengeschwüre beim Rind einen chronischen Prozess darstellen (Dirksen 2006).

3 Material und Methoden

3.1 Probenmaterial

Einen Überblick über das verwendete Probenmaterial liefert Tabelle 3-1.

3.1.1 Probenmaterial für die Sequenzierung

Das Probenmaterial für die Sequenzierung und Charakterisierung der Gene und die Auswahl der SNPs stammt aus der Genbank des Instituts für Tierzucht und Haustiergenetik der Justus-Liebig-Universität Gießen. Es stammt von insgesamt 15 Tieren, davon zwei Merinolandschafe, sechs Merinofleischschafe, zwei Deutsche Schwarzköpfige Fleischschafe, drei Rhönschafe und zwei Leineschafe (Tab. 3-1).

3.1.2 Probenmaterial für die Assoziationsstudien

Für die Assoziationsstudien wurde von 151 bzw. 298 Tieren aus zwei Herden Blutproben genommen. Die Herde aus Betrieb 1 bestand aus 124 Merinolandschafen und 27 Merinofleischschaf-Merinolandschaf-Kreuzungstieren. Auf Betrieb 2 waren zwei reinrassige Rhönschafe und 295 Kreuzungstiere von Merinolandschafen vor allem mit Schwarzköpfigen Fleischschafen aber auch mit Rhönschafen (Tab. 3-1). Beide Herden waren mit Moderhinke infiziert, die Tiere wurden bei der Probennahme phänotypisch der Gruppe Moderhinke positiv oder Moderhinke negativ zugeordnet, eine Unterscheidung in unterschiedliche Schweregrade erfolgte nicht. Diese Zuordnung wurde, im Rahmen weiterer Untersuchung der Proben für ein zweites Projekt, an Stichproben mittels *D. nodosus* PCR-Nachweis verifiziert (La Fontaine *et al* 1993).

Die Gewichte der probierten Tiere wurden auf beiden Betrieben durch den Schäfer und den Probennehmer geschätzt, für die Varianzanalyse wurden drei Gewichtsklassen gebildet: Körpergewicht bis 65 kg, 66 bis 79 kg und 80 kg und schwerer. Die Probennahme erfolgte auf Betrieb 1 an der gesamten Herde auf einmal. Auf Betrieb 2 erfolgten betriebsbedingt drei Probennahmen im Abstand von jeweils einer Woche an der zu dem Zeitpunkt behandelten Teilherde. Die Beobachtungen wurden zu einem Besuch zusammengefasst.

Von der Lehr- und Forschungsstation (LuF) Oberer Hardthof der Justus-Liebig-Universität Gießen standen für eine Assoziationsstudie zusätzlich DNA-Proben von jeweils fünf moderhinkepositiven und moderhinkenegativen Schafen der Rasse Merinolandschaf sowie Rhönschaf zur Verfügung.

Zusätzlich standen weitere 129 Blutproben eines dritten Betriebs, welcher ebenfalls Moderhinke im Bestand hat, zur Verfügung. Die Daten der 101 Merinofleischschafe und der 28 Schwarzköpfigen Fleischschafe gaben Auskunft über erfolgte Klauenbehandlungen, ohne die Ursache näher zu beleuchten (Tab. 3-1).

3.1.3 Probenmaterial für die Allelfrequenzbestimmung

Für die Bestimmung der Allelfrequenzen der gefundenen Sequenzvarianten in den Kandidatengenomen wurden Stichproben von Schafen aus Rassen ausgewählt, die in der Literatur als moderhinkeressistent oder -anfällig beschrieben werden. So wurden zusätzlich zu den bereits genannten Tieren noch Proben genomischer DNA von jeweils 32 Tieren der Rassen Coburger Fuchsschaf, Graue Gehörnte Heidschnucke, Bentheimer Landschaf und Braunes Bergschaf sowie von 20 Rhönschafen, 16 Deutschen Schwarzköpfigen Fleischschafen und acht Merinolandschafen aus der Genbank des Instituts für Tierzucht und Haustiergenetik ausgewählt (Tab. 3-1).

Tab. 3-1: Übersicht über die verwendeten Proben mit Angabe zu Rasse, Anzahl, Herkunft. Zahlen in Klammern geben die Anzahl der für die Genotypisierung tatsächlich verwendeten Proben an.

Verwendung	Rasse	Abk.	n	Herkunft	
Sequenzierung	Merinolandschaf	ML	2	Gen-Bank Institut	
	Merinofleischschaf	MFS	6	Gen-Bank Institut	
	Deutsches Schwarzköpfiges Fleischschaf	SKF	2	Gen-Bank Institut	
	Rhönschaf	RH	3	Gen-Bank Institut	
	Leineschaf	LS	2	Gen-Bank Institut	
	Assoziations- studien und	Merinolandschaf	ML	124 (116)	Betrieb 1
				10	LuF Oberer Hardthof

Verwendung	Rasse	Abk.	n	Herkunft
Allelfrequenzen	Merinofleischschaf-	MFxML	27 (24)	Betrieb 1
	Merinolandschaf- Kreuzung			
	Merinolandschaf- Kreuzung	MLX	295 (289)	Betrieb 2
	Rhönschaf	RH	2	Betrieb 2
			10	LuF Oberer Hardthof
	Deutsches Schwarzköpfiges Fleischschaf	SKF	28	Betrieb 3
	Merinofleischschaf	MFS	101	Betrieb 3
	Allelfrequenzen	Braunes Bergschaf	BBS	32
Bentheimer Landschaf		BENT	32	Gen-Bank Institut
Coburger Fuchschaf		COF	32	Gen-Bank Institut
Graue Gehörnte Heidschnucke		GGH	32	Gen-Bank Institut
Merinolandschaf		ML	8	Gen-Bank Institut
Rhönschaf		RH	20	Gen-Bank Institut
Schwarzköpfiges Fleischschaf		SKF	16	Gen-Bank Institut

3.2 Verbrauchsmaterialien

Biosphere © Filter Tips 100 µl	<i>Sarstedt AG & Co., Nümbrecht</i>
Combitips 0,05 ml	<i>Eppendorf AG, Hamburg</i>
Distritips Micro, Mini, Maxi	<i>Gilson International B.V., Bad Camberg</i>
Filter Tips 10 µl, 1000 µl	<i>nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe</i>
Filter Tips 20 µl, 200 µl	<i>Peqlab, Erlangen</i>
K-EDTA Monovetten 9 ml	<i>Sarstedt AG & Co., Nümbrecht</i>
Kimwipes ®	<i>Kimberly-Clark, Roswell, USA</i>
Latexhandschuhe	<i>G. Kisker GmbH, Steinfurt</i>
Membranfilter ME25 (0,45 µm)	<i>Whatman GmbH, Dassel</i>

Material und Methoden

Nitrilhandschuhe, latexfrei	<i>MAGV Massanalytische Glas- und Laborgeräatevertriebsgesellschaft mbH, Rabenau-Londorf</i>
PCR-Cups Soft Tubes ® mit Deckel Soft Strips ®	<i>Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf</i>
PCR-Cups, 0,2 ml mit flachem Deckel	<i>biostep GmbH, Jahnsdorf</i>
PCR-GefäÙe in Streifen, 0,2 ml mit Kapfenstreifen	<i>VWR International GmbH, Darmstadt</i>
PCR-Platten PP 96well mit Kapfenstreifen	<i>nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe</i>
PCR-Platten 96well „MicroAmp®Optical“	<i>Applied Biosystems, Darmstadt</i>
Photopapier Type V UPP-110HG	<i>Sony, Tokio, Japan; Vertrieb in Deutschland durch MS Laborgeräate Schröder, Wiesloch</i>
ReagiergefäÙe 1,5 ml	<i>Sarstedt AG & Co., Nümbrecht</i>

3.2.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wiesen den Reinheitsgrad p.a. (zur Analyse) auf und wurden bei Bedarf autoklaviert oder sterilfiltriert.

Agarose Standard	<i>Carl Roth GmbH, Karlsruhe</i>
Ammoniumchlorid	<i>Merck KGaA, Darmstadt</i>
Borsäure	<i>AppliChem, Darmstadt</i>
Bromphenolblau	<i>United States Biomedical Corp., Ohio, USA</i>
Dimethylsulfoxid (DMSO)	<i>Carl Roth GmbH, Karlsruhe</i>
EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat	<i>AppliChem, Darmstadt</i>
Essigsäure	<i>Carl Roth GmbH, Karlsruhe</i>
Ethanol, vergällt	<i>Carl Roth GmbH, Karlsruhe</i>
Ethidiumbromid	<i>Serva Feinbiochemica GmbH & Co., Heidelberg</i>
Formamid	<i>Carl Roth GmbH, Karlsruhe</i>
Kaliumchlorid	<i>AppliChem, Darmstadt</i>

Magnesium Chlorid Solution, 25 mM	<i>Promega GmbH, Mannheim</i>
Natriumacetat	<i>Merck KGaA, Darmstadt</i>
Natriumchlorid	<i>AppliChem, Darmstadt</i>
Natriumhydroxid	<i>Merck KGaA, Darmstadt</i>
TBE-Puffer, 10fach	<i>Carl Roth GmbH, Karlsruhe</i>
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	<i>MP Biomedicals, LLC, Eschwege</i>
Wasser für die Molekularbiologie	<i>Carl Roth GmbH, Karlsruhe</i>
Wasser für HPLC	<i>KMF Laborchemie Handels GmbH, Sankt Augustin</i>
Xylencyanol	<i>United States Biomedical Corp., Ohio, USA</i>
5x Taq GoTaq® Flexi Buffer	<i>Promega GmbH, Mannheim</i>
10x Taq Buffer (selbstregulierend, maximale Magnesium-Konzentration: 2 mM Mg ²⁺)	<i>5Prime GmbH, Hamburg</i>

3.2.2 DNA-Größenmarker

FastRuler™ DNA Ladder, High Range	<i>Fermentas GmbH, St. Leon-Rot</i>
FastRuler™ DNA Ladder, Low Range	<i>Fermentas GmbH, St. Leon-Rot</i>
GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus	<i>Fermentas GmbH, St. Leon-Rot</i>
GeneRuler™ DNA Ladder Mix	<i>Fermentas GmbH, St. Leon-Rot</i>
λ DNA/EcoRI + HindIII Marker, 3	<i>Fermentas GmbH, St. Leon-Rot</i>

3.2.3 Enzyme

Proteinase K	<i>Invitex, Berlin</i>
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	<i>Promega GmbH, Mannheim</i>
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	<i>5Prime GmbH, Hamburg</i>

3.2.4 Kommerzielle Kits

MSB® Spin PCRapace (50)	<i>Invitex, Berlin</i>
MSB® HTS PCRapace / C (4)	<i>Invitex, Berlin</i>

Material und Methoden

Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System
Promega GmbH, Mannheim

ABI Prism[®] Big Dye[®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit und POP-7[™] Polymer
Applied Biosystems, Darmstadt

3.2.5 Oligonukleotide

Oligonukleotide, unmarkiert
biomers.net GmbH, Ulm

3.3 Geräte

Analysewaage AC211S
Satorius AG, Göttingen

Autoklav Webeco Modell C
Webeco, Bad Schwartau

Bidestanlage Bi-Dest 2302
Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel

Centrifuge 5804 mit Rotor A-2-DWP
Eppendorf AG, Hamburg

Centrifuge 5810R mit Rotor A-4-62
Eppendorf AG, Hamburg

Centrifuge Mini Spin
Peqlab, Erlangen

Centrifuge/Vortex Combi-spin FVL 2400
Peqlab, Erlangen

Digital Graphic Printer UP-D895
Sony, Tokio, Japan; Vertrieb in Deutschland durch MS Laborgeräte Schröder, Wiesloch

Distriman
Gilson International B.V., Bad Camberg

DNA-Sequenzierautomat 3130 Genetic Analyzer
Applied Biosystems, Darmstadt

Eismaschine Scotsman AF10
Kälte Mack, Maintal

Elektrophoresekammer Modell HRH
International Biotechnologies Inc., New Haven, USA

Gelkämme und -schlitten diverser Größen
Von Keutz Labortechnik GmbH, Reiskirchen

Horizontalelektrophoresekammern mini und midi, ungekühlt
Von Keutz Labortechnik GmbH, Reiskirchen

iCycler 96well Thermocycler	<i>Bio-Rad, München</i>
Magnetrührer MR2002	<i>Heidolph, Kelkheim</i>
Microprocessor pH-Meter pH 537	<i>Wissenschaftlich technische Werkstätten, Weilheim</i>
Mikrowelle	<i>Siemens-Elektrogeräte GmbH, München</i>
Multipette	<i>Eppendorf AG, Hamburg</i>
Netzgerät ConsortE425 für die Elektrophorese	<i>MAGV Massenanalytische Glas- und Laborgerätevertriebsgesellschaft mbH, Rabenau-Londorf</i>
Netzgeräte Power Pac 1000 und 3000 für die Elektrophorese	<i>Bio-Rad, München</i>
Pipetten Pipetman P10, P20, P100, P200, P1000	<i>Gilson International B.V., Bad Camberg</i>
Pipetten Research pro 0,5-10 µl, 50-1200 µl	<i>Eppendorf AG, Hamburg</i>
Pipettier-Roboter CAS-1200™	<i>Corbett Life Science, Sydney, Australia</i>
Schüttelplatte KS10	<i>Edmund Bühler, Tübingen</i>
Thermocycler PE 9600	<i>Perkin Elmer Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt</i>
Transferpette®-8 2,5-25 µl	<i>Brand GmbH und Co KG, Wertheim</i>
Transilluminator Biometra Ti5	<i>Biometra, Göttingen</i>
Vortex Reax 2000	<i>Heidolph, Kelkheim</i>
Waage E1B120	<i>OHAUS, Schweiz</i>
Wasserbad	<i>Köttermann Labortechnik, Uetze- Hänigsen</i>
Zentrifuge Biofuge 13R	<i>Heraeus Instruments GmbH, Hanau</i>

3.4 Computerprogramme

BLAST	National Center for Biotechnology Information (NCBI) <i>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/</i>
Biodoc Analyze	<i>Biometra, Göttingen</i>

ChromasPro Version 1.32	<i>Technelysium Pty Ltd</i> , Tewantin, Australia
Primer3 (v. 0.4.0)	<i>Whitehead Institute for Biomedical Research</i> , Cambridge http://primer3.sourceforge.net
POPGEN Version 1.32	Yeh <i>et al.</i> 1997 http://www.ualberta.ca/~fyeh/popgene_info.html
IBM SPSS Statistics 19	<i>IBM Deutschland GmbH</i> , München
SAS 9.1.3	<i>SAS Institute Inc.</i> , Cary, NC, USA

3.5 Datenbanken

International Sheep Genomics Consortium (ISGC) Sequence Data Repository	https://isgcddata.agresearch.co.nz/
National Center for Biotechnology Information (NCBI)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov

3.6 Genbank-Sequenzen

Tabelle 3-2: Verwendete Genbank-Sequenzen, Art der Sequenz, Ursprungstierart sowie Herkunft der Sequenzinformation.

GenBank Nummer	Art	Spezies	Quelle
NC_007308.3	genomische DNA	<i>Bos taurus</i>	GenBank NCBI
NC_007314.3	genomische DNA	<i>Bos taurus</i>	GenBank NCBI
NC_007301.4	genomische DNA	<i>Bos taurus</i>	GenBank NCBI
NM_001009235	mRNA	<i>Ovis aries</i>	GenBank NCBI
NM_001142358	mRNA	<i>Ovis aries</i>	GenBank NCBI
OAR True Sheep Chromosomes ver.1.0	genomische DNA	<i>Ovis aries</i>	ISGC

3.7 Externe Laboratorien

Eurofins Medigenomix GmbH, Ebersberg

3.8 Methoden

3.8.1 Blutentnahme und Aufbereitung der Blutproben

Jedem Schaf wurden circa 9 ml Blut aus der *Vena jugularis* entnommen und in EDTA Monovetten bis zur Weiterverarbeitung am selben Tag oder maximal zwei Tage später bei Kühlschranktemperatur aufbewahrt.

Jede Blutprobe wurde zur Abtrennung der Leukozyten bei 4 °C und 2500 rpm für 20 min zentrifugiert, danach wurde der gesamte *buffy coat* abgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Als *buffy coat* wird die Schicht zwischen Blutplasma mit dem geringsten spezifischen Gewicht und den Erythrozyten mit dem höchsten spezifischen Gewicht bezeichnet. Die Lagerung des *buffy coat* bis zur weiteren Verarbeitung erfolgte bei -20 °C.

3.8.2 DNA-Extraktion

Die Isolierung der genomischen DNA aus dem *buffy coat* wurde mit der modifizierten Hoch-Salz-Methode von Montgomery und Sise (1990) ohne die Zugabe von EDTA vor der Inkubation mit Proteinase K wie bei Lühken (2007) beschrieben durchgeführt.

3.8.3 Etablierung der Polymerasekettenreaktion zur Amplifikation einzelner Genabschnitte

3.8.3.1 Auswahl der Primer

Die Auswahl der Primer für die PCR (Mullis & Faloona 1987) erfolgte auf Basis publizierter boviner und oviner DNA-Sequenzen mit dem Programm Primer3 (Rozen & Skaletsky 2000), wobei die mittlere Primerlänge zur Erhöhung der Spezifität auf 21 Basenpaare erhöht wurde, die restlichen Parameter in der Standardeinstellungen des Programmes verblieben. Tab. 3-3 zeigt die verwendeten Primer mit ihrer Sequenz.

TGM1: Für die Amplifizierung von *TGM1* wurde die Rindersequenz NC_007308.3 als Grundlage genommen.

LOR: Für die Primer des *LOR*-Gens wurde fast ausschließlich auf die Schafsequenz zurückgegriffen. Vorhandene Lücken wurden, wenn nötig, mit der Rindersequenz NC_007301.4 vervollständigt.

KGF: Die Auswahl der Primer erfolgte ebenfalls ausschließlich auf Basis der Rindersequenz NC_007308.3. Die Exon-Intron-Grenzen wurden mit der mRNA-Sequenz NM_001009235 verglichen.

LAMC2: Primer für die Exons 1, 2, 4-11, 13-15 und 18-23 wurden mit der Rindersequenz NC_007314.3 als Basis gewählt. Für die Exons 3, 12, 16 und 17 wurde die Schafsequenz des ISGC verwendet, Lücken wurden mit der für die anderen Primersequenzen bereits verwendeten bovinen Sequenz ergänzt. Mit der mRNA-Sequenz NM_001142358 des Schafes wurden die Exon-Intron-Grenzen überprüft.

Tab. 3-3: Verwendete Primer für die Gene *TGM1*, *LOR*, *KGF* und *LAMC2*, Zielabschnitt des Gens und Größe des amplifizierten Bereichs.

Gen	Primer - Forward (5'→3')	Primer - Reverse (5'→3')	Genabschnitt	Größe
TGM1	aagcagctctactcactactgg BT TGM1 5'FR (F)	agacacccatgaggaggttgc BT TGM1 In1 (R)	5'FR+Exon 1	933 bp
	ggtgagtgaagaggagtctttgg BT TGM1 In1 (F)	aactcagcagatccacaccagt BT TGM1 Ex3 (R)	Exon 2	776 bp
	ggtgagtgaagaggagtctttgg BT TGM1 In1 (F)	gctggtcactctctacgtcct BT TGM1 In4 (R)	Exon 3 (Exon 2-4)	2271 bp
	tggggacagagctattctcaat BT TGM1 In3 (F)	gctggtcactctctacgtcct BT TGM1 In4 (R)	Exon 4	549 bp
	ttctccattatcccctatcct BT TGM1 In4 (F)	gaggggagatgagtgatcc BT TGM1 In6 (R)	Exon 5+6	658 bp
	cctctgaatcctgagcgttta BT TGM1 In6 (F)	gcctttctgggtgtaacacta BT TGM1 In7 (R)	Exon 7	469 bp
	ctgactctagtaccctgacc BT TGM1 In7 (F)	gtggaacgaaaggatctgactc BT TGM1 In9 (R)	Exon 8+9	639 bp
	agccaccagagaatctggact BT TGM1 In9 (F)	cacagagtagttggtcagcag BT TGM1 In10 (R)	Exon 10	338 bp
	agtttctactgccaggaagc BT TGM1 In10 (F)	ggttgagggtcaagggtgag BT TGM1 In11 (R)	Exon 11	409 bp
	aaggtagcagctcccatc BT TGM1 In11 (F)	agggaaactgaagcccaagag BT TGM1 In13 (R)	Exon 12+13	798 bp

Gen	Primer - Forward (5'→3')	Primer - Reverse (5'→3')	Genabschnitt	Größe
	cggcttcattctaaggagctt BT TGM1 In13 (F)	aagtgcagaccttaccgtcct BT TGM1 In14 (R)	Exon 14	352 bp
	ctgtaggtttagctgtgggtgt BT TGM1 In14 (F2)	gcatctgtgcaaatgagatcag BT TGM1 Ex15 (R2)	Exon 15	523 bp
LOR	gctgggtgcttacacactctc BT LOR 5'FR(F)	gatgcagttgaagagcagagg BT LOR In1(R)	5'FR+Exon 1	759 bp
	aagcaaaagctgggaaagaaag OA LOR In1 (F1)	ggcaatatcatgagagcggta OA LOR 3'FR (R1)	Exon 2	1400 bp
KGF	gcaatgctgaaatcctctatatg BT KGF 5'FR (F)	cggctcaaaagtctgtaactt BT KGF In1 (R)	5'FR+Exon 1	807 bp
	aaggacctgacatcctctgt BT KGF In1 (F)	gcttggtttatcagctccaac BT KGF In2 (R)	Exon 2	934 bp
	gggggtgcaggctgagtaaat BT KGF In2 (F)	tccaaggtgacacagaaaaca BT KGF In3 (R)	Exon 3	415 bp
	tgctatccaacaactgcatta BT KGF In3 (F)	aactactgcttgactcattcca BT KGF 3'FR (R)	Exon 4	937 bp
LAMC2	ccttgtgtgactgttgact BT LAMC2 5'FR (F)	aaagagttcttgcaagtgg BT LAMC2 In1 (R)	5'FR+Exon 1	748 bp
	taaaccgagaactccctccat BT LAMC2 In1 (F)	gactaccttggagttgagttg BT LAMC2 Ex2 (R)	Exon 2	384 bp
	ctccatattggtgatgattgc OA LAMC2 In2 (F)	tccagtgctaaagactccaag OA LAMC2 In3 (R)	Exon 3	468 bp
	ggcctactgaagatgaaga BT LAMC2 In3 (F)	gcagtggtgccaanaagataa BT LAMC2 In4 (R)	Exon 4	400 bp
	gtgagagtggatgtgcaactga BT LAMC2 In4 (F)	actgcctggacactaagtgata BT LAMC2 In6 (R)	Exon 5+6	1311 bp
	ggggagtgtgggtgataat BT LAMC2 In6 (F)	cagtcatgacctgtctcagca BT LAMC2 In7 (R)	Exon 7	471 bp
	cttgtcctacagggatgg BT LAMC2 In7 (F)	cccaatcagagattctacataaa BT LAMC2 In8 (R)	Exon 8	410 bp
	ccaaggcgagagaaagtt BT LAMC2 In8 (F)	gggcatcgatctctcttatc BT LAMC2 In10 (R)	Exon 9+10	1331 bp
	cctggtggtgctgtgttcta BT LAMC2 In10 (F)	gcaggtcagagaagccaaagt BT LAMC2 In11 (R)	Exon 11	597 bp
	gatgggctgtgaagtgtctc OA LAMC2 In11 (F)	gtgacagaaccaccagaaga BT LAMC2 In12 (R1)	Exon 12	468 bp
	gagtggcaaccagtattcca BT LAMC2 In12 (F)	gctgcaaggaaaagaagtcct BT LAMC2 In14 (R)	Exon 13+14	997 bp
	accatgtaaacagggactc BT LAMC2 In14 (F)	tgcaaaggagtctggaggtaa BT LAMC2 In15 (R)	Exon 15	342 bp
	gagggaagtttagggaggat BT LAMC2 In15 (F)	caggttcaacagtctctcaa BT LAMC2 In16+17 (R)	Exon 16+17	1301 bp

Gen	Primer - Forward (5'→3')	Primer - Reverse (5'→3')	Genabschnitt	Größe
	OA LAMC2 In15 (F) tgctgcccacttacagagatt	OA LAMC2 In17 (R) gcctggattgtgttttcaga	Exon 18+19	1126 bp
	BT LAMC2 In19 (R) tcattgaccacaactttccact	BT LAMC2 In17 (F) caccatggaccataacaggac		
	BT LAMC2 In19 (F) ttcattgtttgaggcagagc	BT LAMC2 In20 (R) agaccacagcaaatgaaaage	Exon 20	458 bp
	BT LAMC2 In20 (F) caaggcttgtgctctcaaat	BT LAMC2 In22 (R) ctgagaatgccatcaacact	Exon 21+22	706 bp
	BT LAMC2 In22 (F1)	LAMC2 5'FR (R1)	Exon 23	562 bp

3.8.3.2 Etablierung der PCR

Die PCR-Bedingungen für jedes Primerpaar wurden bei 15 µl Gesamtvolumen mit einem Temperatur- und einem Magnesiumgradienten (1-3 mM) getestet und das Ergebnis mittels Gelelektrophorese überprüft. War die Amplifizierung mit der als Standard verwendeten GoTaq Flexi DNA-Polymerase nicht erfolgreich wurde die *Taq*-Polymerase der Firma 5Prime verwendet. Auf Basis dieser Tests erfolgte dann die Auswahl der optimalen Bedingungen für die PCR der Proben (Tab. 3-4, Tab. 3-5).

Tab. 3-4: Protokoll für den 15 µl Standard-Testansatz mit 1,0 µl DNA.

	Konzentration	Endkonzentration	Endvolumen
Template DNA	10 ng/µl	10 ng/µl	1,0 µl
dNTPs	2 mM	0,2 mM	1,5 µl
Primer	10 µM	0,6 µM je Primer	1,0 µl
<i>Taq</i> -Polymerase	5 U/µl	0,5 U	0,1 µl
Puffer	5fach	1fach	1,5 µl
H ₂ O			ad 15 µl

Tab. 3-5: Standard-Cyclerprogramm zum Testen der Primer abhängig von der Länge des zu erwartenden PCR-Produkts.

		< 750 bp	751-1000 bp	> 1001 bp	
1x	95,0 °C	1:30 min	1:30 min	1:30 min	Denaturierung
35x	{ 95,0 °C 50,0 - 65,0 °C 72,0 °C	0:15 min	0:15 min	0:15 min	Denaturierung
		0:30 min	0:30 min	0:45 min	Annealing
		0:40 min	1:00 min	2:00 min	Elongation
1x	72,0 °C	5:00 min	5:00 min	5:00 min	Elongation

3.8.4 Amplifikation bestimmter Abschnitte der Kandidatengene

Es wurden von jedem Gen sämtliche Exons sowie mindestens 10 Basenpaare der flankierenden Intronbereiche sequenziert. Die Exon-Intron-Grenzen wurden der entsprechenden Rindersequenz entnommen und, falls diese vorhanden war, mit der mRNA-Sequenz des Schafs verglichen. Die genauen Zeit- und Temperaturbedingungen sowie die verwendeten Magnesiumkonzentrationen und *Taq*-Polymerasehersteller für die einzelnen Gene und Genabschnitte finden sich in Tab. 3-6.

Tab. 3-6: Bedingungen für die PCR der einzelnen Genabschnitte (Magnesiumkonzentration = Mg²⁺-Konz., Annealingtemperatur = AT, Annealingzeit = AZ und Elongationszeit = EZ) sowie *Taq*-Polymerasehersteller.

Gen	Genabschnitt	Mg ²⁺ -Konz.	AT	AZ (min:sec)	EZ (min:sec)	<i>Taq</i> -Polymerase
TGM1	5'FR+Exon 1	1 mM	55,0 °C	0:30	0:55	Promega GoTaq
	Exon 2	1 mM	50,5 °C	0:30	0:55	Promega GoTaq
	Exon 3	3 mM	62,3 °C	0:45	2:00	Promega GoTaq
	Exon 4	1 mM	55,5 °C	0:30	0:40	Promega GoTaq
	Exon 5+6	1 mM	51,0 °C	0:30	0:40	Promega GoTaq
	Exon 7	1 mM	59,5 °C	0:30	0:40	Promega GoTaq
	Exon 8+9	1 mM	59,5 °C	0:30	0:40	Promega GoTaq
	Exon 10	1 mM	59,5 °C	0:30	0:30	Promega GoTaq
	Exon 11	1 mM	59,5 °C	0:30	0:40	Promega GoTaq
	Exon 12+13	1 mM	62,5 °C	0:30	1:00	Promega GoTaq
	Exon 14	1 mM	51,0 °C	0:30	0:40	Promega GoTaq
	Exon 15	2 mM	62,5 °C	0:30	0:40	Promega GoTaq
LOR	5'FR+Exon 1	1 mM	53,0 °C	0:30	1:00	Promega GoTaq
	Exon 2	1 mM	50,0 °C	0:45	2:00	Promega GoTaq
KGF	5'FR+Exon 1	1 mM	53,0 °C	0:30	1:00	Promega GoTaq
	Exon 2	3 mM	63,0 °C	0:30	1:00	Promega GoTaq
	Exon 3	3 mM	63,0 °C	0:30	0:40	Promega GoTaq
	Exon 4	3 mM	63,0 °C	0:30	1:00	Promega GoTaq
LAMC2	5'FR+Exon 1	1 mM	62,0 °C	0:30	0:40	Promega GoTaq
	Exon 2	3 mM	61,0 °C	0:30	0:40	Promega GoTaq
	Exon 3	2 mM	64,0 °C	0:30	0:40	Promega GoTaq
	Exon 4	2 mM	53,0 °C	0:30	0:40	Promega GoTaq
	Exon 5+6	1 mM	62,0 °C	0:45	2:00	Promega GoTaq
	Exon 7	2 mM	53,0 °C	0:30	0:40	Promega GoTaq
	Exon 8	2 mM	53,0 °C	0:30	0:40	Promega GoTaq
	Exon 9+10	2 mM	59,0 °C	0:45	2:00	Promega GoTaq

Gen	Genabschnitt	Mg ²⁺ -Konz.	AT	AZ (min:sec)	EZ (min:sec)	Taq-Polymerase
	Exon 11	2 mM	56,0 °C	0:30	0:40	Promega GoTaq
	Exon 12	1 mM	56,0 °C	0:30	0:40	Promega GoTaq
	Exon 13+14	1 mM	55,5 °C	0:45	2:00	Promega GoTaq
	Exon 15	1 mM	53,0 °C	0:30	0:40	Promega GoTaq
	Exon 16+17	2 mM	62,0 °C	0:45	2:00	Promega GoTaq
	Exon 18+19	3 mM	64,0 °C	0:45	2:00	Promega GoTaq
	Exon 20	≤ 2 mM	62,0 °C	0:30	0:40	5 Prime Taq
	Exon 21+22	1 mM	62,3 °C	0:30	0:40	Promega GoTaq
	Exon 23	3 mM	59,5 °C	0:30	0:40	Promega GoTaq

3.8.5 Aufreinigung der PCR-Produkte

Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte mit dem MSB[®] Spin PCRapace (50) Kit (*Invitex*) oder mit dem Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (*Promega GmbH*) jeweils gemäß der Herstellerangaben. Bei dem Promega Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System wurden die Zentrifugationszeiten modifiziert, 2 min anstelle von 1 min jeweils beim ersten und letzten Zentrifugationsschritt und der Entfernung der Ethanol-Rückstände sowie je 5 min bei den beiden Waschschrritten. Aufgrund der besseren Handhabung bei große Probenmengen wurden ab 12 Proben diese mit dem MSB[®] HTS PCRapace/C (4) Kit (*Invitex*) gemäß der Herstellerangaben gereinigt.

3.8.6 Agarosegelelektrophorese

Sowohl zur qualitativen als auch zur quantitativen Analyse wurden die durch die PCR amplifizierten DNA-Fragmente mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt (Mülhardt 2009).

3.8.6.1 Überprüfen der PCR

Die Agarosekonzentration der Gele betrug, abhängig von der Größe der Fragmente, 1,5 - 2,0%. Die Auftrennung erfolgte mit 0,5x TBE als Laufpuffer in verschiedenen Modellen von Horizontalelektrophoresekammern. Die Längenstandards richteten sich nach der Größe des gesuchten Fragments, verwendet wurden die kommerziell erhältlichen Marker GeneRuler[™] 100bp DNA Ladder Plus, FastRuler[™] DNA Ladder Low Range und High Range, GeneRuler[™] DNA Ladder Mix und λ DNA/EcoRi +

HindIII Marker, 3. 5 µl der Probe wurden mit 1,6 µl Ladepuffer (0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol FF, 30% Glycerol, 69,5% Wasser) gemischt um die Proben zu beschweren und so in den Aussparungen des Elektrophoresegels zu halten sowie um den Verlauf der Elektrophorese optisch zu kontrollieren. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 8-15 V/cm für 50 bis 120 min. Die Darstellung der DNA-Fragmente erfolgte durch Anfärben in Ethidiumbromid für 20 min (Kemp *et al.* 1989). Zur Dokumentation wurden die angefärbten Gele unter UV-Licht fotografiert.

3.8.6.2 Konzentrationsschätzung nach Aufreinigung der PCR-Produkte

Zur Schätzung der vorhandenen Konzentration der PCR-Produkte wurden mittels Gelelektrophorese deren Bandendicke und -stärke in 5 µl Probe mit 5 µl Fast Ruler™ Low Range verglichen. Die Banden des Größenmarkers entsprechen dabei jeweils einer Konzentration von 20 ng DNA. Auf Basis der vorhandenen Konzentration wurde dann die entsprechende Menge in µl für die Sequenzierung bestimmt.

3.8.7 Sequenzierung

Die Sequenzierung der PCR-Produkte erfolgte in der Regel mit den Primern, die bereits für die PCR verwendet wurden. Ausgenommen davon ist nur Exon 3 des *TGM1*-Gens, welches mit einem speziellen extra ausgewählten Primer sequenziert wurde. Proben bis 700 bp wurden zuerst mit dem Forward-Primer untersucht. Waren die Ergebnisse nicht auswertbar oder fanden sich Polymorphismen wurde auch mit dem Reverse-Primer sequenziert. Eine Übersicht über die in erster Linie verwendeten Primer zur Sequenzierung bietet Tab. 3-7.

Tab. 3-7: Für die Sequenzierung der einzelnen Genabschnitte hauptsächlich verwendeter Primer. Für Exon 3 des *TGM1*-Gens wurde ein spezieller Sequenzierprimer gewählt, die übrigen Abschnitte aller Gene wurden mit den Primern der PCR sequenziert.

Gen	Genabschnitt	Sequenzierprimer (5'→3')	Primername
TGM1	5'FR+Exon 1	agacacccatgaggagtgtct	BT TGM1 In1 (R)
	Exon 2	ggtgagtgaaggagtctttgg	BT TGM1 In1 (F)
	Exon 3	ctgtgaacgcagctggagat	BT TGM1 Ex2 (F)
	Exon 4	tggggacagagctatttcaat	BT TGM1 In3 (F)
	Exon 5+6	ttctccattatcccctatct	BT TGM1 In4 (F)

Gen	Genabschnitt	Sequenzierprimer (5'→3')	Primernamen
	Exon 7	cctctgaatcctgagcgttta	BT TGM1 In6 (F)
	Exon 8	ctgactctagtgacccctgacc	BT TGM1 In7 (F)
	Exon 9	gtggaacgaaagatctgactc	BT TGM1 In9 (R)
	Exon 10	agccaccagagaatctggact	BT TGM1 In9 (F)
	Exon 11	agtttcactctgccaggaagc	BT TGM1 In10 (F)
	Exon 12	aaggtagcagctcccatc	BT TGM1 In11 (F)
	Exon 13	agggaactgaagccaagag	BT TGM1 In13 (R)
	Exon 14	aagtgacagacctaccgtcct	BT TGM1 In14 (R)
	Exon 15	ctgtaggttaggtcgtgggtgt	BT TGM1 In14 (F2)
LOR	5'FR+Exon 1	gctgggtgcttacacactctc	BT LOR 5'FR(F)
	Exon 2	aagcaaagctgggaagaaag ggcaatatcatgagagcggta	OA LOR In1 (F1) OA LOR 3'FR (R1)
KGF	5'FR+Exon 1	cggctcaaaaagtctgtaactt	BT KGF In1 (R)
	Exon 2	gcttggtttatcagctccaac	BT KGF In2 (R)
	Exon 3	gggggtgcagctgagtaaat	BT KGF In2 (F)
	Exon 4	tgctatccaacaaactgcatta	BT KGF In3 (F)
LAMC2	5'FR+Exon 1	aaagaggttctgcaaagtgg	BT LAMC2 In1 (R)
	Exon 2	taaaccgagaactccctcat	BT LAMC2 In1 (F)
	Exon 3	ctcccatatggtgatgattgc	OA LAMC2 In2 (F)
	Exon 4	ggcctcactgaagatgaaaga	BT LAMC2 In3 (F)
	Exon 5	gtgagagtgggtatgtgcaactga	BT LAMC2 In4 (F)
	Exon 6	actgccctggacactaagtgata	BT LAMC2 In6 (R)
	Exon 7	ggggagtgatgggtgaataat	BT LAMC2 In6 (F)
	Exon 8	cttgtgcctacagggatatgg	BT LAMC2 In7 (F)
	Exon 9	caaagggcagagagaaagtt	BT LAMC2 In8 (F)
	Exon 10	gggcatcgcctctcttctatc	BT LAMC2 In10 (R)
	Exon 11	cctgggtggtccttggttcta	BT LAMC2 In10 (F)
	Exon 12	gatgggctgttgaaagtgtctc	OA LAMC2 In11 (F)
	Exon 13	gagtggcaaccagtatttcca	BT LAMC2 In12 (F)
	Exon 14	gctgcaaggaaaagaagtcct	BT LAMC2 In14 (R)
	Exon 15	accatggtaaaccagggactc	BT LAMC2 In14 (F)
	Exon 16	gagggaagttaggggaggat	OA LAMC2 In15 (F)
	Exon 17	caggtttcaacagtctcccaa	OA LAMC2 In17 (R)
	Exon 18	tgctgccacttacagagatt	BT LAMC2 In19 (R)
	Exon 19	gcctggattgtgtttcaga	BT LAMC2 In17 (F)
	Exon 20	tcatgaccacaactttccactc	BT LAMC2 In19 (F)
	Exon 21+22	ttcattgtttgaggcagagc	BT LAMC2 In20 (F)
	Exon 23	caaggcttgctctcaaaat	BT LAMC2 In22 (F1)

3.8.7.1 Sequenzierreaktion

Für die Sequenzierreaktionen wurde das ABI PRISM® BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit verwendet. Der Ansatz mit einem Volumen von 10 µl setzte sich wie folgt zusammen:

Ready Reaction Mix:	2,0 µl
5x Sequencing Buffer:	1,0 µl
Primer (10 pmol/µl):	0,5 µl
aufgereinigtes PCR-Produkt:	je nach Konzentration 0,5-4,0 µl
HPLC-Wasser:	ad 10,0 µl

Das Protokoll für die Sequenzierreaktion lautete wie folgt:

1x	96,0 °C	1:00 min
25x	{	96,0 °C 0:10 min
		X °C 0:05 min
		60,0 °C 2:00 – 3:00 min

Die Annealingtemperatur richtete sich dabei nach der Temperatur bei der PCR zur Amplifizierung. Für Fragmente mit einer Länge von über 1000 bp wurde die Elongationszeit auf 3 min erhöht.

Direkt nach Beenden der Sequenzierreaktion schloss sich die Fällung mit 1/10 des Volumens an Na-Acetat (3 mol/l) plus dem 2,5 fachen Volumen an unvergälltem, absoluten Ethanol an, welches als Mix angesetzt zu den Proben dazugegeben wurde. Diese Mischung wurde anschließend für 15 min bei mindestens 13000 rpm zentrifugiert, der Überstand mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und in zwei Waschschritten mit 150 µl frisch angesetztem Ethanol 70% gereinigt. Die Proben wurden nach dem Waschen jeweils 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand nach dem Zentrifugieren jedes Mal entfernt. Getrocknet wurde das Pellet bei 55 °C für durchschnittlich 20 min. Die so vorbereiteten Proben wurden entweder im Anschluss direkt sequenziert oder bis zu einer späteren Sequenzierung bei -20 °C tiefgefroren gelagert.

3.8.7.2 Sequenzierung mit dem ABI GeneticAnalyzer 3130

Für die Sequenzierungsanalyse wurden die Proben in 96well Platten überführt, jeder Probe 10 µl HighDye-Formamid zugegeben und diese mit einem Septum verschlossen. Nach Inkubation für einige min bei Raumtemperatur und Dunkelheit folgte die Untersuchung mit dem Fluoreszenz-basierten Kapillarsequenzierer ABI GeneticAnalyzer 3130. Dabei wurden die Produkte aus der Sequenzierreaktion elektrophoretisch in einer mit POP-7™ Polymer gefüllten Glasfaserkapillare aufgetrennt. Anschließend durchliefen sie ein Detektionsfenster, durch welches die in der Sequenzierreaktion fluoreszenzmarkierten Fragmente mit einem Argonlaser angeregt wurden. Die Wellenlänge der emittierte Fluoreszenz wurde mit einem CCD-Sensor gemessen. Folgende Einstellungen wurden am Cycler vorgenommen:

Arraylänge:	36 cm
Lauftemperatur:	60°C
Laufspannung:	15 kV
Laufzeit:	46-60 min, je nach Fragmentgröße

Die Auswertung erfolgte mit dem Computerprogramm ChromasPro Version 1.32 (*Technelysium Pty Ltd*).

3.8.8 Untersuchung der SNPs

Die Genotypisierung der Proben wurde von der Firma *Eurofins Medigenomix GmbH*, Ebersberg, durchgeführt. Die Methode beruht auf einer Multiplex-PCR, Primer-Extension und Massenanalyse durch MADLI-TOF MS mit dem Gerät iPLEX® Gold von Sequenom®. Die Konzentration der Proben betrug 50 ng pro 10 µl. Die Auswahl der SNPs erfolgte auf Basis der theoretischen Bedeutung der SNPs (v. a. Aminosäurenaustausch). Zudem wurde versucht, die SNPs regelmäßig und gleichmäßig über das ganze Gen zu verteilen. Einschränkungen ergaben sich durch die Vorgaben von *Eurofins Medigenomix GmbH*.

3.8.8.1 Genotypisierung

Fünf, zwei und elf SNPs aus den teilweise sequenzierten Genen *TGM1*, *KGF* und *LAMC2* wurde zur Genotypisierung ausgewählt (Tab. 3-8). Für die Untersuchung des *LOR*-Gens wurde der SNP s56889 (Position: OAR1: 109484830) des ovinen 50k

SNP BeadChips (Illumina, Inc.) ausgewählt. Der SNP befindet sich an Position 109843920 des ovinen Chromosoms 1 und somit 9341 bp vor dem Gen.

Tab. 3-8: Übersicht über die genotypisierten SNPs in den Genen *TGM1*, *LOR*, *KGF* und *LAMC2*.

Gen	Exon	SNP
TGM1	5' Region	TGM1_1
	Exon 1	TGM1_3
	Intron 3	TGM1_5
	Exon 12	TGM1_9
	Exon 15	TGM1_12
LOR		LOR_chip
KGF	Intron 3	KGF_1
	Exon 4	KGF_2
LAMC2	5' Region	LAMC2_1
	Intron 3	LAMC2_42
	Intron 5	LAMC2_4
	Intron 9	LAMC2_11
	Exon 11	LAMC2_14
	Intron 11	LAMC2_15
	Intron 12	LAMC2_18
	Intron 13	LAMC2_23
	Intron 16	LAMC2_48
	Exon 17	LAMC2_51
	Exon 20	LAMC2_30

3.8.9 Statistische Methoden

Zur Untersuchung der Beziehung zwischen den gefundenen Sequenzvarianten und dem Merkmal Moderhinke wurden zwei Methoden genutzt. Zum einen wurde mit χ^2 - und Fisher's Exact Test die Verteilung der Allelfrequenzen in den beiden Gruppen „Moderhinke positiv“ und „Moderhinke negativ“ analysiert. Zum anderen wurden die Assoziationen mit Hilfe einer Varianzanalyse überprüft.

Zusätzlich zur Bestimmung der Allel- und Genotypfrequenzen der Schafrassen auf den untersuchten Betrieben wurden verschiedenen Rassen, welche als moderhinke-unempfindlich gelten, ausgewählt. Von einer Stichprobe von jeweils 32 Tieren dieser Rassen wurden die Allelfrequenzen bestimmt und deren Übereinstimmung zur geringeren Moderhinkeanfälligkeit geprüft.

3.8.9.1 Vergleich der Genotypfrequenzen

Die Genotypfrequenzen zwischen den moderhinkepositiven und -negativen Schafen wurden mit dem χ^2 -Test verglichen (IBM SPSS Statistics 19). Zur Absicherung wurde zusätzlich der Fisher's Exact Test verwendet (SAS Version 9.1.3). Bei der Berechnung mussten einige Punkte berücksichtigt werden.

- Rassen: Die Rassen innerhalb der Betriebe waren ungleich verteilt – Betrieb 1 bestand fast nur aus Merinolandschafen (ML) und wenigen Merinolandschaf-Merinofleischschaf Kreuzungstieren (MLxMF), in Betrieb 2 waren vor allem Kreuzungstiere mit Merinolandschafanteilen (MFX), die Daten von Betrieb 3 bezogen sich auf Schwarzköpfige Fleischschafe und Merinofleischschafe.
- Datenmenge und -art: In Betrieb 1 fanden betriebsbedingt zwei Besuche im Abstand von mehr als einem Monat statt und es gab zusätzlich Aufzeichnungen über den Moderhinkestatus einzelner Tiere aus dem Vorjahr. Dagegen wurde Betrieb 2 nur einmal besucht. Die Daten des Betriebs 3 betrafen Klauenerkrankungen und -behandlungen allgemein, ohne eine spezielle Unterscheidung zu Moderhinke, die in dem Bestand auch auftritt.

Um diesen Problemen Rechnung zu tragen wurden alle Daten sowohl für die Gesamtheit der Tiere als auch für jeden Betrieb gesondert untersucht, für Betrieb 1 wurde des weiteren die Berechnungen einmal für die Momentaufnahme zum

Zeitpunkt der Probennahme durchgeführt wie auch einmal unter Einbeziehen aller vorhandenen Daten wobei Tiere, die mindestens einmal an Moderhinke erkrankt waren (auch im Vorjahr) als generell „positiv“ angesehen wurden.

3.8.9.2 Varianzanalyse

Die Schätzung des Einflusses einzelner Effekte auf das binomial verteilte Merkmal „Moderhinkestatus“ (positiv oder negativ) mit den Daten aus Betrieb 1 und 2 wurde mit dem Programm SAS Version 9.1.3 und folgendem Modell vorgenommen:

$$Y_{ijkl} = \mu + \text{SNP}_i + \text{Rasse}_j + \text{Gewicht}_k + e_{ijkl}$$

Y_{ijkl}	= beobachteter Wert des Einzeltieres (positiv = 1; negativ = 0)
μ	= Modellkonstante
SNP_i	= fixer Effekt des Genotyps des SNPs (homozygot Variante aa, heterozygot ab, homozygot Variante bb)
Rasse_j	= fixer Effekt der Rasse (ML, MLX und MLxMF)
Gewicht_k	= fixer Effekt des Gewichts (≤ 65 kg, $66 - 79$ kg, ≥ 80 kg)
e_{ijkl}	= zufälliger Resteffekt

Die bei der Probennahme geschätzten Gewichte wurden in insgesamt drei Klassen zusammengefasst (65 kg und weniger, 66 bis 79 kg und 80 kg und mehr). Aufgrund der Datenstruktur (siehe auch 3.8.9.1) konnten der Betriebseffekt und der Rasseneffekt nicht simultan im Modell berücksichtigt werden, sodass in den Rasseneffekt auch Betriebseffekte einfließen. Bei der Interpretation muss das beachtet werden.

3.8.10 Allelfrequenzbestimmung

Die Berechnung der Allelfrequenzen der untersuchten SNPs erfolgte mit dem Programm POPGEN Version 1.32 (Yeh et al. 1997).

4 Ergebnisse

4.1 Sequenzierung

Die kodierenden Sequenzen sowie die flankierenden Intronbereiche der Kandidatengene *TGM1*, *LOR*, *KGF* und *LAMC2* wurden erfolgreich sequenziert. Die SNPs wurden in der Reihenfolge ihrer Identifizierung durchnummeriert.

4.1.1 *TGM1*

Durch den Vergleich der amplifizierten Genabschnitte mit den entsprechenden Abschnitten des Rinderchromosoms kann geschlossen werden, dass das *TGM1*-Gen auf Chromosom 7 des Schafs (Sheep Genome v2.0, ISGC) ebenso aus 15 Exons besteht wie das des Rindes. Die kodierende Sequenz (Abb. 4-1) hat eine Länge von 2502 bp und stimmt zu 96% mit der Rindersequenz NC_007308.3 überein. Im *TGM1*-Gen konnten zwölf SNPs identifiziert werden, vier davon im Exon. Eine Auflistung aller gefundenen SNPs ist in Tab. 4-1 zu sehen.

```

1 ggctggctggtggagccagctcgagggccaggtgctgatgtcaccagctcttaacaactt
61 gggatccagggacctccctgggctggacaggtcctagagccagcccattggacagtttcag
121 agacacaggcaggcagcctgggcttgggaacagcaagtctgctggatagaggtgcccct
181 ggccattgcccctctgagcttctccaYtgagaatgtgtctctgatgaccccagtttgga
241 ggcagcatccccagacagtgatcgccccagctcttccaacttgagccctcacagata
301 ccaaccgcgcccctctccctactcgtcggctccttagttcctcgaaaggggaaaagagggtg
361 tggcccagagtcattccccggccccagacgctggacctcctcccccaagtgggggtgac
421 gaagcaaccttctcttctcccagaagctcggccccgccctcccccttaaaaacct
481 taccggcccgccecaagcttccattcgagcggcggaGTCTGTCCCGTCCCATCGGTCCC
541 GACCTGTTCCACCTCCGCYGCGGGACTCAGAGATGTCGTCGCCAACACCTTCRTCAggtg
601 aggggctccgacggggcactcgcgatgctgaaccccagcgatgctgtctgggggcccgaag
661 gtcgggtcccaacaaggtggagtgtggccagcca
[gap]
1 ctggctgggacggaatcagctctctggatggaggggttctgagtgagctgactggagcat
61 cctgtaggggtaaaaggaggtctgagtgagtgatcagagcctccttgccctctccacataG
121 GGGGTCCTCGCTCGGATGTCGGCCGCTGGGGTGGAACCCCTGGCGGCCCCACCACCC
181 CTCTCCAGAGCCGGAACCCAGAGCCAGACAGACGTTCTCGCCCGCGGGGCCGATCCTTCT
241 GGGCTCGCTGCTGCGGCTGTGCTCTTGCAGGAATGCAGAAGACGATGACTGGGGGCTG
301 AGCGCCGCGGAGACCGGGGAGGTCGAGGGTCTGGCTCCAGGAGTCGAAGACCCGACTCCC
361 GGGGCTCAGACTCCCGCSGCTCAGACTCCCGCCGCTCAGACTCCCGCCGCGCTGGCTCCC
421 GGGGCAGCGCTGTGAACGCAGCTGGAGATGGCACCATCCGGGgtgagggccacctggcca
481 tgctatctgagagccaaaaagccttaattgggcctgagggctcattctgacatctctgggg
541 gcctgggaggtggtggtgggggacctagacacccctgtggggtctactgagccagagctg
601 tggccttgacagcgaatgctggtggtcactggtggtgatctgct
[gap]
1 attctgacctctctgggggctgggaggtggtggtgggggctagacacctgtggggc
61 tctactgagccagagctgtggccttgaGACGGAATGCTGGTGTCACTGGCATGGATCT
121 GCTGAGTTCACGCTCAGACCAGAACCGCCGAGAGACCACACAGACGAGTTCGAGTACGA

```

181 TGAGCTGATTCTCCGCCGTGGGCAGCCTTTCCATATGGTCCTCTCCTGTCTCGTCCCTA
241 TGAGTCCTCCGATCATGTACCCCTGGAGCTGTGCATCGgtcagtgRagcctgcagtgggg
301 gatggggatgggtggtgaagaccaccaggtagggtggagtaggaatagggagctggtta
361 gcagggtgcagccctggatttagggtcacagggatgtcttaggctcctcccttgccc
421 cactcctcgcccctgccagctaaggcaggtgtaatcatgtaagtatgtccccggaggga
481 gggctctggcttccctgttttcatttcctaaRctcacacctccaagcctccaggagcat
541 ttgtctcaagatacttttctttggatccttactaccgcatcctctccagtggttctgtct
601 ttgtgatatctttctttctgggtctgcctcctccccaggatgtgactcactctctgt
661 ccaactctgtctctctgtcccatggccagg
[gap]
1 ctgcagcagctaatactcagtggtttcccccatggcagGAAACAATCCCAGGTGGGCAAGGGC
61 ACCCAGTGCATATCCCCTGGGCAAGGGGGCAGTGGAGGCTGGAAGGCCAGGTGACC
121 AAGTCCAGCGGGCAGAATCTGAACTCGCGGTCCACACCTCCCCCAA^YGCCATCATCGGC
181 AAGTTTCAGTTCACCTGTCCGCACACGCTGCAAAGCTGGAGAGTTCACACTGCCCTTTGAC
241 CCCCGCAACGAGATCTACATCCTCTTCAATCCTGGTGCCCGgtgagctgctggagtaa
301 aatgtggacaggaggggagggcatgtagggtttcctttgctagatctgggtacgcgcctg
361 ggtgcctagccctaggagaagccagcttcccagtgctccaggtgaggggacctcaatgcag
421 gacgtagagaagtgaccagca
[gap]
1 ggggcagtggggaccaggagagggctgaaggggaccaagcaaatgtgttttggggaca
61 caGAGGACATCGTGTATGTGGACCATGAGGACTGGCGGCAGGAGTATGTGCTTAATGAGT
121 CTGGGCGAATTTACTATGGGACAGAAGCGCAGATTGGCGGACGGACCTGGAACACTCGGC
181 AGtgtagggttcgctggggcctcgtgcactcgggggactagaggcaggtgagggcgggtg
241 gcggcgcaggtgctagcctaagggtcacctctgccctggctcccctagTTTGACCACGG
301 GGTGCTGGACGCCTGCCTGTACATCCTGGACCGGCGGGGCATGCCCTATGGAGGCCGAG
361 GGACCCGTCAGTGTCTCCCGGTGCATCTTGCCATGgtgagctccttgagcctctgag
421 acctactgagtgctgctgctctcctcccccatcctaccatttctgattcttccca
481 ggacccagccctgtccgtgcc
[gap]
1 agggcggggctagggcggggggcMcaaagcaggtcctgagcctcttccccaaactctgccc
61 caccctcctgtcctggacagGTGAACTCCTGGATGACAATGGGGTCTGATTGGGAA
121 CTGGYCTGGAGATTATTCCCGCGGTACCAACCATCAGCATGGGTGGGCAGCGTGGAGAT
181 CCTTCTCAGTACCTACGCACCGGCAACTCTGTCCCCCTCGGCCAGTGTGGGTCTTCGC
241 CGGTGTGACCACCACaggtagtgagggatgggacgcgaaccgctgggctctacacgga
301 ggatggaaggaagctaggctccaccttcgcgagcccagcccagttgggctacagtgacg
361 ggacaggcgggggtggctggcaggctggccttaattatcattaattagtgtaacaaccc
421 agaaaggca
[gap]
1 gcaccattgcccttgctcccttgctattcctgacctcatgccctcacctgccctttacc
61 ctgccctggccaggccctgaaccccaacctggctcccccccacaGTGCTGCGCTGC
121 CTGGGCCTGGCCACCCGTACTGTACCAACTTCAACTCCGCGCACGACACAGACACTTCC
181 CTCACCATGGACATCTACTTTGATGAGAACATGAAGCCCCTGGAGCACCTGAACCATGAT
241 TCTGTCTGGTgaggtcgggctgggctgggctgcctgtccctgtggtgacccgagatgc
301 gagtccctggatgcccagagctggggatgctggggagggccccagggcagcccactgaa
361 ccttccatctgcttccctcaggaACTTCCAGTGTGGAATGACTGTTGGATGAAGAGGC
421 CAGATCTKCCCTCAGGCTTCAGTGGGTGGCAGGTTGTGGATGCCACACCCAGGAGACCA
481 GCAGTGgtgagcagggccctcctggctcccagatccctttgggggcccctcctgtgt
541 cccagctaggggaaacaaactccagtgctcctggacggggccttggagtcagatcctttcg
601 tt
[gap]
1 actggggtgggcttgagggttgggcccaggatctagggtcccactcagcctcctggat
61 ctctcaccctgtggtgccctcactcccgtagGCATCTTCTGTGTGGGCCCTGCTCTGT
121 GCAGTCCATCAAGAATGGCTTGGTCTACATGAAGTACGACACACCCCTTCATTTTCGCAGA
181 Ggtgagggtgtgcgccctgtgccctcgtgggcatcctggggagaccagggcactggcgt

Ergebnisse

```

241 tggtcctaggttctccaggcatgccccactgctgaccaactacctctgtgaaaatgaag
301 gtgtgtcgtacttcatgtaga
    [gap]
    1 gccttccctgcagttcctaggatccgaggaaggcagctggggggtcaggcccacctcag
    61 accctctgggtcattcattccggattcacaccctcaaaactgcctcctgacagTAAA
121 CAGTGACAAAGTTTACTGGCAGCGACAGGATGACGGCAGCTTCAAGATCGTGTATGTGGA
181 GGAGAAAGCCATCGGCTCACTCATCATTACAAAGGCTATCGGCTCCAACATGCGAGAAGA
241 CGTCACGCACACCTATAAGCACCCAGAAGGtaccagctccccatccccggccagctYtggc
301 cacaaccaaggggtgccttccaagcgccccgccaccagcagcagctgtaagctcacctt
361 gacctcaacca
    [gap]
    1 tctggccacaaccaaggggtgccttccaagcgccccgccaccagcagcagctgtaagctc
    61 acccttgaccctcaacccccAGGCTCAGAAGCAGAGCGGAAGGCAGTGGAGACCGCAGCC
121 GCCACGGCAGCAAACCCACGTGTACGCCACGGGGACTCGACGGAGGATGTGGCCATG
181 CAGGTGGAGGCGCAGGAYGCAGTGTGGGGCAGGACCTGACGGTCTGCGTGGTGTGACC
241 AACCGCGGCAGCAGCCCCGCACCGTGAAGCTGCACCTCTACCTCTCTGTACCTTCTAC
301 ACCGGCTCACGGGATCCGTCTTCAAGGAGAGCAAGAAGGAGTGGTGGTGGCGCGGGG
361 GCCTgtaagtgccttccccagcctgtagcaccctctccatgtctgggtagcccagg
421 ctgggcacatggagacccRgggaggccgagtctggggaagcaggcctcggtgacgccagg
481 cctcttcctgcaGCGGAGCGCGTGACCATGCCCTGGCCTACAAGGAATACGGGCCCA
541 GCTCGTAGACCAGGGAGCCATGCTGCTCAACGTCTCAGGCCACGTGAAGGAGAACGGGCA
601 GGTGCTGGCCAAGCAGCACACCTTCCGTCTGCGTACCCAGACCTCAGTCTCACGgtaga
661 gcagcgggctgggctgggggagcagattggagggcgaggcacggggcacgaggccagaagca
721 gtggtgggaggaggtcaggga
    [gap]
    1 tcggtcttcattctaaggagctttccctccctctctggtgggagtgccagtcccataaa
    61 ttggccccgaggctctgataatgggggtctctttctctctcagTACTGGGAGCAGCTGT
121 GGTGCGCCAGGAGTGCGAAGTACAGATTGTCCTTCAAGAACCCGCTGCCTGTACCCCTCAC
181 CAACGTCTGCTTCCGGCTCGAGGGCTCCGGGTTCAGAGGCCCAAGATCCTCAATGTCCG
241 gtgagtgcaRccccctctctctgccccggccactgcccttgccagcctcctgggtgcatgg
301 gtccccctt
    [gap]
    1 tccagctgccccatcagccctttctccccactccgcaccctgtcaccccaggcccattgac
    61 cctatctctgccccagGGACATTGGGGGCAACGAGACAGTACCCCTGCGCCAGAGCTTT
121 GTGCCTGTGAGACCAGGTCCCCGCCAGCTCATTGCCAGCTTGGATAGCCACAGCTCTCC
181 CAGGTGCACGGGGTCATCCAGGTGGACGTAGCCCCAGCCGGGAGGGCGGGGCTTCTCA
241 GACATTAGAGGCAGCGGTCGCTCACGGGAGACCATCCCCATGGCCTCTCGAGGTGGGGCT
301 TAGccctgagccagaagcaatgggactgatgtcagatgagcaaggacactgcctcaagac
361 aggggctMcggcagagaggctccccaggggtcagggtgggagacctgggccccctgggag
421 gagctgatctcatttg

```

Abb. 4-1: Sequenz des ovinen *TGM1*-Gens. SNPs sind unterstrichen und fett gedruckt (R= A/G; Y = C/T; K = G/T; M = A/C; S = C/G; W = A/T), die Basen der Introns sind in Kleinbuchstaben, die der Exons in Großbuchstaben gedruckt. Die kodierenden Bereiche sind grau hinterlegt, die nicht sequenzierten Intronbereiche mit [gap] gekennzeichnet.

Ergebnisse

```
601 AGCGGCGGCGGCGGCGGCTCTCCGGCCAGCAGGTCCAGTGCCAGAGCTACGGAGGCGTC
661 TCTAGTGGGGGGCGGCTCCGGCTGCGGCGGCGTCTCTCCGGGGGCGGCTCCGGCTGCGGC
721 GCGGTCTCCCGGGGGCGGCTCCGGATACTTCTCGTCTCCAGACACTCCAAACCCCG
781 TGCTTGCCCCAGCAGAGCTACGGAGGGGCTCATCCGGCGGCGGCTGCGGCGGCGGTTCC
841 TCCGGGGGCGGCGGCTGCTTTTCCAGCGGTGGGGCGGCAGTGGATCCGGCTGCGTGGGC
901 GGCTCCTCCGGGGGCGGCGGCGGCTGCTTCTTAGCGGTGGGGCGGCAGCGGTTCCGGC
961 TCGGCGGCGGCTCTCCGGGGTGGTTCCGGGGTGGAAGGGCGTCCAGCTGCGCAT
1021 CAGACCCAGCAGAAGCAGCCCTACCGCCAGCAAGTAAggccccctg
```

Abb. 4-2: Sequenz des ovinen *LOR*-Gens. Die Basen der Introns sind in Kleinbuchstaben, die der Exons in Großbuchstaben gedruckt. Die kodierenden Bereiche sind grau hinterlegt, die nicht sequenzierten Intronbereiche mit [gap] gekennzeichnet.

4.1.3 KGF

Das *KGF*-Gen befindet sich laut Sheep Genome v2.0 (ISGC) auf dem ovinen Chromosom 7 und besteht aus drei kodierenden Exons mit einer Länge von 585 bp (Abb. 4-3). Die Übereinstimmung zwischen der Sequenz des Schafes und der des Rindes liegt bei über 98%, im Vergleich mit der in der Genbank verfügbaren mRNA des Schafes (NM 001009235.1) sind an 5 Positionen Abweichungen. Die vier im Rahmen dieser Studie identifizierten SNPs sind in Tab. 4-2 zusammengefasst.

```
1 tcctcttcctgatccttagtaggtaagtaacagattacagaattttaaactacaaggca
61 ccacagaatcacctagactaattttacaagtatagtaacctgagattcagaaacatcaggt
121 gacttgtccaaggtcatactggtaattagtggtcactcaagcaagaatattgttattc
181 ttactttcagtctagcaacataagacataaagttataagcaatgctgaaatatctcttta
241 tgaagagatatccccttaactcagctatatacttcttgaagaaactaaggtgtgacttaa
301 tacatattaggagttttattctcaacattctgaacacaRaggaataatagtagcaatgtaY
361 gcttcataaatctatgtaaaagatttctgtttaaagatccctttacatatatggtcaaa
421 gcaatatttttcaacttatttcaactgctatgagacaacctaaaaaattctgtttcccct
481 tctaactgcttcagagtcagagatttgtttctacaaagtagtaccatgttagatctg
541 agcataaacatggttcataagctccctctcatgaccactgaatgaatactatacaagcctc
601 ttttattctcactgttgtattcaacagcttactggttaagtttaattgcttccaatgag
661 gtcagcaaaggtatttatcgaaaagctccgaataaaaaggctccacacacacacacaag
721 ctcaacCGGCTCACACACAGAGAAAATCCTCTTGCTGCTGTTGATTTATGGAACA
781 ATTATGATTCCGCTGGAGAATTTCTCAGCTGAGAAATAGTTTGTAGCTACAGTAGAGAGG
841 CTCAGTTGCACAGGGCAGACAACAGACATGGAATTTCTGTGTATCCAGCTGTTATCAAC
901 AGAACAAAGtaagtgaaactgttctgtcttttaaaaaataatgctaaatgtttgtt
[gap]
1 cttaatctctcattgcaaacagAAGTCAAGTAGCAAACAGCATCTCAGCAACTGAGTTTA
61 TTACAACCTGCTTTTATAAGGATATACCAACAGAGAGTTATTTAAGGAGGACTCCTATAC
121 TGCTATCAGGAACATAAAGGATAAAGGCTAACAAATTTGGAGAGTGCAACTGCTCTCTTA
181 AACAGTTCACAGATAGGAAGAGGTCAATGACCTAGGAGCAACAATCAACTCAAGATTTAA
241 TTTTCATTATGTTATTCATGAACACCCGGAGCACTATACTATAATGCGCAAATGGATACT
301 GACATGGATCCTGCCAAGTTTGCTCTACAGATCATGCTTCCACATTATCTGTCTAGTGG
361 CACTATATCTTTAGCTTGAATGACATGACTCCAGAGCAAATGGCTACAAATGTGAAGT
421 TTCCAGCCCCGAGCGACATACAAAGAAAGTTATGATTCATGGAAGGAGGAGATATAAGAGT
481 GAGAAGACTCTTCTGTGCAACACAGTGGTATCTGAGGATTGATAAACGAGGCAAAGTCAA
541 AGGACTCAAGAGATGAAGAATAATTACAgtaagtaatgttttctatttcaagaaagc
```

```

601 ttatgagccttaacaatctgtgaaaagatcaattttcaagtgcacatgctttctcaatttc
661 cctttttt
    [gap]
    1 aaatgacatatctttctgtgattccttgcagACATCATGGAAATCAGGACAGTGGCTGTT
    61 GGAATTGTAGCAATCAAAGGAGTGGAAAGTGAATATTACCTTGCAATGAACAAGGAAGGA
    121 AAACCTCTATGCAAAGgtattgatagatgatagctcagacttaatttctcaaacttatttt
    181 tgtcaaaaagtatcttccctttctgaaaagtaaaaatgaaattaattMctctcaaactatg
    241 taactcaatgatttcattaaaacattttctatttaggaattaaggaaaaatgttttctgt
    301 gtcaccttgga
    [gap]
    1 tgttgtttgttgttcttctcattgtagAAAGAATGTAACGAAGACTGCAACTTCAAAGAATT
    61 AATCTTGAAAAATCATTACAAACACATATGCATCAGCTAAATGGACACACAGCGGAGGAGA
    121 AATGTTTTGTGCCTTAAATCAAAGGGGGTTCCAGTAAGAGGGAARAAAAACGAAGAAAGA
    181 ACAAAAAACAGCCCACTTTCTTCTATGGCAATAACCTAAtcataatggcatataagaa
    241 accagttccagcaggagatttctttaagtggaactgttttctttttttatcttttYtttt
    301 ctcttttttaaaactaaccaagaaaggctggaaaactactgaaaaactgatcaagctggac
    361 ttgcgMatttatgtgtattttaagagactgcattaagaaagatttgaaaaaatataca
    421 caaaaatcagatttagtaactaaaagttgtaaaaagttgtaaaaactggttgYacaatcat
    481 gatgttagtaaatagtaaatgttttttcttaagttaattacccttaagagtatgttagatt
    541 tgattatctgataatgattattaaatattcctatctgcttataaaaatggctgctataat
    601 aataataatgcagatgatgttatataagatgtgtcagacctaaaggctgctggaatgatc
    661 tgcagataatcaagccaactaactatggaagatgagcagatatttgaatacgttctag
    721 tgaaaaattatgaaccactctaattagaaaagaaacagtatttctcaaaattccatcatgg
    781 aaatgagtc

```

Abb. 4-3: Sequenz des ovinen *KGF*-Gens. SNPs sind unterstrichen und fett gedruckt (R= A/G; Y = C/T; K = G/T; M = A/C; S = C/G; W = A/T), die Basen der Introns sind in Kleinbuchstaben, die der Exons in Großbuchstaben gedruckt. Die kodierenden Bereiche sind grau hinterlegt, die nicht sequenzierten Intronbereiche mit [gap] gekennzeichnet.

Tab. 4-2: Im *KGF*-Gen identifizierte SNPs mit SNP-Name, Lokalisation im Gen, Art des Austausches und eventuellen Besonderheiten. FR = flankierender Bereich, ncds = nichtkodierender Bereich des Exons, cds = kodierender Bereich.

SNP-Name	Lokalisation	SNP	Besonderheiten
KGF_3	5'FR, 394 bp vor Exon 1	A ⇒ G	-
KGF_4	5'FR, 372 bp vor Exon 1	C ⇒ T	-
KGF_1	Exon 4 cds, Pos. 141	A ⇒ G	synonym
KGF_2	Exon 4 ncds, Pos. 144	A ⇒ C	-

Ergebnisse

4.1.4 LAMC2

Auf dem ovinen Chromosom 12 (Sheep Genome v2.0, ISGC) befindet sich das LAMC2-Gen mit 23 Exons und einer kodierenden Sequenz von 3576 bp (Abb. 4-4).

Die Übereinstimmung mit der Rindersequenz NC_007314.3 beträgt über 96%.

Insgesamt wurden 46 SNPs identifiziert (Tab. 4-3). Von den 14 SNPs in Exonbereichen führen fünf zu einem Aminosäureaustausch. Diese Austausche finden statt an Position 123, 508, 689, 819, 849 und 1001 der Aminosäuresequenz.

```
1 ctgttttctctgttgatttttagcccagagctgatcagagctgctgacttatttgagttt
61 gccgcacaggagactgggctcccagttggagaaaggggggggctgctagctacctccc
121 atgctgctctggaccaccctgagagaaaagaggggctctgggggacctggcacattcctc
181 ccacaagatccctgggcccagcctctgcaccacgcctcggcctaggccaggtgcgccc
241 tccttgcgggaggggggagcccggcagcaggggtgagcgttttacagctgctgtgtgc
301 tgtgtgtttgtctgcctcccagggctgggtcctccttattcacaggtgagtcacaccY
361 gaaacacaggtctctctcctgtcaggactgagtcaggtagaagagtcgataaaaaccacct
421 gatcaagggaaagaaagcagcagcggagcgcagagtgaaagctcccagcggagagggcgac
481 gggcagctcccctgcagcggcgggacagYgcggccggcctggccATGCCTGCGCTCTGGC
541 TCAGCGGCTGCCTCTGCCTCTCGCTCCTCCTGCCTGACGCCGGCCAACTCCAGGACGC
601 CAGgtgagtcctcgtcccggaggaaaccgcagccctggggggggaac
[ gap ]
1 actagtatgtagtaccctgggcatcgtttttattatacaataataataaaaacaccta
61 ggagaattgcccctgacttgttttctgttgaYgatgtcttYtttttttcccctaatcctt
121 agTCTGTGATTGCAATGGGAAGTCCAGGCAATGCATCTTTGATCAGGAACTTCACAGACT
181 GACAGGAAATGGATTCCGCTGCCTCCACTGCAGTGACAACACTGGGGGCATTCACTGCGA
241 GAGGTGCAGGGAAGGATTTTACCGGCACAGGGAGAGGGACCCTGCTTGCCCTGCAACTG
301 CAACTCCAAAGgtagtca
[ gap ]
1 ctcccataatggtgatgattgccctctaagtcatatgaatgaaatgttccttttctctt
61 ttcctttcccctcctctgtggttatagGTTCTCTTAGCCCTCGATGTGACAACACTGGAC
121 GGTGCAGCTGTAAGCCAGGTGTGACAGGGGACAGGTGTGACCCGTGTTTGCCAGGCTTCC
181 ATACCYTACCCGATGCTGGGTGCACCCAAGACCGGAAGCTCCTgtaagtgcctgtgccc
241 ccgctggttgcaactgtgactaatggcgatcKgacaacattagggaaccttacattact
301 gagtaactgttactaagtaactgagttagggaaacactattttaagaaYaatgttttattt
361 attttttggtgacccagagctcttagttgtggcatatgagatcttacttccctgaccagg
421 atcaaacccaggcctcctgcattgggagcttggagctttagc
[ gap ]
1 ctcaagttggtgacatttgcttatgagYgcctgatcttcatgtgtgtagttcagagcatt
61 tggaaacacagctctaattttcttttcttctttccagAGACTCCAAGTGTGACTGTGAT
121 CAGCCGGCATCGTGGGCCCTGTGACACGGCCCGCTGTGTCTGCAAGCCAGCTGTCACG
181 GGAGAGCGCTGTGATAGgtctgtgtgaactgcggccctctggacacagcaggaggtcccc
241 tgacaaccagcatgaatgtggttcatggaaaagggacacttaagcaatgttgatgacctt
301 ctctctgctccctggcctcaaaaactagaccttgttattatttttttWaatttatct
361 ttttgccacactgca
[ gap ]
1 atattctctgtgggaatgagaataaacctataatttgttattgaaatatttgtttgaat
61 tgtcccatttctgaaatgcccctgcagGTGCCGACCAGGTTACTATCACTGGATGGGA
121 GAAACCCTGAGGGCTGTACCAGTGTTTTGGCTAYGGGCATTACGCCAGCTGCCAAAGCT
181 CTGGAGACTACAGTGTCCATAAAATCTTATCTACCTTCCATCAAGgtaaagcatgctgtt
241 ttctaggtgttttgcctttatctactgctgtatagggctttgtgcttatagactctctgc
301 tgcaggatggggctcttgagtcactctttaaYaggtgactgtcttttagctttaaagtga
```

361 cattatntttgtcagggcaataagaaagagcctgggtgtcttggaaaagttgtatctgaacag
421 ttactcagaccagcttctgaatgacttataaaaaataactaaaaagagaacaggttttca
481 actccctgcatttccatttaattgacttttaaaaccacaaagaatcattggattgagggg
541 cttaacacaagtccttggaaatggaattcacattcatttgtattacttcttcatgtatgcc
601 aaatgagttaatatgtgaaattagttaccaagctacaaagcactctaaaaatatggga
661 gattaatgtgatctcaactctgagtttctctctgaacatattggaccctcttacctcaet
721 caggccagaccattgtttatgtgaagtgaataaaaaatgcaaaattccaggcagatgaaaaa
781 tgttctcttattccaagatcagactcaaagacaagaagttaaagcaggtgtaaacagga
841 gtaggtgaaggtaaaaaccaagtagagaggtccatagaaaattctgaggatgggtgcacga
901 atgtggaaatataaagaaaaccYactggttacttactcattgctcgtgagtagcaatcaa
961 gtcttgccttgtttaaactcaatagRtgataaggtttgttctaattgaaagatgggtttact
1021 tacgttccagATGTTGATGGCTGGAAGGCTGTCCAGGAAATGGGTTTCCTGCTAAGCTT
1081 CAATGGTTCACAGGCCATCAAGATGTGTTTAGCTCAGACGACGATTCAGACCCTGTCTAT
1141 TTTGTAGCTCCTGgtatgtatggatttttctctgtagaagacaact
[gap]
1 cagctgatcctagtcctttttgatctgtttcacagCCAAATTTCTTGCGAATCAACAGGTG
61 AGCTATGGGCAGAGCCTGTCTTTTGACTACCGTGTGGACAGGGGAGCCGACACCCATCT
121 GCCCATGACGTGATTCTGGAAGGTGCTGGTCTACAGATCACAGCTCCCTTGATGCCACGT
181 GACAAGACACTGCCTTGYGGGATCACCAAGACTTACAGCTTCAGgtaaagagaaagacta
241 gtagtgagtcaaagaaagcaaaYgggtgactgagtcgtct
[gap]
1 ccttcactcctcctcaagggctgtgaaggggcttagttgttctctgcactctcgggcataa
61 ttgaatcaggtatacacattataagatttgataagagctggatttttcccttttggttt
121 taaatcatgcagATTAAATGAACATCCAAGCAGTAATTTGGAGACCCAGCTGAGTACTT
181 TGAGTATCGGAGGTTACTGCGGAACCTCACAGCCCTGAGGATCCGAGCTACCTACGGAGA
241 ATACAgtaaagtgactaaaagaaggaattcctccYttgttaggttttctgtttaaactgtct
301 tcagctStctaacttggtagacaRtctccaaacaggtggacaaactatgaatgggtttgat
361 gtagaatctctgattggga
[gap]
1 ctttagatccctggacctaaccacttgttgcctcccactgtcttctctcttgcagGTAC
61 TGGGTACCTCGACAACGTGACCTTGATCTCAGCCCGCCCATCTCAGGAACCCAGCACC
121 CTGGGTTGAACAATGTGTATGTCTCTGTTGGGTACAAGGGACAGTTCTGCCAGGAATGTGC
181 TTCTGGCTACAAAAGAGATTACGCCAGACTGGGACCTTTTGGCACCTGTATTCCTTGTAA
241 CTGCCAAGGGGGAGGGGCCCTGTGATCCAGACACAGGTgagtgaaaagatacctgaaccag
301 gcggttcggggcMcagccaggtgaccgggggtctcccgtggaagagagagctgtgacggaa
361 agcggtgcctgaaactcatttccgagatgggaaagattaagagagagcagggctggactc
421 aagggaaagatggacatggcgctttatcacattccatccttttcatgggaaatgccaca
481 aggttgtgagaaaggtgctaggttacaggaatgggtgtcacggttcagtgctgggtggg
541 ggagctgctgcaaatgtcaagaattgtttggggagatcaaaagcagtgctcaggacctga
601 atgaatgtgccgacaagttgtggggaagaggggagcggtgttaacttatgtaggtggta
661 aaaggagWgctgtctcctagcctgggagagggaggtgagattcagggctgctggccat
721 gtttagagttggttagggggcagaggggagggccagcgctcaggcactctggggaagct
781 gcagaaagggaggtttgaattaccaagccctgcctcccacgcgtcgtcctctgtattaa
841 agaagtgagagagtttaccogctcatttctctgcccctccgttctgctctgctccca
901 ggaGATTGTTACTCGGGGATGAGAACCCCGACATCGAGTGTGCCGATGCCCATCGGT
961 TTCTACAACGACCCGACGACCCCGCAGCTGCAAACCTGTCCCTGTGCAATGGATT
1021 AGCTGCTCCGTGATGCCAGAGACAGAGGAGGTGGTGTGCAATAACTGCCCCACGGCGTC
1081 ACTGgtgagggcagctgcccaccctgtct
[gap]
1 ggaagctcttctgaggagtagcataatttcagcctctgctctggttttMggctaactg
61 atgacagctgctggtgactcgtggttccctccagCGCCCGCTGTGAGCTCTGTGC
121 CGACGGCTACTTTGGGGACCCCTTTGGGGAACRTGGTCCAGTGAGGCCCTGTGACCCCTG
181 TCAGTGCACAACATGTGGACCCCAATGCCCCGGGAAGTGCACCCGCTGACAGGCAG
241 GTGCTGAAGTGCCTTTACAACACGACCGGTGCCACTGCGACCAGTGCAAAGCYGGCTA

Ergebnisse

301 CTATGGGGACCCCTTGGCCCCAACCCAGCGGACAAGTGTGAGGtaggactgtaccct
361 acgcagactc**W**ccaggctctgtgtgtgtgtgtgtgtgtgcgtgctgtgtgtgcatgtacac
421 gtgtgaaacgtaacaatgggcaaggtgaccgcagggaatatgtgatgtactttggc
481 ttctctga
[gap]
1 gaatcaacaagggcaaagaagggttttgcctctgggtaactggatcttcccttttatYtttg
61 ctatactccaggttccagaattagtttgacatgaaagcttccctgtttgcctttgtctc
121 tagCTTGCAACTGCAACCCCAATGGGCTC**R**GGGCCCGTGGAGTGTAGAAGTGATGGCAGCT
181 GTGTTTGCAAGCCAGGATTTGACGGCTCCACTGTGACCATGCAGCATTAATCAACTGYC
241 CAGCTTGCTATAATCAAGTGAAGACTCAGgtgtgctgctagccagccctcacctcaca
301 agtaaaatcctgaagcatcttctgggtgggtctgg
[gap]
1 accactagtgccac**Y**tggggaagccttagccccggattcctggcat**R**ttatattccaccg
61 tgaactccatcctctgttctaatcctctttcctt**Y**gtgatttcagATGGATCAGTTTATG
121 CA**R**CAACTTGAGAGCCTYGAGACACTGCTTTCAAAGGCTCAGGCTGG**Y**GGAGGAGCAGTA
181 CCTGACGCAGAGCTGGAGGGCAGGATGCAGCAGGCTGAACAGGCCCTTCAGGACCTTCTG
241 AGAGAAGCCAGATTTCAGAAAGgtgatggagccggttcacacaggagagaattcaggg
301 gcttagaaagcagtcctcctgggtcatagaaYctttgtggtaacagttcagcagatgtct
361 ttgcctc**R**cccttgcggaggtggcagaactgtctgtgatgttctcctgagatttgaatg
421 atggagataaaagagcatgcattcacatactgggattttaccgttttggcgaiaaccagt
481 cactttttcagccctct**R**ttttttagtacttgaccctcaacgtgtctatcctcctctt
541 ctatttggatttcagGTGCTATTAGATCCCTCAATCTCCAGTTGGCCAAAGCCAGGAGCC
601 AAG**R**GAATAGCTACCGGACCCGCTGGATGACCTCAAGATGACCGTGGAGAGACTTCGGA
661 CCTGGGGACCCAGCATCAGGACCGAGTTCAGGATATCGCAGGCTTATCACGCAGATGC
721 GCCTGAGCCTGGAGGAGAGYGAGGGTGCCCTGCGGAACACTgtagggtggcgc
[gap]
1 taccatgtaaacagggactcttgatgagtcagggttcagacaggacagctgcagaac
61 ctgcttgggctccatggctcccagcagagccttaatcatttgccttttcccacagAACA
121 TTCTCCCTCAGAGCACTACACGGGCCAAATGGCTTTAAAAGTCTAGCTCAGGAGGCCA
181 CGAGACTGGCAGACAGgtgagtaggctggagggcacctctgcttcagatcacct**S**tggg
241 agccaggcttgaacaactctgctgagttatcaggacaaagctccatactgattacctc
301 cagactcctttgcaa
[gap]
1 ggcaaaaaa**W**tttttttaataataaaggaagccctttgctataaaaaactcattctttt
61 gatcttttcagCCATGTGCAATCAGCCAATAACATGGAGCAACTGGTCAGGGAACCTGAA
121 GACT**Y**TCCAAGCAAGCCCTGACCTTGGCGCGCAAGGCTGCTACTGAAGGAGGCCAGCAGC
181 GGCAGCTCCCGTGGCTCCGTGGTGCAAGAGCTTGTGGAAAgtacgttttcagcaggtcct
241 cgcaacaggccaatataatccgctccctcccagggtacaatgcaaacaccgctctgaggag
301 tgcgtgttccctttaaaagtatcaatagtaagaaggacagagaaatgagaggttactttg
361 gaggaaagcagatgtctttaaagactggaagaaaaatgtcaattactctaagtaaagttc
421 agttttgatttagagattgtatattttagatattggtaccatctgtgggtgtttaa
[gap]
1 aaaggaggtgaacacacccatctggcggcatggagtgataaaacataatatttcatgtg
61 attaagaattgggaaacttgggttgaatttttctgaccaacctgtataaaactttaatgc
121 ctgtgtttaaattgtggaagagacacatatcagacatttattctt**R**ctgtgttctttgg
181 ataactctgacgacatattttttaacagaatgaatttttgccttttaataaaaagcggaat
241 tctcaaagtcgctctcttctactccctgcag**Y**TGGAGAAAACCAAGTCTCTGGCCAGC
301 AGCTATCGAGGGAGGCCACTCAAATGACACTGAAGCAGATACGTGCATATCAGCATAGTC
361 TCC**R**CCTTCTCAGTTCAGCGACTCAGCTTCAGGGAGTCAGTGATCAGTCTTCCAGgtaa
421 gagcatctaacctgtgcagtgatgtacagaaggccaataatgctttcttctcgtgggatt
481 cattgaaactgttcaactccagttttttccctccatatttaccctttctgtctttaaatta
541 ggaagcgcatttatccttctcactatcctcctcttattctttgttctttaaactccagttc
601 ggtccctgataaca
[gap]

```

1  gggtgactcacagGTAGAAGCAAAGAAGATCAGACAAAAAGCTGACTCTCTCTCAAGCCT
61  GGTGACTAAGCGAATGGATGAGTTCAAGCGTGTGCAAAAGCAGTCTGGGAAACTGGGAAGA
121  AGAAACCCAGAAGCTCTTACAGGATGGGAAGAATGAGAGACAGgtatcctttgttactcc
181  gttccttcagcagaccgctattgaaatggctaccRgtaagRagaaccatcgaaaactctcg
241  aaaggatcatggatttgcctgctattgagaccttaatgtgattacctcagttccactcact
301  gagagtgaaagtcaccagctatctccaactctttgcaacccccatggactgtagcctacta
361  ggctcttccatccggtgggattctctagggcaagaatgctggagtggggtgcccatttctctc
421  agtctctcaaatgtaggaataggactgaagtctccccggccaRt11ttgatctagctctgt
481  ctatgaagacatatgtctgtacttcttaggtatatacgcacatatgtctatgaagtgtatg
541  tccatacttcaggaagtatctagagtttaaaataggatttgcaaaactgttcttgyYcc
601  tgagttaggtcagctctgtcctcaatgtggaatcctactggGtcatcaggttataaagt
661  ttgtgtggtctcagcttgtgtggaggggtttgctacagcaccctagactccaagaatcaca
721  gttctctgtttgcgaagcagctgtgtcagagcggctatgctggcaggagggctctgccccg
781  ggtgtgcttacatttactctaattctgttctgctgcccatttacagAAATCAGATCAG
841  CTGCTTTCCCGTGCCAACCTTGCTAAAAGCAGAGCCCAAGAAGCACTAAGTATGGCAAT
901  GCCACTTTTTATGAAGTTGAGAACATCTTAAAGAACCCTCAGAGgtanncagggttcagat
961  cactgtatttt
    [gap]
1  ttgacttttagttgtaagttaattttcatcttcatggcaatgttttcttatcYtcttttc
61  agAGTTTGTATCTGCAGGTTGAAGACAGAAAAGCAGAGGCTGAAGAGGCCATGAAGAGACT
121  CTCTTACATCAGCCAGAGGGTTGCAGATGCCAGTGACAAGACCAGGCCGAGCAGAAAACAGC
181  CCTGGGGGGTGCTGCTACCRACGCCCAGAGGGCAAAAGACTGCAGCCGGGGAGCCCTGAA
241  TATCGCCGGCAAGATCGAACAGgtaaaagagaaatcgcaggctcagcgggagcagcttcaa
301  cataccggtcatgttgaatgagtgagagcgtYgggctcattctgacctgtaagactcagc
361  gtctgttatgggtccattgtgta
    [gap]
1  ctccatcagagcctggcctcagctgtatttttctgcggtcgtctttgggatgtttctat
61  gcctcaccctctctccttccgctccctggctccctttcttctcccagGAGATTGGGAGTC
121  TGAAC TTGGAGGCCAAYGTGACGGCAGATGGAGCCTTGGCCATGGAGAAGGGACTGGCCA
181  CTCTCAAGAGTGAGATGAGGAAAAGTGAAGGAGAGCTGGCAAGGAAGGACGGGGAGTTCG
241  ACGTGGATATGGACGCAGTCAGACGAGCgtgagttccctagttttccaYggcagagctccKg
301  taacctggccactgtgggaacaccctttccagatgggcttgtgcttatttttccctcagG
361  TGATTGCAGAAGCCAGAGAGCTGACAGCAGAGCYGAGAATGCTGGAGTTACGATCCAAG
421  ACACACTCGACACGTTGGATAGCATCTACATCTAATAGgtatgtggagtggtcccYagcc
481  YtccaacctgtgttccaggccttctccccagagSagtaactagacttagtcccgatgctg
541  ggaatctcaacttccctaaagggttcaggaaat11tgcctt11gtttccaggctcagatac
601  cttaggcaggttgccttttcat11tg
    [gap]
1  tcagggtgaaacagaaat11aaagttacgaaagggcctgcctgcacccaaggggatctaat
61  cacaacttttctctgttaactccttcttctgctctaaaaatagACCAGCCTGGCAGT
121  GTAGATGAAGAGGGCTGATCTCAGTGGAGCAGAAGCTTTTTTCGAGCCAAAGACCCAGATC
181  AACAGCCAGCTGCGGCCGCTGATGTACAGAGCTGGAGGAGAGAGTGCCTTGGCAGTGGGGC
241  CACCTCCGCTCAGTGGAGACAAGCATCGATGGCATTCTGGCTGATGTGAAGAACCTGGAG
301  ACCATTCGGGACAGCCTGCCCCCGGATGCTACAACACCCAGGCTCTTGAGCAACACTGA
361  agtgcctgcgagattttccaacYggggttcttaggataagacctcaggctcagaagcc
421  atctcatgcgggtggggtgggggacatt11gaaagt

```

Abb. 4-4: Sequenz des ovinen *LAMC2*-Gens. SNPs sind unterstrichen und fett gedruckt (R = A/G; Y = C/T; K = G/T; M = A/C; S = C/G; W = A/T), die Basen der Introns sind in Kleinbuchstaben, die der Exons in Großbuchstaben gedruckt. Die kodierenden Bereiche sind grau hinterlegt, die nicht sequenzierten Intronbereiche mit [gap] gekennzeichnet.

Ergebnisse

Tab. 4-3: Im *LAMC2*-Gen identifizierte SNPs mit SNP-Name, Lokalisation im Gen, Art des Austausches und eventuellen Besonderheiten. FR = flankierender Bereich, ncfs = nichtkodierender Bereich des Exons, cds = kodierender Bereich.

SNP-Name	Lokalisation	SNP	Besonderheiten
LAMC2_1	5'FR, 165 bp vor Exon 1	C ⇒ T	-
LAMC2_2	5'FR, 17 bp vor Exon 1	C ⇒ T	-
LAMC2_41	Exon 3, Pos. 99	T ⇒ C	Phenylalanin ⇒ Leucin
LAMC2_42	Intron 3, 48 bp nach Exon 3	T ⇒ G	-
LAMC2_43	Intron 3, 126 bp nach Exon 3	T ⇒ C	-
LAMC2_4	Intron 5, 107 bp nach Exon 5	T ⇒ C	-
LAMC2_5	Intron 5, 108 bp vor Exon 6	C ⇒ T	-
LAMC2_7	Intron 7, 39 bp nach Exon 7	C ⇒ T	-
LAMC2_8	Intron 8, 30 bp nach Exon 8	C ⇒ T	Hinweis auf Kopplung mit LAMC2_9 und 10
LAMC2_9	Intron 8, 62 bp nach Exon 8	C ⇒ G	
LAMC2_10	Intron 8, 78 bp nach Exon 8	A ⇒ G	
LAMC2_11	Intron 9, 38 bp nach Exon 9	C ⇒ A	-
LAMC2_12	Intron 9, 393 bp nach Exon 9 bzw. 239 bp vor Exon 10	T ⇒ A	-
LAMC2_13	Intron 10, 48 bp vor Exon 11	C ⇒ A	-
LAMC2_44	Exon 11, Pos. 55	G ⇒ A	Arginin ⇒ Histidin, Hinweis auf Kopplung mit LAMC2_14
LAMC2_14	Exon 11, Pos. 197	T ⇒ C	synonym
LAMC2_15	Intron 11, 27 bp nach Exon 11	T ⇒ A	-
LAMC2_45	Exon 12, Pos. 26	G ⇒ A	synonym
LAMC2_16	Intron 12, 91 bp vor Exon 13	T ⇒ C	Hinweis auf Kopplung von LAMC2_16 bis LAMC2_21
LAMC2_17	Intron 12, 59 bp vor Exon 13	G ⇒ A	
LAMC2_18	Intron 12, 11 bp vor Exon 13	T ⇒ C	
LAMC2_19	Exon 13, Pos. 18	A ⇒ G	synonym
LAMC2_20	Exon 13, Pos. 33	T ⇒ C	synonym
LAMC2_21	Exon 13, Pos. 63	T ⇒ C	synonym
LAMC2_22	Intron 13, 106 bp nach Exon 13 bzw. 188 bp vor Exon 14	G ⇒ A	-
LAMC2_23	Intron 13, 58 bp vor Exon 14	G ⇒ A	-
LAMC2_24	Exon 14, Pos. 49	A ⇒ G	Glutaminsäure ⇒ Glycin
LAMC2_26	Intron 15, 40 bp nach Exon 15	C ⇒ G	-
LAMC2_46	Intron 15, 61 bp vor Exon 16	A ⇒ T	-
LAMC2_47	Exon 16, Pos. 55	T ⇒ C	synonym
LAMC2_48	Intron 16, 105 bp vor Exon 17	G ⇒ A	-
LAMC2_49	Exon 17, Pos. 2	T ⇒ C	synonym
LAMC2_51	Exon 17, Pos. 95	A ⇒ G	Histidin ⇒ Arginin
LAMC2_27	Intron 18, 51 bp nach Exon 18	A ⇒ G	-
LAMC2_28	Intron 18, 57 bp nach Exon 18	A ⇒ G	-
LAMC2_29	Intron 19, 10 bp vor Exon 20	C ⇒ T	-
LAMC2_30	Exon 20, Pos. 137	G ⇒ A	Asparaginsäure ⇒ Asparagin
LAMC2_31	Intron 20, 70 bp nach Exon 20	C ⇒ T	-

SNP-Name	Lokalisation	SNP	Besonderheiten
LAMC2_32	Exon 21, Pos. 30	T ⇒ C	synonym
LAMC2_33	Intron 21, 22 bp nach Exon 21	C ⇒ T	-
LAMC2_34	Intron 21, 33 bp nach Exon 21	G ⇒ T	-
LAMC2_35	Exon 22, Pos. 36	T ⇒ C	synonym
LAMC2_36	Intron 22, 17 bp nach Exon 22	C ⇒ T	-
LAMC2_37	Intron 22, 22 bp nach Exon 22	C ⇒ T	-
LAMC2_38	Intron 22, 55 bp nach Exon 22	C ⇒ G	-
LAMC2_39	Exon 23 ncds, Pos. 24	T ⇒ C	-

4.2 Moderhinke-Prävalenz auf den Betrieben

Die Probennahme auf Betrieb 1 ergab bei der Beprobung 63 moderhinkenegative und 77 positive Tiere. Dazu kamen elf Tiere, die keiner der beiden Gruppen eindeutig zugeordnet werden konnten („fraglich“). Auf Betrieb 2 erfolgte die Probennahme im Abstand von einer Woche jeweils an der zu dem Zeitpunkt behandelten Teilherde. Es wurden 96 Tiere als moderhinkenegativ und 201 als -positiv identifiziert.

Auf beiden Betrieben ist sowohl bei den moderhinkepositiven wie auch -negativen Tieren die Gruppe der Schafe mit einem Körpergewicht von mindestens 80 kg die größte, die kleinste Gruppe bei der Gewichtsverteilung bilden die Schafe mit 65 kg und weniger.

Tab. 4-4: Gesamtzahl aller Tiere mit absoluter und prozentualer Anzahl an moderhinkenegativen und -positiven Schafen sowie solchen, die keiner der beiden Gruppen zugeordnet werden konnten („fraglich“) und die Verteilung der Körpergewichte innerhalb der beiden Gruppen auf Betrieb 1 und 2.

Betrieb	n	MH-Status	Anzahl	Prozent	Gewicht	Anzahl
Betrieb 1	151	negativ	63	41,7%	≤ 65 kg	2
					66 - 79 kg	15
					≥ 80 kg	46
		positiv	77	51,0%	≤ 65 kg	13
					66 - 79 kg	24
					≥ 80 kg	38
fraglich	11	7,3%	-	-		
Betrieb 2	297	negativ	96	32,3%	≤ 65 kg	28
					66 - 79 kg	67
					≥ 80 kg	90
		positiv	201	67,7%	≤ 65 kg	19
					66 - 79 kg	30
					≥ 80 kg	45

4.3 Genotypisierung

Die *call rate* (prozentualer Anteil der erfolgreich genotypisierten Tiere an der Gesamtzahl der Proben) lag in der Regel über 90% (90,5% - 97,1%). Nur drei SNPs hatten eine *call rate* zwischen 81,4 - 89,6% (TGM1_5, KGF_2, LAMC2_15). Eine *call rate* von 0% hatten die SNPs TGM1_9, TGM1_12 und LAMC2_11.

Da es zwischen den beiden von Moderhinke betroffenen Betrieben einige Unterschiede, vor allem die Rasse der gehaltenen Schafe, gab und auf Betrieb 3 nur Klauenbehandlungen allgemein erfasst wurden, wurden die Berechnungen von χ^2 - und Fisher's Exact Test für jeden Betrieb gesondert durchgeführt. Für Betrieb 1 wurde zum einen die Assoziation auf Basis der Momentaufnahme bei der Probenahme berechnet („Betrieb 1 Moment“), analog zu der Situation auf Betrieb 2. Da von Betrieb 1 zusätzlich Daten über frühere Moderhinkeerkrankungen vorlagen wurden bei einer weiteren Berechnung diese Daten mit einbezogen und jedes Tier, welches im Verlauf der Aufzeichnungen mindestens einmalig an Moderhinke erkrankte als positiv gewertet („Betrieb 1 Dauer“). Die ermittelten Werte für die Assoziation decken sich größtenteils zwischen der Momentaufnahme und dem Einbeziehen aller Daten. Signifikante Unterschiede in den Genotypfrequenzen ergaben sich für den SNP TGM1_5 auf Betrieb 1 und 2, KGF_1 auf Betrieb 1 allerdings nur bei der Momentaufnahme, LAMC2_1 auf Betrieb 1 ebenfalls nur bei der Momentaufnahme, LAMC2_15 für Betrieb 2 und 3 sowie LAMC2_48 auf Betrieb 3. Hochsignifikante Frequenzunterschiede wurden für den SNP LOR_chip auf Betrieb 2 sowie für LAMC2_14 auf Betrieb 3 ermittelt.

Die Varianzanalyse wurde nur für Betrieb 1 und 2 durchgeführt, da für Betrieb 3 die Datengrundlage zu gering war. Mit ihr wurde überprüft, ob der Genotyp des SNPs, die Rasse (ML, MFxML, MLX) und das Gewicht als fixe Effekte einen Einfluss auf den Moderhinkestatus ausüben. Signifikante Genotypfrequenzen ergaben sich bei dieser Untersuchung für den SNP KGF_1 und LAMC2_15, hochsignifikante Frequenzunterschiede für den SNP TGM1_5. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen der Assoziationsstudie, bei der ebenfalls der SNP TGM1_5 als am vielversprechendsten auffiel, und die Genotypfrequenzen der SNPs KGF_1 und LAMC2_15 teilweise signifikant waren. Weder Rasse noch Gewicht hatten einen signifikanten Einfluss auf den Moderhinkestatus.

4.3.1 TGM1

4.3.1.1 Ergebnis von χ^2 - und Fisher's Exact Test

Von den fünf ausgewählten SNPs konnten zwei, TGM1_9 und TGM1_12 aufgrund einer *call rate* von 0% nicht ausgewertet werden. Die *call rate* von TGM1_1, TGM1_3 und TGM1_5 lagen bei 95,1%, 94,7% und 81,4%.

Bei der Untersuchung mittels χ^2 - und Fisher's Exact Test ergeben sich signifikante Verteilungen der Genotypfrequenzen für den SNP TGM1_5 auf Betrieb 1, sowohl in der Momentaufnahme ($p = 0,016$) als auch bei der Betrachtung aller zur Verfügung stehenden Daten ($p = 0,037$ bzw. $0,043$), und in Betrieb 2 ($p = 0,047$). Die Daten von Betrieb 3, bei welchem nur Klauenbehandlungen erfasst wurden, liegen die Werte von χ^2 - und des Fisher's Exact Test mit $p = 0,72$ bzw. $0,78$ weit entfernt von der Signifikanzgrenze (Tab. 4-5).

Tab. 4-5: Anzahl der moderhinkepositiven und -negativen Schafe bzw. Schafe ohne (nein) und mit (ja) Klauenbehandlung je Betrieb, die Genotypfrequenzen der untersuchten SNPs TGM1_1, TGM1_3 und TGM1_5 sowie die Ergebnisse von χ^2 - und Fisher's Exact Test.

	Status	n	TGM1_1			Signifikanz	
			CC	CT	TT	χ^2	Fisher
Betrieb 1 (Moment)	negativ	61	0	0,02	0,98	0,279	0,462
	positiv	71	0	0	1,00		
Betrieb 1 (Dauer)	negativ	48	0	0	1,00	0,448	1,000
	positiv	84	0	0,01	0,99		
Betrieb 2	negativ	91	0,02	0,29	0,69	0,724	0,662
	positiv	181	0,02	0,33	0,65		
Betrieb 3	nein	56	0	0,29	0,71	0,189	0,203
	ja	65	0	0,18	0,82		

	Status	n	TGM1_3			Signifikanz	
			AA	AG	GG	χ^2	Fisher
Betrieb 1 (Moment)	negativ	59	0,37	0,41	0,22	0,113	0,107
	positiv	71	0,21	0,55	0,24		
Betrieb 1 (Dauer)	negativ	47	0,39	0,40	0,21	0,166	0,166
	positiv	83	0,23	0,53	0,24		
Betrieb 2	negativ	93	0,60	0,34	0,06	0,642	0,649
	positiv	177	0,54	0,40	0,06		
Betrieb 3	nein	55	0,20	0,60	0,20	0,608	0,613
	ja	65	0,17	0,55	0,28		

Ergebnisse

	Status	n	TGM1_5			Signifikanz	
			AA	AG	GG	χ^2	Fisher
Betrieb 1 (Moment)	negativ	54	0,37	0,39	0,24	0,016*	0,016*
	positiv	65	0,39	0,55	0,06		
Betrieb 1 (Dauer)	negativ	44	0,34	0,41	0,25	0,037*	0,043*
	positiv	75	0,40	0,52	0,08		
Betrieb 2	negativ	77	0,24	0,36	0,40	0,047*	0,047*
	positiv	149	0,20	0,53	0,27		
Betrieb 3	nein	48	0,56	0,38	0,06	0,720	0,784
	ja	55	0,60	0,31	0,09		

* = signifikant bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% ($p = 0,05$)

4.3.1.2 Ergebnis der Varianzanalyse

Auch bei der Varianzanalyse ergibt sich, dass der SNP TGM1_5 einen signifikanten Einfluss ($p = 0,01$) auf den Moderhinkestatus hat. Die SNPs TGM1_1 und TGM1_3 sowie Rasse und Gewicht haben keinen signifikanten Einfluss (Tab. 4-6).

Tab 4-6: Signifikanzniveaus für den Einfluss des Genotyps der SNPs TGM1_1, TGM1_3 und TGM1_5, der Rasse und des Gewichts auf den Moderhinkestatus.

	Genotyp	Rasse	Gewicht
TGM1_1	n. s.	n. s.	n. s.
TGM1_3	n. s.	n. s.	n. s.
TGM1_5	**	n. s.	n. s.

n. s. = nicht signifikant

** = signifikant bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1% ($p = 0,01$)

4.3.1.3 Genotypfrequenzen signifikanter SNPs auf den Betrieben

Signifikante Unterschiede in der Verteilung der Genotypen zwischen moderhinke-positiven und -negativen Tieren ergeben χ^2 -Test, Fisher's Exact Test und die Varianzanalyse für den SNP TGM1_5 auf Betrieb 1 und 2. Bei den nicht erkrankten Tieren kommt der Genotyp GG häufiger vor als bei den Erkrankten, auf Betrieb 1 in der Momentaufnahme mit einer Frequenz von 0,24 zu 0,06, auf Betrieb 1 bei Betrachten aller Daten mit 0,25 zu 0,08 und auf Betrieb 2 mit einer Frequenz von 0,40 bei den negativen und 0,27 bei den positiven Tieren. Der Genotyp AG hingegen tritt mit einer Frequenz von 0,16 (Betrieb 1 Moment), 0,11 (Betrieb 1 Dauer) und 0,17 (Betrieb 2) selten bei den moderhinke-negativen Schafen auf. Der homozygote Genotyp AA ist innerhalb der Gruppen auf jedem Betrieb annähernd gleich häufig (Abb. 4-5).

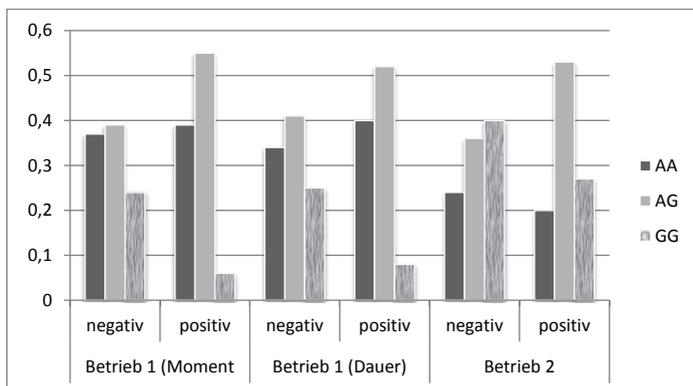


Abb. 4-5: Gegenüberstellung der Genotypen zwischen moderhinkepositiven und -negativen Tieren auf Betrieb 1 und 2 für den SNP TGM1_5.

4.3.1.4 Allel- und Genotypfrequenzen

TGM1_1

An Position des SNP TGM1_1 war die Base Thymin am häufigsten vertreten. Bei den Braunen Bergschafen, Merinolandschafen und Rhönschafen sowie den Merinofleischschaf-Merinolandschaf-Kreuzungstieren des Betriebs 1 kommt an diesem Genort nur das T-Allel vor. Betrachtet man allerdings die absoluten Tierzahlen so tritt das C-Allel in der Gruppe der Merinolandschafe im heterozygoten Genotyp CT bei einem von 125 untersuchten Schafen auf. Die Schwarzköpfigen Fleischschafe hatten mit 0,26 die höchste Frequenz für das Allel C.

Nur bei Coburger Fuchsschafen, Schwarzköpfige Fleischschafen und den Merinolandschaf-Kreuzungen kommt der homozygote Genotyp CC vor, allgemein ist der Genotyp TT in allen Rassen der häufigste (Tab. 4-7).

Tab. 4-7: Allel- und Genotypfrequenzen des SNPs TGM1_1 (call rate 95,1%).

TGM1_1										
	BBS	BENT	COF	GGH	MFS	MFx ML	ML	MLX	RH	SKF
n	30	32	32	32	94	24	125	271	31	43
C	0,0	0,09	0,19	0,05	0,07	0,00	0,00	0,18	0,00	0,26
T	1,0	0,91	0,81	0,95	0,93	1,00	1,00	0,82	1,00	0,74
CC	0,0	0,0	0,06	0,0	0,0	0,0	0,0	0,02	0,0	0,05
CT	0,0	0,19	0,25	0,09	0,15	0,0	0,01	0,32	0,0	0,42
TT	1,0	0,81	0,69	0,91	0,85	1,0	0,99	0,66	1,0	0,54

TGM1_3

Die Allelfrequenzen des SNPs TGM1_3 unterscheiden sich deutlich zwischen den Rassen. Die Schwarzköpfigen Fleischschafe und die Merino-Rassen, mit Ausnahme der Merinolandschaf-Kreuzungstiere, haben jeweils eine Frequenz für das G-Allel um 0,5. Bei den restlichen Rassen, einschließlich den Merinoland-Kreuzungstieren, tritt das A-Allel deutlich häufiger auf als das G-Allel (Tab. 4-8, Abb. 4-6).

Der homozygote Genotyp GG kommt bei den Grauen Gehörnten Heidschnucken nicht vor, bei den Merinofleisch und -landschafen sowie deren Kreuzungen macht er bis zu 26% aus (Tab. 4-8).

Tab. 4-8: Allel- und Genotypfrequenzen des SNPs TGM1_3 (*call rate 94,7%*).

TGM1_3										
	BBS	BENT	COF	GGH	MFS	MFx ML	ML	MLX	RH	SKF
n	32	32	32	32	93	23	124	268	32	43
A	0,83	0,84	0,70	0,88	0,47	0,48	0,53	0,75	0,59	0,50
G	0,17	0,16	0,30	0,12	0,53	0,52	0,47	0,25	0,41	0,50
AA	0,72	0,75	0,47	0,75	0,20	0,22	0,30	0,56	0,34	0,19
AG	0,22	0,79	0,47	0,25	0,54	0,52	0,47	0,38	0,50	0,63
GG	0,06	0,06	0,06	0,0	0,26	0,26	0,23	0,06	0,16	0,19

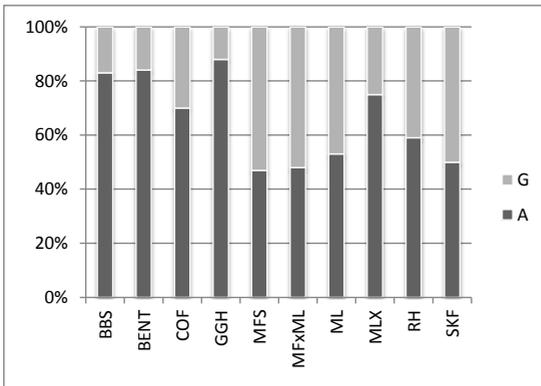


Abb. 4-6: Gegenüberstellung der Allelfrequenzen des SNPs TGM1_3 in den einzelnen Rassen.

TGM1_5

Der SNP TGM1_5 zeigt in der Genotypisierung deutliche Rasseunterschiede wobei die Grauen Gehörnten Heidschnucken mit 0,26 die niedrigste und die Schwarzköpfigen Fleischschafe mit 0,92 die höchste Frequenz für das A-Allel an dieser Position haben. Die Merinolandschaf-Kreuzungstiere haben mit 0,45 eine deutlich niedrigere Frequenz für Adenin als die restlichen Merinoschafe mit 0,72 (Merinofleischschaf), 0,62 (Merinofleischschaf-Merinolandschaf-Kreuzung) und 0,60 (Merinolandschaf) (Tab. 4-9, Abb. 4-7).

Bei den Schwarzköpfigen Fleischschafen kommt der Genotyp GG nicht vor, bei den Rhönschafen, Merinolandschafen und Merinoland-Merinofleischschaf-Kreuzungstieren nur mit 10%. Dahingegen ist er bei den Grauen Gehörnten Heidschnucken mit 58% der am häufigsten auftretende Genotyp (Tab. 4-9).

Tab. 4-9: Allel- und Genotypfrequenzen des SNPs TGM1_5 (*call rate 81,4%*).

TGM1_5										
	BBS	BENT	COF	GGH	MFS	MFxML	ML	MLX	RH	SKF
n	26	26	30	31	81	21	111	224	29	36
A	0,48	0,42	0,63	0,26	0,72	0,62	0,60	0,45	0,71	0,92
G	0,52	0,58	0,37	0,74	0,28	0,38	0,40	0,55	0,29	0,08
AA	0,27	0,12	0,40	0,10	0,54	0,33	0,38	0,21	0,52	0,83
AG	0,42	0,62	0,47	0,32	0,36	0,57	0,45	0,47	0,38	0,17
GG	0,31	0,27	0,13	0,58	0,10	0,10	0,17	0,31	0,10	0,0

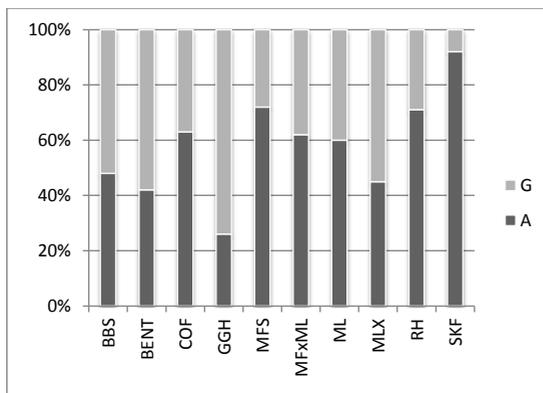


Abb. 4-7: Gegenüberstellung der Allelfrequenzen des SNPs TGM1_5 in den einzelnen Rassen.

TGM1_9 und TGM1_12

Die beiden SNPs TGM1_9 und TGM1_12 konnten nicht genotypisiert werden, sie hatten eine *call rate* von 0%.

4.3.2 LOR

4.3.2.1 Ergebnis von χ^2 - und Fisher's Exact Test

Die Frequenzen der Genotypen an der Position des SNPs LOR_chip (SNP s56889, OAR1: 109484830) sind auf Betrieb 2 hoch signifikant verschieden, sowohl im χ^2 -Test ($p = 0,008$) als auch im Fisher's Exact Test ($p = 0,005$). Auf Betrieb 1 liegen die Frequenzen knapp über der Signifikanzgrenze ($p = 0,086$ bzw. $0,104$). Bei dem Betrachten aller zur Verfügung stehenden Daten von Betrieb 1 ist die Genotypfrequenz zwischen den erkrankten und gesunden Tieren jedoch weit vom Signifikanzniveau entfernt ($p = 0,140$ bzw. $0,161$). Auf Betrieb 3 waren die Genotypfrequenzunterschiede nicht signifikant ($p = 0,774$ bzw. $1,0$) (Tab. 4-10).

Tab. 4-10: Anzahl der moderhinkepositiven und -negativen Schafe bzw. Schafe ohne (nein) und mit (ja) Klauenbehandlung je Betrieb, die Genotypfrequenzen des untersuchten SNPs LOR_chip sowie die Ergebnisse von χ^2 - und Fisher's Exact Test.

	Status	n	LOR_chip			Signifikanz	
			CC	CT	TT	χ^2	Fisher
Betrieb 1 (Moment)	negativ	61	0,84	0,16	0	0,086	0,104
	positiv	72	0,93	0,07	0		
Betrieb 1 (Dauer)	negativ	48	0,83	0,17	0	0,140	0,161
	positiv	85	0,92	0,08	0		
Betrieb 2	negativ	93	0,85	0,13	0,02	0,008**	0,005**
	positiv	182	0,68	0,30	0,02		
Betrieb 3	nein	56	0,96	0,04	0	0,774	1,000
	ja	65	0,95	0,05	0		

** = signifikant bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1% ($p = 0,01$)

4.3.2.2 Ergebnis der Varianzanalyse

Bei der Untersuchung mittels Varianzanalyse auf Betrieb 1 und 2 haben weder der Genotyp, die Rasse noch das Gewicht einen signifikanten Einfluss auf den Moderhinkestatus der Tiere.

4.3.2.3 Genotypfrequenzen des SNPs auf Betrieb 2

Auf Betrieb 2 ist die Frequenz der Genotypen innerhalb der zwei Gruppen bei der Untersuchung mittels χ^2 - und des Fisher's Exact Test hochsignifikant an der Position des SNPs LOR_chip. Bei den moderhinke negativen Tieren kommt der Genotyp CC mit einer Frequenz von 0,85 häufiger vor als bei den moderhinke positiven mit einer Frequenz von 0,68. Der heterozygote Genotyp CT ist seltener und hat in der Gruppe der nicht an Moderhinke erkrankten Tiere eine Frequenz von 0,13, bei den moderhinke positiven Schafen eine Frequenz von 0,30. Der homozygote Genotyp TT kommt in beiden Gruppen mit einer Frequenz von 0,02 gleich selten vor (Abb. 4-8).

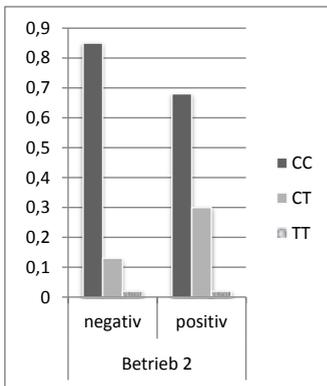


Abb. 4-8: Gegenüberstellung der Genotypen zwischen moderhinke positiven und -negativen Tieren auf Betrieb 2 für den SNP LOR_chip.

4.3.2.4 Allel- und Genotypfrequenzen

LOR_chip

Die untersuchten Tiere der Rassen Graue Gehörnte Heidschnucke und Schwarzköpfiges Fleischschaf sind monomorph für das C-Allel an der Position des SNPs LOR_chip, bei ihnen kommt nur der Genotyp CC vor. Die Bentheimer Landschaft und Coburger Fuchsschafe haben mit 0,61 bzw. 0,67 die niedrigste Frequenz. Merinolandschafe, Merinofleischschafe, die Kreuzungstiere, die Braunen Bergschafe und die Röhnschafe haben sehr ähnliche Frequenzen zwischen 0,86 und 0,97 (Tab. 4-11, Abb. 4-9).

Ergebnisse

Tab. 4-11: Allel- und Genotypfrequenz des SNPs LOR_chip (*call rate 95,6%*).

LOR_chip										
	BBS	BENT	COF	GGH	MFS	MFx ML	ML	MLX	RH	SKF
n	31	31	32	32	94	24	126	273	32	43
C	0,95	0,61	0,67	1,00	0,97	0,88	0,93	0,86	0,80	1,00
T	0,05	0,39	0,33	0,0	0,03	0,13	0,07	0,14	0,20	0,0
CC	0,90	0,42	0,44	1,0	0,95	0,75	0,87	0,74	0,63	1,0
CT	0,10	0,39	0,47	0,0	0,05	0,25	0,12	0,24	0,34	0,0
TT	0,0	0,19	0,09	0,0	0,0	0,0	0,01	0,02	0,03	0,0

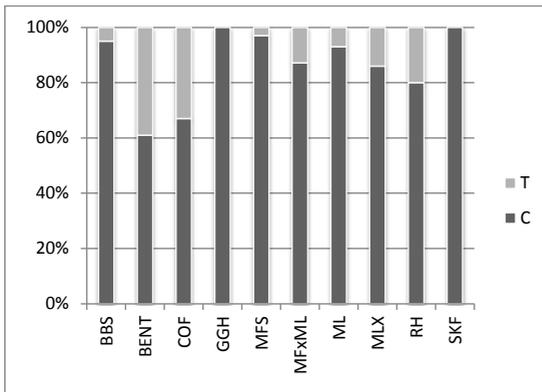


Abb. 4-9: Gegenüberstellung der Allelfrequenzen des SNPs LOR_chip in den einzelnen Rassen.

4.3.3 KGF

4.3.3.1 Ergebnis von χ^2 - und Fisher's Exact Test

Bei der Untersuchungen des KGF-Gens hat der Genotyp an Position SNP KGF_1 auf Betrieb 1 bei der Momentaufnahme einen signifikanten Einfluss ($p = 0,013$ bzw. $p = 0,018$) auf den Moderhinkestatus. Nach Hinzuziehen der Daten aus den Vorjahren und auf den anderen Betrieben ist weder die Genotypfrequenz für KGF_1 noch für KGF_2 signifikant (Tab. 4-12).

Tab. 4-12: Anzahl der moderhinkepositiven und -negativen Schafe bzw. Schafe ohne (nein) und mit (ja) Klauenbehandlung je Betrieb, die Genotypfrequenzen der untersuchten SNPs KGF_1 und KGF_2 sowie die Ergebnisse von χ^2 - und Fisher's Exact Test.

	Status	n	KGF_1			Signifikanz	
			AA	AC	CC	χ^2	Fisher
Betrieb 1 (Moment)	negativ	61	0	0,08	0,92	0,013*	0,018*
	positiv	73	0	0	1,0		
Betrieb 1 (Dauer)	negativ	48	0	0,06	0,94	0,250	0,349
	positiv	86	0	0,02	0,98		
Betrieb 2	negativ	93	0	0,15	0,85	0,181	0,248
	positiv	182	0,01	0,09	0,90		
Betrieb 3	nein	56	0	0,07	0,93	0,314	0,416
	ja	64	0	0,03	0,97		

	Status	n	KGF_2			Signifikanz	
			AA	AG	GG	χ^2	Fisher
Betrieb 1 (Moment)	negativ	51	0,16	0,47	0,37	0,964	1,000
	positiv	58	0,17	0,45	0,38		
Betrieb 1 (Dauer)	negativ	39	0,18	0,54	0,28	0,309	0,306
	positiv	70	0,16	0,41	0,43		
Betrieb 2	negativ	76	0,11	0,46	0,43	0,595	0,599
	positiv	155	0,14	0,40	0,46		
Betrieb 3	nein	49	0,10	0,31	0,59	0,743	0,798
	ja	63	0,06	0,30	0,64		

* = signifikant bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% ($p = 0,05$)

4.3.3.2 Ergebnis der Varianzanalyse

Der SNP KGF_1 hat in der Varianzanalyse auf Basis der Daten von Betrieb 1 und 2 einen signifikanten Einfluss auf den Moderhinkestatus (Tab. 4-13). Dies deckt sich insofern mit den Ergebnissen von χ^2 - und Fisher's Exact Test, da dort Betrieb 1 in der Momentaufnahme ebenfalls eine Signifikanz der Genotypfrequenz für diesen SNP zeigt. Weder Gewicht noch Rasse beeinflussen den Moderhinkestatus signifikant.

Tab. 4-13: Signifikanzniveaus für den Einfluss des Genotyps der SNPs KGF_1 und KGF_2, der Rasse und des Gewichts auf den Moderhinkestatus.

	Genotyp	Rasse	Gewicht
KGF_1	*	n. s.	n. s.
KGF_2	n. s.	n. s.	n. s.

n. s. = nicht signifikant

* = signifikant bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% ($p = 0,05$)

4.3.3.3 Genotypfrequenzen des SNPs KGF_1 auf Betrieb 1

Bei dem SNP KGF_1 kommt der Genotyp AC auf Betrieb 1 in der Momentaufnahme nur in der nicht an Moderhinke erkrankten Gruppe mit einer Frequenz von 0,08 vor. Zieht man die Daten aus den Vorjahren hinzu ändert sich dieses Bild jedoch wieder, der Genotyp AC tritt in beiden Gruppen auf, jedoch in der Gruppe der moderhinke-negativen Tiere mit einer Frequenz von 0,06 häufiger als in der Gruppe der positiven Tiere mit 0,02. Die Verteilung der Genotypen zwischen den erkrankten und gesunden Tieren ist dabei nicht signifikant. Der Genotyp AA kommt nicht vor.

4.3.3.4 Allel- und Genotypfrequenzen

KGF_1

Rhönschafe haben für KGF_1 mit 0,44 die höchste Frequenz für das A-Allel, die Braunen Bergschafe mit 0,21 die zweithöchste, während die restlichen Rassen maximal eine Frequenz von 0,10 haben. Graue Gehörnte Heidschnucken und Merinofleischschafe sind an dieser Position monomorph für Cytosin (Tab. 4-14, Abb. 4-10).

Der heterozygote Genotyp AC kommt mit 87% mit Abstand am häufigsten bei den Merinolandschaf-Kreuzungstieren vor, gefolgt von 50% bei den Rhönschafen und 19% bei den Schwarzköpfigen Fleischschafen. Der Genotyp AA kommt nur bei den Bentheimer Landschafen (0,03), Merinolandschaf-Kreuzungstieren (0,01) und den Rhönschafen (0,19) vor (Tab. 4-14).

Tab. 4-14: Allel- und Genotypfrequenzen des SNPs KGF_1 (*call rate* 95,2%).

		KGF_1									
	BBS	BENT	COF	GGH	MFS	MFx ML	ML	MLX	RH	SKF	
n	29	32	31	32	94	24	127	273	32	42	
A	0,21	0,03	0,02	0,0	0,0	0,02	0,03	0,06	0,44	0,10	
C	0,79	0,97	0,98	1,0	1,0	0,98	0,97	0,94	0,56	0,90	
AA	0,03	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,01	0,19	0,0	
AC	0,35	0,06	0,03	0,0	0,0	0,04	0,06	0,12	0,50	0,19	
CC	0,62	0,94	0,97	1,0	1,0	0,96	0,94	0,87	0,31	0,81	

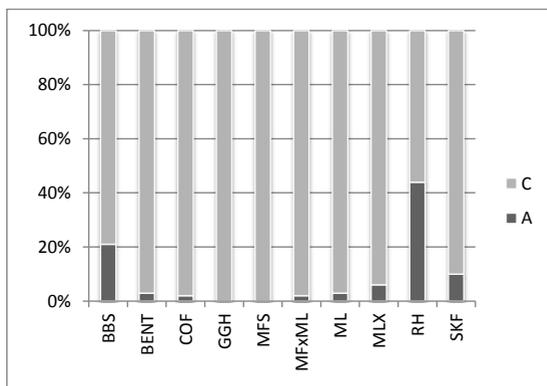


Abb. 4-10: Gegenüberstellung der Allelfrequenzen des SNPs KGF_1 in den einzelnen Rassen.

KGF_2

Die niedrigste Frequenz für das A-Allel haben die Rhönschafe mit 0,08, die Schwarzköpfigen Fleischschafe haben mit 0,49 die höchste. Die restlichen Rassen verteilen sich zwischen diesen beiden Extremen. In der Gruppe der Merino-Schafe ist die Frequenz für das A-Allel in der Rasse Merinofleischschaf mit einer Frequenz von 0,13 niedriger als bei den Merinofleischschaf-Merinolandschaf-Kreuzungstieren (0,31), Merinolandschafen (0,38) und Merinolandschafkreuzungen (0,34) (Tab. 4-15, Abb. 4-11).

Alle Genotypen sind in allen Rassen vertreten, jedoch mit stark variierenden Frequenzen. So kommt der Genotyp AA bei Merinofleischschafen zu 2% vor, bei den Coburger Fuchsschafen zu 47%. Die größten Unterschiede gibt es bei dem Genotyp GG, von 20% bei den Coburger Fuchsschafen bis zu 87% bei den Rhönschafen. Die Rhönschafe haben dahingegen mit 10% die niedrigste Frequenz des Genotyps AG, die Schwarzköpfigen Fleischschafen mit 60% die höchste (Tab. 4-15).

Ergebnisse

Tab. 4-15: Allel- und Genotypfrequenzen des SNPs KGF_2 (*call rate* 83,2%).

KGF_2										
	BBS	BENT	COF	GGH	MFS	MFX ML	ML	MLX	RH	SKF
n	29	30	30	30	87	18	107	229	31	37
A	0,16	0,48	0,63	0,27	0,13	0,31	0,38	0,34	0,08	0,49
G	0,84	0,52	0,37	0,73	0,87	0,69	0,62	0,66	0,92	0,51
AA	0,03	0,27	0,47	0,13	0,02	0,06	0,16	0,13	0,03	0,19
AG	0,24	0,43	0,33	0,27	0,22	0,50	0,44	0,42	0,10	0,60
GG	0,72	0,30	0,20	0,60	0,76	0,44	0,40	0,45	0,87	0,22

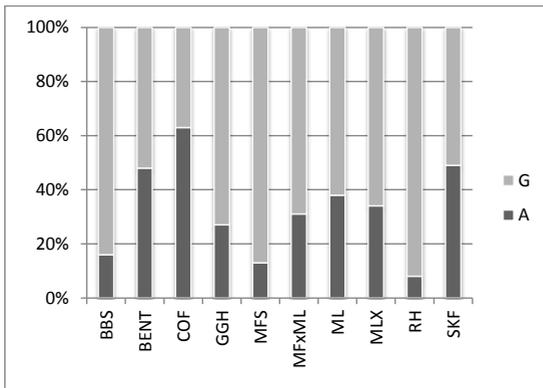


Abb. 4-11: Gegenüberstellung der Allelfrequenzen des SNPs KGF_2 in den einzelnen Rassen.

4.3.4 LAMC2

Von den elf ausgewählten SNPs im LAMC2-Gen konnte nur LAMC2_11 nicht ausgewertet werden.

4.3.4.1 Ergebnis von χ^2 - und Fisher's Exact Test

Bei der Untersuchung der Genotypfrequenzen in der Gruppen der moderhinke-positiven und -negativen Schafe innerhalb der Betriebe 1 und 2 bzw. der Tiere mit Klauenbehandlungen auf Betrieb 3 mittels χ^2 - und des Fisher's Exact Test liegen vier SNPs unterhalb bzw. an der Grenze des Signifikanzniveaus (Tab. 4-16).

Die Frequenz der Genotypen des SNPs LAMC2_1 ist auf Betrieb 1 bei der Momentaufnahme signifikant beim Fisher's Exact Test ($p = 0,046$) bzw. knapp oberhalb des

Signifikanzniveaus im χ^2 -Test ($p = 0,055$). Auf Betrieb 2 liegt dieser SNP ebenfalls nur wenig über der Signifikanzgrenze ($p = 0,06$ bzw. $p = 0,053$). Betrachtet man alle Daten auf Betrieb 1 sinkt die Signifikanz allerdings deutlich ($p = 0,241$ bzw. $0,237$) und befindet sich weit entfernt von der Signifikanzgrenze. Auf Betrieb 3 ist sie ebenfalls nicht signifikant ($p = 0,534$ bzw. $0,539$).

Auf Betrieb 3 gibt es hochsignifikante Unterschiede der Genotypfrequenzen für den SNP TGM1_14 in den beiden Gruppen mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1% ($p = 0,004$). Auf Betrieb 2 ist die Frequenz der Genotypen des SNP nahe an der Signifikanzgrenze ($p = 0,062$ bzw. $0,066$), auf Betrieb 1 jedoch sind die Frequenzunterschiede der Genotypen sowohl in der Momentaufnahme wie auch bei Betrachten aller Daten weit entfernt vom Signifikanzniveau ($p = 0,801$ bzw. $0,833$ und $p = 0,713$ bzw. $0,795$).

Signifikant mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% sind ebenfalls die Genotypfrequenzen des SNP LAMC2_15 auf Betrieb 2 ($p = 0,035$) und Betrieb 3 ($p = 0,012$ bzw. $0,014$). Wie auch LAMC2_14 ist dieser SNP auf Betrieb 1 weder in der Momentaufnahme ($p = 0,7$ bzw. $0,737$) noch bei Einbeziehen aller zur Verfügung stehenden Daten ($p = 0,594$ bzw. $0,631$) signifikant. Genotypfrequenzen knapp an der Signifikanzgrenze hat der SNP LAMC2_18 auf Betrieb 3 ($p = 0,056$ bzw. $0,066$).

Innerhalb der zwei Gruppen der Tiere mit bzw. ohne Klauenbehandlung im Untersuchungszeitraum auf Betrieb 3 ist die Genotypfrequenz des SNP LAMC2_48 in den beiden Gruppen signifikant ($p = 0,037$ bzw. $0,019$). Für die Tiere mit bzw. ohne Moderhinkeinfektion auf Betrieb 1 und 2 ist die Genotypfrequenz in den beiden Gruppen jedoch nicht signifikant.

Die Genotypfrequenzen der übrigen SNPs LAMC2_42, LAMC2_4, LAMC2_23, LAMC2_51 und LAMC2_30 waren auf keinem der Betriebe signifikant.

Ergebnisse

Tab. 4-16: Anzahl der moderhinkepositiven und -negativen Schafe bzw. Schafe ohne (nein) und mit (ja) Klauenbehandlung je Betrieb, die Genotypfrequenzen der untersuchten SNPs LAMC2_1, LAMC2_42, LAMC2_4, LAMC2_14, LAMC2_15, LAMC2_18, LAMC2_23, LAMC2_48, LAMC2_51 und LAMC2_30 sowie die Ergebnisse von χ^2 - und Fisher's Exact Test.

	Status	n	LAMC2_1			Signifikanz	
			CC	CT	TT	χ^2	Fisher
Betrieb 1 (Moment)	negativ	60	0,57	0,37	0,07	0,055	0,046*
	positiv	69	0,70	0,30	0		
Betrieb 1 (Dauer)	negativ	47	0,64	0,30	0,06	0,241	0,237
	positiv	82	0,63	0,35	0,01		
Betrieb 2	negativ	92	0,51	0,43	0,05	0,060	0,053
	positiv	178	0,44	0,41	0,15		
Betrieb 3	nein	56	0,52	0,41	0,07	0,534	0,549
	ja	65	0,62	0,34	0,05		

	Status	n	LAMC2_42			Signifikanz	
			GG	GT	TT	χ^2	Fisher
Betrieb 1 (Moment)	negativ	59	0,32	0,51	0,17	0,205	0,204
	positiv	69	0,41	0,52	0,07		
Betrieb 1 (Dauer)	negativ	47	0,34	0,51	0,15	0,675	0,658
	positiv	81	0,38	0,52	0,10		
Betrieb 2	negativ	91	0,18	0,59	0,23	0,148	0,161
	positiv	175	0,25	0,47	0,28		
Betrieb 3	nein	55	0,33	0,54	0,13	0,138	0,137
	ja	66	0,50	0,38	0,12		

	Status	n	LAMC2_4			Signifikanz	
			CC	CT	TT	χ^2	Fisher
Betrieb 1 (Moment)	negativ	61	0,10	0,46	0,44	0,835	0,855
	positiv	72	0,12	0,42	0,46		
Betrieb 1 (Dauer)	negativ	48	0,13	0,48	0,40	0,629	0,600
	positiv	85	0,11	0,41	0,48		
Betrieb 2	negativ	93	0,18	0,59	0,23	0,257	0,254
	positiv	182	0,18	0,50	0,32		
Betrieb 3	nein	56	0,05	0,21	0,73	0,541	0,570
	ja	65	0,09	0,16	0,75		

		LAMC2_14				Signifikanz	
	Status	n	CC	CT	TT	χ^2	Fisher
Betrieb 1 (Moment)	negativ	59	0,41	0,47	0,12	0,801	0,833
	positiv	70	0,37	0,47	0,16		
Betrieb 1 (Dauer)	negativ	47	0,40	0,49	0,11	0,713	0,795
	positiv	82	0,38	0,46	0,16		
Betrieb 2	negativ	94	0,34	0,56	0,10	0,062	0,066
	positiv	176	0,39	0,43	0,18		
Betrieb 3	nein	55	0,13	0,54	0,33	0,004**	0,004**
	ja	66	0,15	0,26	0,59		

		LAMC2_15				Signifikanz	
	Status	n	AA	AT	TT	χ^2	Fisher
Betrieb 1 (Moment)	negativ	57	0,40	0,47	0,13	0,700	0,737
	positiv	68	0,37	0,45	0,18		
Betrieb 1 (Dauer)	negativ	45	0,42	0,47	0,11	0,594	0,631
	positiv	80	0,36	0,46	0,18		
Betrieb 2	negativ	82	0,35	0,55	0,10	0,035*	0,035*
	positiv	156	0,38	0,40	0,22		
Betrieb 3	nein	46	0,15	0,46	0,39	0,012*	0,014*
	ja	56	0,11	0,21	0,68		

		LAMC2_18				Signifikanz	
	Status	n	CC	CT	TT	χ^2	Fisher
Betrieb 1 (Moment)	negativ	59	0,15	0,53	0,32	0,831	0,852
	positiv	69	0,12	0,55	0,33		
Betrieb 1 (Dauer)	negativ	47	0,15	0,55	0,30	0,827	0,789
	positiv	81	0,12	0,53	0,35		
Betrieb 2	negativ	93	0,11	0,51	0,39	0,962	0,983
	positiv	177	0,12	0,50	0,38		
Betrieb 3	nein	55	0,05	0,24	0,71	0,056	0,066
	ja	66	0,12	0,09	0,79		

		LAMC2_23				Signifikanz	
	Status	n	AA	AG	GG	χ^2	Fisher
Betrieb 1 (Moment)	negativ	59	0,15	0,53	0,32	0,831	0,852
	positiv	69	0,12	0,55	0,33		
Betrieb 1 (Dauer)	negativ	47	0,15	0,55	0,30	0,827	0,789
	positiv	81	0,12	0,53	0,35		
Betrieb 2	negativ	93	0,06	0,39	0,55	0,181	0,174
	positiv	177	0,06	0,50	0,44		
Betrieb 3	nein	55	0,02	0,16	0,82	0,363	0,388
	ja	66	0,05	0,09	0,86		

Ergebnisse

		LAMC2_48				Signifikanz	
	Status	n	AA	AG	GG	χ^2	Fisher
Betrieb 1 (Moment)	negativ	59	0,12	0,53	0,36	0,641	0,629
	positiv	70	0,07	0,57	0,36		
Betrieb 1 (Dauer)	negativ	47	0,13	0,51	0,36	0,557	0,541
	positiv	82	0,07	0,57	0,35		
Betrieb 2	negativ	90	0,07	0,59	0,34	0,153	0,172
	positiv	178	0,12	0,48	0,40		
Betrieb 3	nein	55	0,02	0,38	0,60	0,037*	0,019*
	ja	66	0	0,20	0,80		

		LAMC2_51				Signifikanz	
	Status	n	AA	AG	GG	χ^2	Fisher
Betrieb 1 (Moment)	negativ	60	0,07	0,52	0,42	0,982	1,000
	positiv	72	0,07	0,50	0,43		
Betrieb 1 (Dauer)	negativ	47	0,06	0,49	0,45	0,925	0,958
	positiv	85	0,07	0,52	0,41		
Betrieb 2	negativ	93	0,06	0,40	0,54	0,557	0,563
	positiv	179	0,10	0,41	0,49		
Betrieb 3	nein	56	0,32	0,46	0,21	0,666	0,697
	ja	65	0,37	0,48	0,15		

		LAMC2_30				Signifikanz	
	Status	n	AA	GA	GG	χ^2	Fisher
Betrieb 1 (Moment)	negativ	59	0	0,03	0,97	0,768	1,000
	positiv	68	0	0,04	0,96		
Betrieb 1 (Dauer)	negativ	47	0	0,04	0,96	0,888	1,000
	positiv	80	0	0,04	0,96		
Betrieb 2	negativ	88	0,01	0,77	0,22	0,926	0,886
	positiv	169	0,01	0,79	0,20		
Betrieb 3	nein	52	0,02	0,08	0,90	0,529	0,616
	ja	61	0,05	0,11	0,84		

* = signifikant bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% ($p = 0,05$)

** = signifikant bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1% ($p = 0,01$)

4.3.4.2 Ergebnis der Varianzanalyse

Bei der Varianzanalyse zur Untersuchung der fixen Effekte Genotyp, Rasse (ML, MFxML, MLX) und Gewicht auf den Moderhinkstatus hatte nur der Genotyp des SNP LAMC2_15 mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% einen signifikanten Einfluss auf eine mögliche Moderhinkeerkrankung. Weder Rasse noch Gewicht hatten einen signifikanten Einfluss (Tab. 4-17).

Die Frequenz des Genotyps für den SNP LAMC2_15 war bereits bei χ^2 - und Fisher's Exact Test auf Betrieb 2 ($p = 0,035$) und Betrieb 3 ($p = 0,012$ bzw. $0,014$) signifikant jedoch nicht auf Betrieb 1.

Tab. 4-17: Signifikanzniveaus für den Einfluss des Genotyps der SNPs LAMC2_1, LAMC2_42, LAMC2_4, LAMC2_14, LAMC2_15, LAMC2_18, LAMC2_23, LAMC2_48, LAMC2_51 und LAMC2_30, der Rasse und des Gewichts auf den Moderhinkestatus.

	Genotyp	Rasse	Gewicht
LAMC2_1	n. s.	n. s.	n. s.
LAMC2_42	n. s.	n. s.	n. s.
LAMC2_4	n. s.	n. s.	n. s.
LAMC2_14	n. s.	n. s.	n. s.
LAMC2_15	*	n. s.	n. s.
LAMC2_18	n. s.	n. s.	n. s.
LAMC2_23	n. s.	n. s.	n. s.
LAMC2_48	n. s.	n. s.	n. s.
LAMC2_51	n. s.	n. s.	n. s.
LAMC2_30	n. s.	n. s.	n. s.

n. s. = nicht signifikant

* = signifikant bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% ($p = 0,05$)

4.3.4.3 Genotypfrequenzen signifikanter SNPs auf den Betrieben

Bei den nicht an Moderhinke erkrankten Tieren ist an der Position des SNPs LAMC2_1 auf Betrieb 1 bei der Momentaufnahme vermehrt der homozygote Genotyp TT mit einer Frequenz von 0,06 und der heterozygote Genotyp CT mit einer Frequenz von 0,37 vertreten, bei den moderhinkekranken Schafen waren die Frequenzen 0,0 bzw. 0,30 (Abb. 4-12). Auch wenn die Daten aus den Vorjahren hinzugezogen werden, kommt der Genotyp TT häufiger bei den gesunden (0,6) als bei den erkrankten Tieren (0,01) vor, allerdings ist dieser Unterschied nicht signifikant. Auf Betrieb 2, dessen Genotypfrequenzen knapp an der Signifikanzgrenze liegen, ist der homozygote Genotyp TT (0,15) in der Gruppe der moderhinkekranken Tiere um rund 10 Prozentpunkte höher als in der Gruppe der nicht erkrankten Schafe (0,05). Die Frequenzen der Genotypen CC liegen bei 0,51 bei den negativen und 0,44 bei den positiven Schafen, der Genotyp CT hat bei den nicht erkrankten Schafen eine Frequenz von 0,44 und bei den positiven Tieren 0,41.

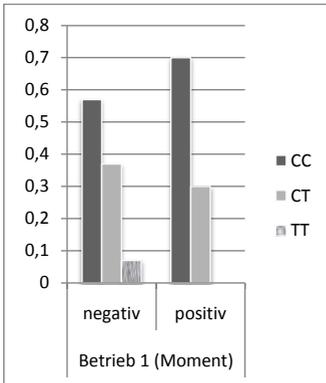


Abb. 4-12: Gegenüberstellung der Genotypen zwischen moderhinkepositiven und -negativen Tieren auf Betrieb 1 bei der Momentaufnahme für den SNP LAMC2_1.

Eine hochsignifikante Frequenz der Genotypen für den SNP LAMC2_14 ergibt sich auf Betrieb 3. In der Gruppe der Tiere, die im Beobachtungszeitraum nie an den Klauen behandelt wurden tritt der Genotyp CT vermehrt und als der mit Abstand häufigste Genotyp auf (Frequenz 0,54). Bei den Tieren mit mindestens einer Klauenbehandlung ist er der zweithäufigste Genotyp und liegt mit einer Frequenz von 0,26 um 28 Prozentpunkte unter der Gruppe der nicht behandelten Schafe. Bei den Tieren mit Klauenbehandlung ist der Genotyp TT am häufigsten vertreten (Frequenz 0,59), bei den nicht behandelten Tieren liegt er bei 0,33. Der Genotyp CC ist in beiden Gruppen fast gleich häufig, 0,13 bei in der Gruppe der nicht behandelten und 0,15 bei den behandelten Schafen (Abb. 4-13).

Auch auf Betrieb 2 sind die Unterschiede in der Nähe der Signifikanzgrenze. In der Gruppe der moderhinkenegativen Tiere ist der Genotyp TT seltener (0,10) als in der Gruppe der moderhinkepositiven Tiere (0,18) vertreten. Der heterozygote Genotyp CT ist bei den nicht erkrankten Schafen häufiger (0,56) als bei den erkrankten Tieren (0,43).

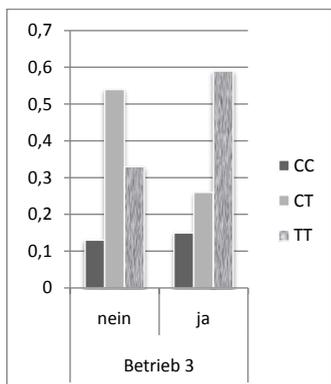


Abb. 4-13: Gegenüberstellung der Genotypen zwischen Tieren mit Klauenbehandlung und ohne auf Betrieb 3 für den SNP LAMC2_14.

Sowohl auf Betrieb 2 als auch auf Betrieb 3 ergeben sich signifikante Unterschiede in den Genotypfrequenzen der moderhinkepositiven und negativen bzw. der an den Klauen behandelten und nicht behandelten Tiere für den SNP LAMC2_15.

Bei beiden Betrieben ist in der Gruppe der nicht erkrankten der Genotyp AT häufiger vertreten (0,55 bzw. 0,46). Der heterozygote Genotyp TT wiederum tritt vermehrt bei den erkrankten Tieren auf, in der Gruppe der moderhinkenegativen Schafe mit einer Frequenz von 0,22 und bei den Tieren mit Klauenbehandlung mit einer Frequenz von 0,68. Der homozygote Genotyp AA verhält sich auf den Betrieben jeweils gegenläufig. So ist er auf Betrieb 2 in der Gruppe der moderhinkekranken Tieren (0,38) geringfügig höher als in der Gruppe der gesunden (0,35). Auf Betrieb 2 ist er in der Gruppe der an den Klauen behandelten Schafe (0,11) niedriger als in der nicht behandelten Gruppe (0,15). Auf beiden Betrieben unterscheiden sich die Gruppen kaum in der Frequenz des AA-Genotyps (Abb. 4-14).

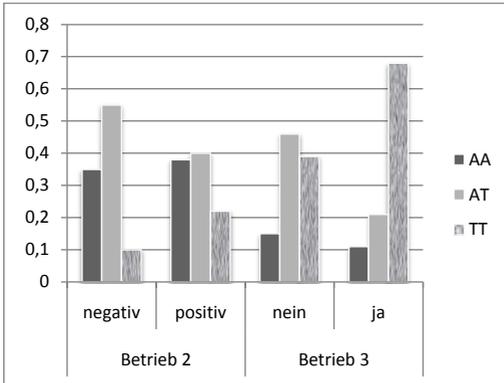


Abb. 4-14: Gegenüberstellung der Genotypen zwischen moderhinkepositiven und -negativen Tieren in Betrieb 2 und Tieren mit und ohne Klauenbehandlung auf Betrieb 3 für den SNP LAMC2_15.

Der SNP LAMC2_48 hat auf Betrieb 3 bei χ^2 - und bei Fisher's Exact Test eine signifikant unterschiedliche Genotypfrequenz mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5%. Bei den Tieren mit Klauenbehandlung tritt der Genotyp AA mit einer Frequenz von 0,02 auf. Bei den Tieren, die im Untersuchungszeitraum nicht an den Klauen behandelt wurden kommt er nicht vor. Auch der homozygote Genotyp GG ist bei der Gruppe der behandelten Tiere mit 0,8 um 20 Prozentpunkte höher als in der Vergleichsgruppe, der Genotyp GG ist in beiden Gruppen der häufigste (Abb. 4-15).

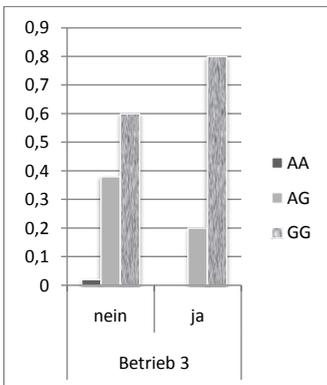


Abb. 4-15: Gegenüberstellung der Genotypen zwischen Tieren mit Klauenbehandlung und ohne auf Betrieb 3 für den SNP LAMC2_48.

4.3.4.4 Allel- und Genotypfrequenzen

LAMC2_1

Bei der Genotypisierung des LAMC2_1 SNPs haben die Grauen Gehörnten Heidschnucken mit 0,39 die deutlich niedrigste Frequenz für das C-Allel im Vergleich zu den übrigen Rassen. Die zweitniedrigste Frequenz haben die Bentheimer Landschaft (0,53) während die restlichen Rassen Werte zwischen 0,67 und 0,92 aufweisen (Tab. 4-18, Abb. 4-16).

Der homozygote Genotyp TT tritt in der Population der Bentheimer Landschaft und Coburger Fuchsschafe nicht auf. Bei den Merinoschafnrassen und bei den Schwarzköpfigen Fleischschafen hat er maximal eine Frequenz von 5%. Nur bei den Bentheimer Landschaften (0,56) und Grauen Gehörnten Heidschnucken (0,45) ist der Genotyp CT der häufigste, bei allen übrigen Rassen ist CC am häufigsten (Tab. 4-18).

Tab. 4-18: Allel- und Genotypfrequenzen des SNPs LAMC2_1 (*call rate 94,4%*).

LAMC2_1										
	BBS	BENT	COF	GGH	MFS	MFx ML	ML	MLX	RH	SKF
n	31	32	32	31	94	23	123	268	32	43
C	0,87	0,53	0,92	0,39	0,76	0,76	0,81	0,67	0,75	0,80
T	0,13	0,47	0,08	0,61	0,24	0,24	0,19	0,33	0,25	0,20
CC	0,74	0,25	0,84	0,16	0,56	0,57	0,65	0,46	0,53	0,65
CT	0,26	0,56	0,16	0,45	0,38	0,39	0,33	0,42	0,44	0,30
TT	0,0	0,19	0,0	0,39	0,05	0,04	0,02	0,12	0,03	0,05

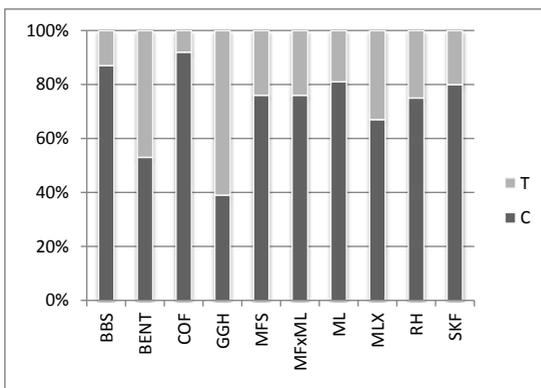


Abb. 4-16: Gegenüberstellung der Allelfrequenzen des SNPs LAMC2_1 in den einzelnen Rassen.

LAMC2_42

Die Werte der Allelfrequenzen bewegen sich zwischen der niedrigsten Frequenz für das G-Allel bei den Bentheimer Landschafen mit 0,47 und der höchsten bei den Merinofleischschafen mit 0,73 (Tab. 4-19, Abb. 4-17).

Der Genotyp GG ist nur bei den Grauen Gehörnten Heidschnucken und den Merinofleischschafen mit jeweils 52% der häufigste. Bei den übrigen untersuchten Rassen ist der heterozygote Genotyp GT am häufigsten vertreten. Der TT-Genotyp ist bei Bentheimer Landschafen (0,25), Merinolandschaf-Kreuzungen (0,27) und Schwarzköpfigen Fleischschafen (0,30) am zweithäufigsten vertreten (Tab. 4-19).

Tab. 4-19: Allel- und Genotypfrequenzen des SNPs LAMC2_42 (*call rate* 93,5%).

LAMC2_42										
	BBS	BENT	COF	GGH	MFS	MFx ML	ML	MLX	RH	SKF
n	31	32	31	31	94	23	122	264	32	43
G	0,68	0,47	0,55	0,69	0,73	0,59	0,64	0,48	0,56	0,41
T	0,32	0,53	0,45	0,31	0,27	0,41	0,35	0,52	0,44	0,59
GG	0,42	0,19	0,19	0,52	0,52	0,35	0,40	0,22	0,31	0,12
GT	0,52	0,56	0,71	0,36	0,42	0,48	0,50	0,52	0,50	0,58
TT	0,06	0,25	0,10	0,13	0,06	0,17	0,10	0,27	0,19	0,30

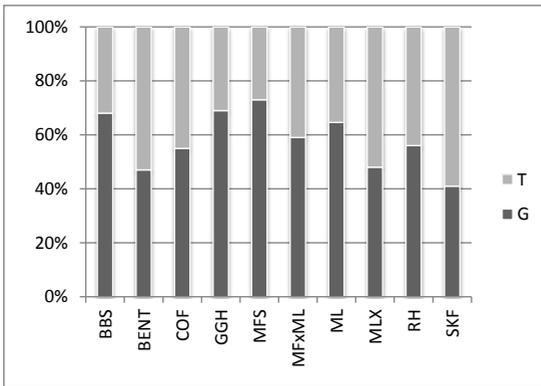


Abb. 4-17: Gegenüberstellung der Allelfrequenzen des SNPs LAMC2_42 in den einzelnen Rassen.

LAMC2_4

Die Frequenzen für das C-Allel bewegen sich zwischen 0,05 bei den Merinofleischschafen und 0,47 bei den Schwarzköpfigen Fleischschafen (Tab. 4-20, Abb. 4-18).

Der Genotyp CC kommt in der Population der Merinofleischschafe nicht vor, die höchste Frequenz hat er bei den Schwarzköpfigen Fleischschafen (0,23). Auch der heterozygote Genotyp CT hat von allen Rassen die niedrigste Frequenz bei den Merinofleischschafen (0,10), bei welchen 90% den Genotyp TT haben. Die höchste Frequenz für den CT-Genotyp haben die Bentheimer Landschaft mit 59%. Auch bei Coburger Fuchschafen, Grauen Gehörnten Heidschnucken, Merinolandschaf-Kreuzungen und Rhönschafen ist er mit über 50% vertreten und ist damit in diesen Rassen der jeweils häufigste Genotyp (Tab. 4-20).

Tab. 4-20: Allel- und Genotypfrequenzen des SNPs LAMC2_4 (*call rate 95,7%*).

LAMC2_4										
	BBS	BENT	COF	GGH	MFS	MFx ML	ML	MLX	RH	SKF
n	31	32	32	32	94	24	126	273	32	43
C	0,16	0,39	0,36	0,28	0,05	0,21	0,33	0,45	0,38	0,47
T	0,84	0,61	0,64	0,72	0,95	0,79	0,67	0,55	0,63	0,53
CC	0,0	0,09	0,09	0,03	0,0	0,04	0,11	0,18	0,13	0,23
CT	0,32	0,59	0,53	0,50	0,10	0,33	0,44	0,54	0,50	0,47
TT	0,68	0,31	0,38	0,47	0,90	0,63	0,45	0,29	0,38	0,30

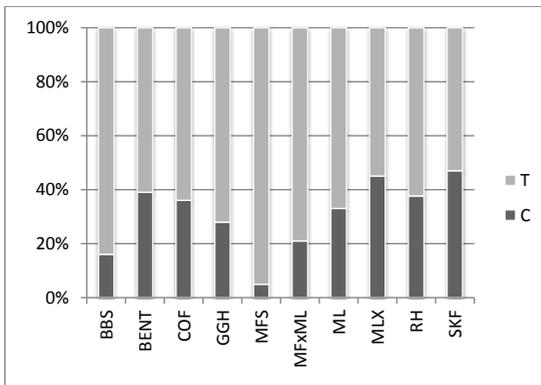


Abb. 4-18: Gegenüberstellung der Allelfrequenzen des SNPs LAMC2_4 in den einzelnen Rassen.

LAMC2_11

Der SNP LAMC2_11 hatte bei der Genotypisierung eine *call rate* von 0% und konnte deswegen nicht ausgewertet werden.

LAMC2_14

Die Frequenzen für das C-Allel bewegen sich für alle Rassen zwischen 0,21 und 0,73. Die niedrigste Frequenz für Cytosin haben die Merinofleischschafe mit 0,21, die höchste die Bentheimer Landschaft mit 0,73. Bei den Braunen Bergschafen haben beide Allele eine Frequenz von 0,5. Ebenso verhält es sich bei den Merinolandschaf-Merinofleischschaf-Kreuzungstieren, welche damit zwischen den Frequenzen von Merinofleischschafen (C-Allel 0,21) und Merinolandschafen (C-Allel 0,64) liegen (Tab. 4-21, Abb. 4-19).

Der CC-Genotyp ist mit 2% bei den Merinofleischschafen am niedrigsten und mit 55% bei den Bentheimer Landschaften am häufigsten vertreten. Der Genotyp TT kommt mit 7% am seltensten bei den Schwarzköpfigen Fleischschafen vor. Die höchste Frequenz hat er bei den Merinofleischschafen mit 60%. Die Unterschiede im Auftreten des heterozygoten Genotyps CT zwischen den Rassen sind mit maximal 19 Prozentpunkten niedriger als in den beiden homozygoten Genotypen (Tab. 4-21).

Tab. 4-21: Allel- und Genotypfrequenzen des SNPs LAMC2_14 (*call rate* 94,4%).

LAMC2_14										
	BBS	BENT	COF	GGH	MFS	MFx ML	ML	MLX	RH	SKF
n	32	31	31	32	94	23	123	268	32	43
C	0,50	0,73	0,63	0,39	0,21	0,50	0,64	0,61	0,42	0,71
T	0,50	0,27	0,37	0,61	0,79	0,50	0,36	0,39	0,58	0,29
CC	0,31	0,55	0,39	0,09	0,02	0,22	0,41	0,37	0,16	0,49
CT	0,38	0,36	0,48	0,59	0,38	0,57	0,46	0,48	0,53	0,44
TT	0,31	0,10	0,13	0,31	0,60	0,22	0,13	0,15	0,31	0,07

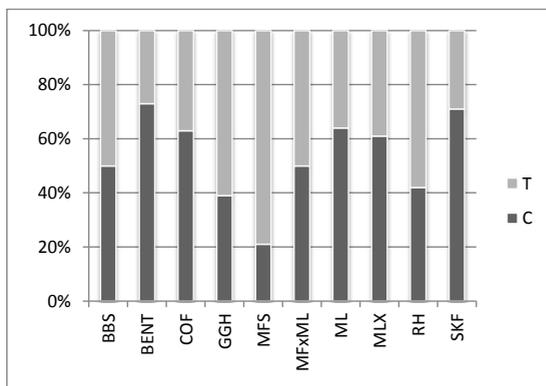


Abb. 4-19: Gegenüberstellung der Allelfrequenzen des SNPs LAMC2_14 in den einzelnen Rassen.

LAMC2_15

Bei der Genotypisierung haben Merinofleischschafe mit 0,19 die niedrigste Frequenz für das A-Allel. Die höchste Frequenz haben die Schwarzköpfigen Fleischschafe mit 0,70 und die Bentheimer Landschafe mit 0,72. Bei den Merinolandschaf-Merinofleischschaf-Kreuzungstieren kommen beide Alle mit jeweils 0,5 gleich häufig vor (Tab. 4-22, Abb. 4-20).

Bei Merinolandschaf-Merinofleischschaf-Kreuzungstieren treten die beiden homozygoten Genotypen jeweils bei 22% der untersuchten Tiere auf. Die Verteilung innerhalb der Rassen Bentheimer Landschaf und Schwarzköpfiges Fleischschaf sind annähernd gleich. Bei beiden kommt der Genotyp TT mit 9% am seltensten vor, die Genotypen AA und AT fast gleich häufig. Bei den Merinofleischschafen tritt der Genotyp AA in 2% der Population auf, der Genotyp TT bei 65% (Tab. 4-22).

Tab. 4-22: Allel- und Genotypfrequenzen des SNPs LAMC2_15 (*call rate 89,6%*).

LAMC2_15										
	BBS	BENT	COF	GGH	MFS	MFx ML	ML	MLX	RH	SKF
n	25	32	30	31	85	23	119	236	32	31
A	0,38	0,72	0,62	0,39	0,19	0,50	0,63	0,60	0,42	0,70
T	0,62	0,28	0,38	0,61	0,81	0,50	0,37	0,40	0,58	0,30
AA	0,16	0,54	0,40	0,10	0,02	0,22	0,40	0,37	0,16	0,50
AT	0,44	0,37	0,43	0,58	0,33	0,57	0,45	0,46	0,53	0,41
TT	0,40	0,09	0,17	0,32	0,65	0,22	0,14	0,17	0,31	0,09

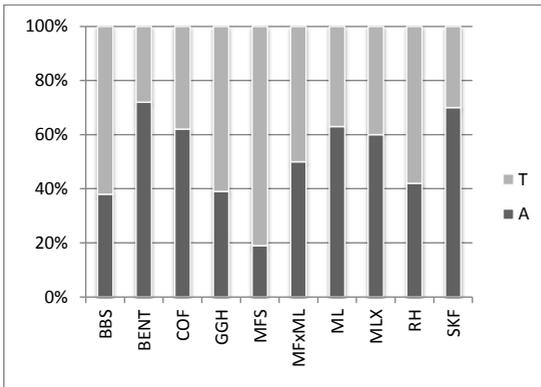


Abb. 4-20: Gegenüberstellung der Allelfrequenzen des SNPs LAMC2_15 in den einzelnen Rassen.

LAMC2_18

Die Allelfrequenzen der einzelnen Rassen variieren von 0,04 für das C-Allel bei den Merinofleischschafen bis zu 0,69 für dasselbe Allel bei den Bentheimer Landschaften. Die Braunen Bergschafe haben die gleiche Allelverteilung wie die Merinolandschafe mit 0,42 für das C-Allel. Die Merinolandschaf-Merinofleischschaf-Kreuzungstiere befinden sich mit ihrer Allelfrequenz (C = 0,26) zwischen den Frequenzen der Merinofleischschafe (0,04) und -landschafe (0,42) (Tab. 4-23, Abb. 4-21).

Die Verteilung der Genotypen ist in den Rassen Graue Gehörnte Heidschnucke und Rhönschaf sowie den Kreuzungstieren aus Merinolandschaf mit Merinofleischschaf fast identisch. Bei allen ist der CC-Genotyp mit 3-4% am seltensten, der Genotyp TT (56%, 52% und 63%) am häufigsten vertreten. Bei den Merinofleischschafen kommt mit 94% fast ausschließlich der TT-Genotyp vor. Am seltensten ist dieser Genotyp bei

den Bentheimer Landschafen (9%). Bei ihnen kommt der CC-Genotyp mit 47% am häufigsten innerhalb der Population wie auch im Vergleich mit den anderen Rassen vor. Der heterozygote Genotyp CT kommt bei allen betrachteten Rassen mit 40-50% vor, eine Ausnahme bilden nur die Merinofleischschafe, wo er nur bei 5% der untersuchten Tiere auftritt (Tab. 4-23).

Tab. 4-23: Allel- und Genotypfrequenzen des SNPs LAMC2_18 (call rate 94,3%).

LAMC2_18										
	BBS	BENT	COF	GGH	MFS	MFx ML	ML	MLX	RH	SKF
n	32	32	31	32	94	23	122	268	32	43
C	0,42	0,69	0,60	0,23	0,04	0,26	0,42	0,37	0,20	0,55
T	0,58	0,31	0,40	0,77	0,96	0,74	0,58	0,63	0,80	0,45
CC	0,22	0,47	0,36	0,03	0,01	0,04	0,16	0,12	0,03	0,30
CT	0,41	0,44	0,48	0,41	0,05	0,44	0,53	0,50	0,34	0,49
TT	0,38	0,09	0,16	0,56	0,94	0,52	0,32	0,38	0,63	0,21

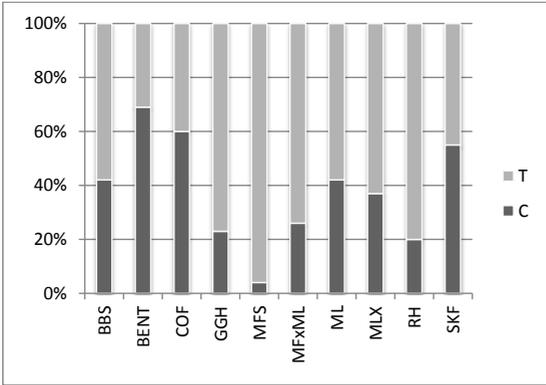


Abb. 4-21: Gegenüberstellung der Allelfrequenzen des SNPs LAMC2_18 in den einzelnen Rassen.

LAMC2_23

An der Position des SNPs LAMC2_23 variiert die Frequenz für das A-Allel von 0,69 bei den Bentheimer Landschafen bis 0,03 bei den Merinofleischschafen. Bei den Braunen Bergschafen, Coburger Fuchsschafen und Merinolandschafen treten beide Allele mit annähernd derselben Frequenz auf (Tab. 4-24, Abb. 4-22).

Ergebnisse

Der homozygote Genotyp AA kommt bei den Merinofleischschafen nicht vor. Bei den Bentheimer Landschaften ist er mit 47% sowohl innerhalb der Rasse wie auch beim Vergleich aller Rassen am häufigsten. Bei der Verteilung der Genotypfrequenzen bilden die Merinofleischschafe, die mit 94% fast homozygot für den GG-Genotyp sind eine Ausnahme. Bei den übrigen Rassen und Kreuzungstieren ist der Genotyp AG mit durchschnittlich 42% vertreten. Der Genotyp GG schwankt von 9% bei den Bentheimer Landschaften bis zu 63% bei den Rhönschafen (Tab. 4-24).

Tab. 4-24: Allel- und Genotypfrequenzen des SNPs LAMC2_23 (*call rate 94,4%*).

LAMC2_23										
	BBS	BENT	COF	GGH	MFS	MFX ML	ML	MLX	RH	SKF
n	32	32	32	32	94	22	123	268	32	42
A	0,42	0,69	0,56	0,23	0,03	0,27	0,41	0,29	0,20	0,26
G	0,58	0,31	0,44	0,77	0,97	0,73	0,59	0,71	0,80	0,74
AA	0,22	0,47	0,28	0,03	0,0	0,5	0,15	0,06	0,03	0,10
AG	0,41	0,44	0,56	0,41	0,06	0,46	0,42	0,46	0,34	0,33
GG	0,38	0,09	0,16	0,56	0,94	0,50	0,33	0,47	0,63	0,57

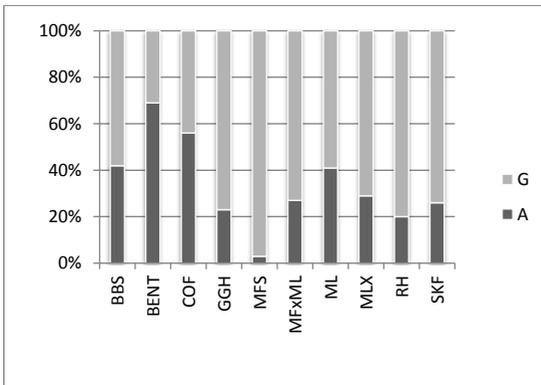


Abb. 4-22: Gegenüberstellung der Allelfrequenzen des SNPs LAMC2_23 in den einzelnen Rassen.

LAMC2_48

Die Allelfrequenzen des SNP LAMC2_48 schwanken um bis zu 34% zwischen den Rassen. Die niedrigste Frequenz für das A-Allel haben die Schwarzköpfigen Fleischschafe (0,07), die Höchste haben die Merinofleischschaf-Merinolandschaft-

Kreuzungstiere (0,41). Braune Bergschafe, Bentheimer Landschaft, Coburger Fuchsschafe, Merinolandschafe, Rhönschafe sowie die beiden Merinoschaf-Kreuzungen haben annähernd die gleich Verteilung für das A-Allel von 0,30 bis 0,39. Die Grauen Gehörnten Heidschnucken, Merinofleischschafe und Schwarzköpfigen Fleischschafe haben eine deutlich geringere Frequenz des A-Allels mit 0,16, 0,18 bzw. 0,07 (Tab. 4-25, Abb. 4-23).

Bei den Braunen Bergschafen hat die Hälfte der Tiere den GG-Genotyp, bei den Coburger Fuchsschafen und Merinolandschafen den AG-Genotyp. Der AA-Genotyp kommt bei den Schwarzköpfigen Fleischschafen und den Grauen Gehörnten Heidschnucken nicht vor. Die höchste Frequenz hat er bei den Merinofleischschaf-Merinolandschaf-Kreuzungstieren mit 13% (Tab. 4-25).

Tab. 4-25: Allel- und Genotypfrequenzen des SNPs LAMC2_48 (call rate 94,4%).

LAMC2_48										
	BBS	BENT	COF	GGH	MFS	MFxML	ML	MLX	RH	SKF
n	32	32	32	32	94	23	123	266	32	43
A	0,30	0,39	0,34	0,16	0,18	0,41	0,33	0,36	0,31	0,07
G	0,70	0,61	0,66	0,84	0,82	0,59	0,67	0,64	0,69	0,93
AA	0,09	0,09	0,09	0,0	0,01	0,13	0,08	0,10	0,09	0,0
AG	0,41	0,59	0,50	0,31	0,34	0,57	0,50	0,52	0,44	0,14
GG	0,50	0,31	0,41	0,69	0,65	0,30	0,42	0,38	0,47	0,86

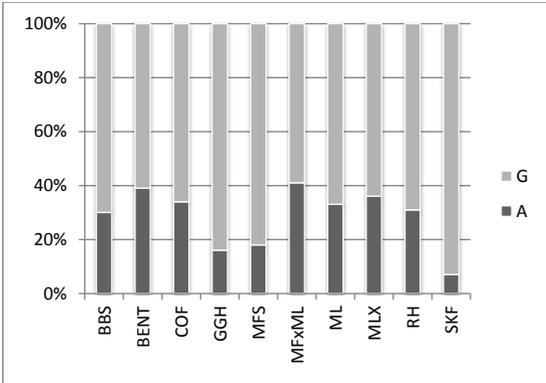


Abb. 4-23: Gegenüberstellung der Allelfrequenzen des SNPs LAMC2_48 in den einzelnen Rassen.

LAMC2_51

Bei dem SNP LAMC2_51 haben die Bentheimer Landschaft die niedrigste Frequenz für Adenin mit 0,19, wohingegen die Merinofleischschafe mit 0,66 die höchste Frequenz aufweisen. Die Allele sind bei Grauen Gehörnten Heidschnucken und Rhönschafen in etwa gleich häufig, mit einer Frequenz des A-Allels von 0,45 bzw. 0,47 (Tab. 4-26, Abb. 4-24).

Der Genotyp AA spielt bei den Bentheimer Landschaften (0%), Braunen Bergschafen (3%), Coburger Fuchsschafen (3%) und Merinolandschafen sowie deren Kreuzungen (jeweils 9%) nur eine untergeordnete Rolle. Bei den Merinofleischschafen ist er mit 40% knapp der Zweithäufigste. Die Merinofleischschafe haben als einzige nur bei 7% den GG-Genotyp und liegen 15 Prozentpunkte unter der nächsthöheren Frequenz für diesen Genotyp bei den Merinolandschaf-Merinofleischschaf-Kreuzungstieren. Die höchste Frequenz für den Genotyp GG haben die Bentheimer Landschaft mit 63%, gefolgt von den Braunen Bergschafen (58%), Merinolandschaf-Kreuzungstieren (51%) und Coburger Fuchsschafen (50%). Die Hälfte der Rhönschafe hat den heterozygoten Genotyp AG. Auch bei den Coburger Fuchsschafen, Grauen Gehörnten Heidschnucken, Merinofleisch- und Merinolandschafen hat jeweils circa die Hälfte der untersuchten Tiere diesen Genotyp (Tab. 4-26).

Tab. 4-26: Allel- und Genotypfrequenzen des SNPs LAMC2_51 (*call rate 95,2%*).

LAMC2_51										
	BBS	BENT	COF	GGH	MFS	MFx ML	ML	MLX	RH	SKF
n	31	32	32	32	94	23	126	270	32	43
A	0,23	0,19	0,27	0,45	0,66	0,43	0,33	0,29	0,47	0,35
G	0,77	0,81	0,73	0,55	0,34	0,57	0,67	0,71	0,53	0,65
AA	0,03	0,0	0,03	0,19	0,40	0,09	0,09	0,09	0,22	0,19
AG	0,39	0,38	0,47	0,53	0,52	0,70	0,48	0,41	0,50	0,33
GG	0,58	0,53	0,50	0,28	0,07	0,22	0,44	0,51	0,28	0,49

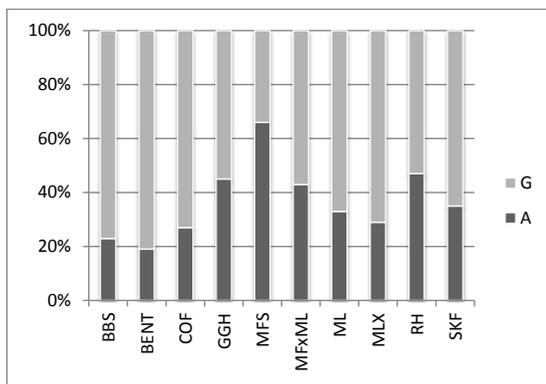


Abb. 4-24: Gegenüberstellung der Allelfrequenzen des SNPs LAMC2_51 in den einzelnen Rassen.

LAMC2_30

An der Position der SNPs LAMC2_30 tritt bei den meisten der untersuchten Rassen überwiegend oder ausnahmslos das Guanin auf. Eine Ausnahme bilden nur die Schwarzköpfigen Fleischschafe und Coburger Fuchsschafe mit Frequenzen für das A-Allel von 0,28 bzw. 0,14 (Tab. 4-27, Abb. 4-25).

Der Genotyp AA kommt nur bei den Coburger Fuchsschafen (6%), den Merinolandschaf-Kreuzungstieren (1%) und den Schwarzköpfigen Fleischschafen (10%) vor. Die niedrigste Frequenz für den GG-Genotyp haben mit 55% die Schwarzköpfigen Fleischschafe, gefolgt von den Coburger Fuchsschafen und Merinolandschafkreuzungstiere mit jeweils 78%. Die Grauen Gehörnten Heidschnucken, Rhönschafe und Merinolandschaf-Merinofleischschaf-Kreuzungstiere sind homozygot für den GG-Genotyp (Tab. 4-27).

Tab. 4-27: Allel- und Genotypfrequenzen des SNPs LAMC2_30 (call rate 90,8%).

LAMC2_30										
	BBS	BENT	COF	GGH	MFS	MFx ML	ML	MLX	RH	SKF
n	30	31	32	31	90	22	122	255	32	38
A	0,05	0,08	0,14	0,0	0,02	0,0	0,03	0,11	0,0	0,28
G	0,95	0,92	0,86	1,0	0,98	1,0	0,97	0,89	1,0	0,72
AA	0,0	0,0	0,06	0,0	0,0	0,0	0,0	0,01	0,0	0,10
AG	0,10	0,16	0,16	0,0	0,04	0,0	0,06	0,20	0,0	0,34
GG	0,90	0,84	0,78	0,1	0,94	0,1	0,93	0,78	0,1	0,55

Ergebnisse

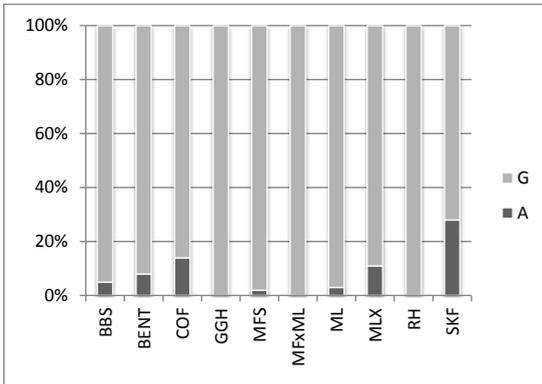


Abb. 4-25: Gegenüberstellung der Allelfrequenzen des SNPs LAMC2_30 in den einzelnen Rassen.

5 Diskussion

In den vier Kandidatengenomen wurden die vollständigen Exonbereiche sowie angrenzende Intronabschnitte sequenziert und untersucht. Trotz der Arbeiten des International Sheep Gene Consortiums (ISGC), welches seit 2009 an einer vollständigen Referenzsequenz arbeitet, und eines seit Kurzem verfügbaren SNP Chips für das Schaf (Archibald *et al.* 2010) sind viele Gensequenzen noch nicht in der GenBank veröffentlicht. Für die Auswahl der Primer und als Referenz wurden deswegen hauptsächlich die entsprechenden Rindersequenzen verwendet. Primer nahe verwandter Arten können häufig erfolgreich eingesetzt werden (Moore *et al.* 1991, Cockett *et al.* 1994). Dies hat sich für die Gene *TGM1*, *KGF* und *LAMC2* bestätigt. Lediglich die Amplifizierung des *LOR*-Gens war nur mit Primern auf Basis der ovinen Sequenz, welche zwischenzeitlich verfügbar wurde, erfolgreich.

Für das *TGM1*-Gen des Schafs gibt es in der GenBank keine Sequenzinformationen (Abruf 28.02.2012), es ist nur wenig untersucht. Die ermittelte kodierende Sequenz des ovinen *TGM1*-Gens ist 2502 Basen lang. Sie stimmt zu 96% mit der um 39 Basen längeren Sequenz des Rindes (NM_001010991.1) überein bzw. zu 88% mit der um 48 Basen kürzeren humanen kodierenden Sequenz (NM_000359.2). Die größte Abweichung zwischen der ovinen und der bovinen Sequenz ist im Exon 2. Dort fehlen beim Schaf, im Vergleich zum Rind, 42 Basen und somit 14 Aminosäuren. Die humane Sequenz ist in diesem Bereich hingegen weitere 30 Basen kürzer als die ermittelte ovine. Trotz dieser großen Unterschiede in der Länge der Aminosäuresequenz wird ein voll funktionstüchtiges Enzym gebildet. Dardano *et al.* (2007) stellten bei ihren Untersuchungen fest, dass das Exon 2 beim Rind eine längere Sequenz hat als beim Menschen. SNPs in diesem Exon hatten keine Auswirkungen auf die Funktion des Gens. Auch Credille *et al.* (2001) fanden die höchste Divergenz zwischen den Spezies im Exon 2 und vermuten, dass diese Region eine spezialisierte oder spezies-spezifische Funktion hat.

Die Analyse des *LOR*-Gens stellte sich als schwierig heraus. Für das Gen liegen keine Sequenzinformationen für das Schaf vor (GenBank Abruf 28.02.2012) und auch der entsprechende Abschnitt der Referenzsequenz des ISGC ist sehr lückenhaft.

Primer auf Basis der Rindersequenz waren bei diesem Gen nicht erfolgreich. Die Amplifizierung des Gens gelangt mit Primern auf Basis des Sheep Genome v2.0 (ISGC), welches während der Arbeiten an diesem Gen öffentlich zugänglich wurde. Die Schwierigkeiten könnten daran liegen, dass die Divergenz der ermittelten kodierenden Sequenz des Schafes mit der mRNA von Rind und Mensch 7% bzw. 27% beträgt. Somit ist das *LOR* von den untersuchten Genen dasjenige mit der größten Variabilität zwischen den Spezies. Die kodierende Sequenz ist 95 Basen kürzer als der kodierende Bereich der mRNA Referenzsequenz NM_001113757.1 des Rindes bzw. 126 Basen kürzer als die *Btau_4.2* Referenzsequenz NC_007301.4. Die bovine mRNA Sequenz (NM_001113757.1) hat zwei Insertionen von 36 und 33 Basen und endet 100 Basen vor der *Btau_4.2* Referenzsequenz, ist jedoch im Gegensatz zur *Btau_4.2* Sequenz nicht verifiziert. Diese Varianz bei den bovinen Sequenzen lässt den Schluss zu, dass das Gen große Variabilität tolerieren kann, ohne dass es zu einer Beeinträchtigung des Produkts kommt. Auch könnten sich die Probleme bei der Amplifizierung durch eine hohe Variabilität der Sequenzen vor allem im Intronbereich erklären.

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurden in diesem Gen keine SNPs identifiziert. Für das Rind sind zwölf im Exonbereich liegende SNPs und sechs in Intronbereichen in der SNP-Datenbank des NCBI verfügbar. Für den Menschen sind alleine sechzehn im Exonbereich vorhanden. Aufgrund dieser Anzahl an SNPs in der rund 1kb langen kodierenden Sequenz bei anderen Spezies war es überraschend, dass in der vorliegenden Arbeit keine Sequenzvarianten gefunden wurden. Auch die verhältnismäßig geringe Konservierung zwischen den Spezies im Vergleich mit den anderen untersuchten Genen lässt die Vermutung zu, dass Mutationen in diesem Gen weniger ins Gewicht fallen. Aus diesem Grund ist das Fehlen jeglicher SNPs erstaunlich. Geht man jedoch von der Annahme aus, dass alle 500-1000 Basen ein SNP vorkommt und die meisten davon sich in Intronbereichen befinden (Bentley 2004), lässt es sich erklären. Die kodierende Sequenz des Schafes besteht aus einem

Exon mit 888 bp. Sie hat somit eine Länge, in welcher durchschnittlich nur ein SNP vorkommt. Zusätzlich handelt es sich um einen Exonbereich, in welchem die SNPs noch seltener sind.

Die cDNA des ovinen *KGF* wurde erfolgreich kloniert (Mitchell & McInnes 1998) und die mRNA-Sequenz ist verfügbar (NM_001009235.1). Die kodierende Sequenz hat dieselbe Länge wie die in dieser Arbeit ermittelte. An Position 477 (C \Rightarrow T), 505 (C \Rightarrow T), 506 (A \Rightarrow C), 510 (G \Rightarrow A) und 582 (C \Rightarrow T) der kodierenden Sequenz gibt es zusätzliche Sequenzvarianten. Mit einer Länge von 588 Basen ist die Sequenz des Schafes genauso lang wie die bovine Sequenz (NM_001193131.1), mit welcher sie zu 98% übereinstimmt. Die gleiche Prozentzahl an Übereinstimmung teilt sie auch mit dem Rothirsch. Sie ist eine Base kürzer als die humane kodierende mRNA (NM_002009.3), welcher sie zu 94% gleicht. Auch die Sequenzen von Hund, Schwein und Pferd ähneln zu 95% der ermittelten ovinen Sequenz. Das Gen ist Spezies übergreifend stark konserviert. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass das Genprodukt eine wichtige Rolle spielt. Auch eine geringe Toleranz für Strukturveränderungen im keratinocyte growth factor und somit in seinem kodierenden Gen kann die Ursache dafür sein. Für das Rind gibt es keine Einträge in der SNP-Datenbank des NCBI, für den Menschen sind sechs SNPs bekannt. Auch diese geringe Anzahl an SNPs unterstützt die Vermutung, dass Mutationen in *KGF*-Gen weniger gut kompensiert werden können.

Für das Schaf ist eine mRNA-Sequenz des *LAMC2* in der GenBank veröffentlicht (NM_001142358.1). Diese Sequenz ist bis auf drei zusätzliche SNPs identisch mit der in der vorliegenden Arbeit ermittelten. Am 3' Ende ist sie 10 Basen länger als die Sequenz des Rindes (NC_007314.3). Die Übereinstimmung mit der kodierenden mRNA-Sequenz des Rindes (XM_588297.4) und des Menschen (NM_005562.2) beträgt 96% bzw. 87%. Das *LAMC2*-Gen ist mit einer kodierenden Sequenz von 3576 Basen und 23 Exons das längste der untersuchten Gene.

Von den 14 SNPs in Exonbereichen führen fünf zu einer Änderung der Aminosäuresequenz (Tab. 5-1). Das Gen hat von den untersuchten die höchste Frequenz an SNPs

im kodierenden Bereich, es kommt im Schnitt alle 255 Basen zu einem Austausch, bei *TGM1* alle 626 und bei *KGF* alle 588 Basen. Dies entspricht für das *LAMC2*-Gen einer verhältnismäßig hohen SNP-Frequenz im Vergleich zum durchschnittlich Auftreten von einer Sequenzvariante alle 500-1000 Basen (Bentley 2004).

Tab. 5-1: SNPs im *LAMC2*-Gen, welche zu einer Änderung der Aminosäuresequenz führen.

SNP-Name	Lokalisation	SNP	Aminosäuresequenz
LAMC2_41	Exon 3, Pos. 99	T ⇒ C	Phenylalanin ⇒ Leucin
LAMC2_44	Exon 11, Pos. 55	G ⇒ A	Arginin ⇒ Histidin
LAMC2_24	Exon 14, Pos. 49	A ⇒ G	Glutaminsäure ⇒ Glycin
LAMC2_51	Exon 17, Pos. 95	A ⇒ G	Histidin ⇒ Arginin
LAMC2_30	Exon 20, Pos. 137	G ⇒ A	Asparaginsäure ⇒ Asparagin

Auch Kerkmann (2008) fand bei ihrer Untersuchung der ovinen *LAMC2*-mRNA fünf nicht-synonyme SNPs. Neben den hier ebenfalls identifizierten SNPs in Exon 3, Exon 11, Exon 17 und Exon 20 fand sie einen weiteren in Exon 23. Der SNP in Exon 14 tritt nicht in Erscheinung. Bei Mömke *et al.* (2011) wurden noch eine Deletion in Exon 18 sowie synonyme SNPs in Exon 5, 20, 22 und 23 entdeckt, welche in der vorliegenden Arbeit nicht vorkommen. Im Gegensatz zur Arbeit von Kerkmann (2008), bei welcher der Wildtyp für den SNP in Exon 3 mit Cytosin angegeben wird, haben in der vorliegenden Untersuchung mehr Tiere Thymin an dieser Position. Das kann entstanden sein, da bei Kerkmann (2008) vier Tiere zur Identifizierung von Sequenzvarianten herangezogen wurden und somit die Tieranzahl verhältnismäßig gering ist. Zusätzlich identifizierte Kerkmann (2008) sieben stille SNPs, welche nicht näher beschrieben werden. Mömke *et al.* (2011) stellten fest, dass die Deletion in Exon 18 verantwortlich für das Auftreten der Epidermolysis bullosa junctionalis (EBJ) ist. Der SNP in Exon 23, welcher mit dem SNP in Exon 20 im Kopplungsungleichgewicht steht, ist laut Kerkmann (2008) ursächlich für eine EBJ-Erkrankung verantwortlich. Der mit der Erkrankung assoziierte Genotyp AA des SNPs im Exon 20 (*LAMC2_30*) kommt bei der vorliegenden Untersuchung am häufigsten bei den Deutschen Schwarzköpfigen Fleischschafen vor (10%). Das A-Allel hat mit 0,28 die höchste Frequenz von allen untersuchten Rassen. Bei Schwarzköpfigen Fleischschafen treten klinische Fälle der Erkrankung am häufigsten auf. Die Rasse wurde bei Kerkmann

(2008) zur Identifikation der für die EBJ-Erkrankung ursächlichen SNPs gewählt. Von keinem der untersuchten Schafe gibt es Berichte über eine Epidermolysis-Erkrankung. Dies ist nicht erstaunlich, da die Penetranz bei 94,9% liegt und auch bei Kerkmann (2008) 23,6% der nicht betroffenen Schafe den Genotyp AA trugen.

In der vorliegenden Untersuchung haben die Coburger Fuchsschafe mit 0,14 die zweithöchste Frequenz für das A-Allel nach den Deutschen Schwarzköpfigen Fleischschafen. Der AA-Genotyp kommt bei 6% der untersuchten Coburger Fuchsschafen vor. Die Erkrankung kann potenziell auch in dieser Rasse auftreten. Bei den Merinolandschaf-Kreuzungstieren von Betrieb 2 kommt der AA-Genotyp bei 1% der Schafe vor, die Frequenz des A-Allels liegt bei 0,11. Die Möglichkeit einer EBJ-Erkrankung ist somit auch bei ihnen gegeben. Das A-Allel tritt in den Rassen Graue Gehörnte Heidschnucke und Rhönschaf im Rahmen der vorliegenden Untersuchung nicht auf. Diese Rassen können auf Basis dessen als nicht gefährdet eingestuft werden. Der SNP in Exon 20 (LAMC2_30) wurde auch im Rahmen der vorliegenden Assoziationsanalyse untersucht. Er zeigte keine Assoziation mit einer Moderhinke-erkrankung. Eine Untersuchung des von Kerkmann (2008) in Exon 23 identifizierten SNPs im Zusammenhang mit Moderhinke wäre denkbar.

Es wird davon ausgegangen, dass nicht-synonyme SNPs einen größeren Effekt haben als synonyme SNPs. Dies liegt daran, dass die Veränderungen direkt in der Aminosäuresequenz abgelesen werden können und krankheitsauslösende Mutationen beim Menschen zu rund 60% Mutationen dieser Art sind (Botstein & Risch 2003). Trotzdem ist die Mehrzahl der nicht-synonymen SNPs in kodierenden Regionen alltäglich und funktionell neutral (Ng *et al.* 2008), wie auch die Untersuchung von Kerkmann (2008) und Mömke *et al.* (2011) gezeigt haben. Die Suche nach solchen Varianten, die eine Veränderung des Phänotyps zur Folge haben, ist deswegen von besonderem Interesse.

Auch synonyme SNPs können großen Einfluss auf die Funktion eines Gens haben. Sie können die mRNA in ihrer Struktur beeinflussen (Capon *et al.* 2004, Nackley *et al.* 2006), zu Veränderungen im Splicing führen oder für eine geänderte Reaktions-

geschwindigkeit bei der Translation sorgen (Sauna *et al.* 2007). Sie sollten deswegen nicht als unwichtig angesehen werden.

Von den identifizierten Sequenzvarianten waren Austausche von Cytosin mit Thymin in allen Genen die häufigsten (29 von 62 SNPs). Dies ist nicht überraschend, da die Desaminierung von Cytosin zu Thymin spontan und häufig auftritt, diese Stellen sind sogenannte Hotspots für Mutationen (Walsh & Xu 2006).

Die Analyse ausgewählter SNPs wurde von der Firma *Eurofins Medigenomix GmbH*, Ebersberg, durchgeführt. Erstmals beschrieben wurde die verwendete Hochdurchsatzmethode von Ross *et al.* 1998. Sie setzt sich zusammen aus Multiplex-PCR, Primerextension und anschließender Massenspektrometrie (matrix-assisted laser desorption/ionisation, time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS).

Der Vorteil dieser Untersuchung liegt darin, dass innerhalb weniger Tage gleichzeitig eine große Menge an Proben gleichzeitig auf mehrere SNPs untersucht werden kann. Bray *et al.* (2001) verglichen die Kosten einer Genotypisierung mit Primerextension und MADLI-TOF mit den Kosten einer Untersuchung mittels Restriktionslängenpolymorphismus (RFLP). Wird nur ein Locus untersucht so sind die Kosten für beide Methoden in etwa gleich hoch. Der Vorteil der MALDI-TOF Methode kommt durch die Multiplex-PCR zustande. Durch sie können die Kosten drastisch gesenkt werden und betragen weniger als ein Drittel der Kosten der RFLP-Analyse. Zu gleichen Ergebnissen kamen auch Thongnoppakhun *et al.* (2009). Des Weiteren sinken die Kosten dadurch, dass bei der MALTI-TOF Methode eine geringere Menge an DNA zur Sequenzanalyse ausreicht (Bray *et al.* 2001). Diese Faktoren tragen dazu bei, dass die Methode für eine schnelle, genaue und kostengünstige Genotypisierung großer Probenmengen sehr gut geeignet ist (Petkovski *et al.* 2005, Thongnoppakhun *et al.* 2009). Einschränkungen ergeben sich, da die Geräte in Anschaffung und Unterhalt sehr teuer sind und eine genaue Konfigurierung notwendig ist (Thongnoppakhun *et al.* 2009). Das größte Problem in der Anwendung liegt in der Multiplex-PCR (Ragoussis *et al.* 2006). Nicht alle SNPs sind miteinander kombinierbar. Zur Untersuchung aller ausgewählten Polymorphismen sind eventuell mehrere Assays notwendig wodurch wiederum die Kosten steigen oder

einzelne Varianten weggelassen werden müssen. Die *Eurofins Medigenomix GmbH* gibt eine Höchstmenge von 40 SNPs an, was jedoch nur im optimalen Fall erreicht werden kann. Die vorliegende Studie erfolgte an einer Anzahl von ausgewählten SNPs, für die zwei Assays notwendig waren. Auf eine vollständige Untersuchung aller identifizierten SNPs in den sequenzierten Genen wurde aus Kostengründen verzichtet. Auch kann es bei der Untersuchung, trotz vorheriger Kontrolle und Austestens der SNPs und Primer, zu Ausfällen kommen. Da die Methode aus vielen Einzelschritten besteht ist eine Ursachenforschung sehr langwierig. In der vorliegenden Arbeit gab es Komplettausfälle bei drei SNPs: TGM1_9, TGM1_12 und LAMC2_11. Da von diesen SNPs keine Daten vorliegen, liegt die Vermutung nahe, dass ein Problem bereits am Anfang der Untersuchung auftrat, bei der MultiplexPCR. Somit wurde kein Produkt gebildet und in den nachfolgenden Schritten nichts detektiert.

Ein Problem bei der Untersuchung war es, moderhinkebetroffene Herden zu finden. Die Aussage, dass Moderhinke eine „Schäferkrankheit“ sei, hält sich hartnäckig, sodass Schäfer ungern zugeben, dass sie Moderhinke im Bestand haben. Etwas, das auch Kerkmann (2008) bei ihren Untersuchungen feststellte. Aufgrund dessen ist das Auffinden mehrerer Herden mit derselben Rasse und den gleichen Haltungsbedingungen schwierig. Auch empfehlen Goddard & Hayes (2009) für Assoziationsstudien eine Mindestanzahl von 1800 Tieren, wenn der zu erwartende Effekt des SNPs 4% der genetischen Varianz des Merkmals ausmacht. Für eine multifaktorielle Ursache ist 4% bereits hoch. Liegen die zu erwartenden Effekte des SNPs über 4% werden weniger Tiere benötigt, liegen sie darunter jedoch mehr als 1800. Eine Verringerung der Tierzahl ist auch durch Nachkommensprüfung möglich (Goddard & Hayes 2009). In der vorliegenden Arbeit war es nicht möglich, alle diese Anforderungen zu erfüllen, da nur zwei Betriebe gewonnen werden konnten.

Für die statistischen Untersuchungen wurden die Tiere in den beiden von Moderhinke betroffenen Herden entweder der Gruppe moderhinkepositiv oder -negativ zugeordnet. Eine Unterscheidung in Schweregrade wurde nicht vorgenommen da von beiden Herden keine Verlaufskontrollen gemacht werden konnten. Dadurch war

nicht sicher festzustellen, ob die Erkrankung gerade begonnen hatte, sich bereits in Abheilung befand und bis zu welchem Stadium sich die Erkrankung bei dem Einzeltier entwickelt hatte oder entwickeln würde. Eine Kontrolle in kurzen Abständen über einen längeren Zeitraum ist genauer, war jedoch aufgrund der Betriebsstrukturen im Rahmen dieser Studie nicht möglich.

Da auf beiden Betrieben ein hoher Infektionsdruck herrschte, rund 51% bzw. 68% der Schafe waren moderhinkepositiv, kann spekuliert werden, dass Tiere, die keine Krankheitsanzeichen zeigten eine höhere Widerstandskraft gegenüber einer Moderhinkeinfektion haben. In anderen Studien mit Felduntersuchungen an einzelnen Herden in Deutschland wurden Moderhinke-Prävalenzen von bis zu 30% (Kuhlemann 2011, Thoms 2006) und bis zu 22% (Lottner 2006) bei Merinoschafen ermittelt. Im Vergleich mit diesen Zahlen ist die in dieser Arbeit ermittelte Prävalenz für beide Herden sehr hoch. Dies kann zum einen zufällig sein, da explizit nach Herden mit einer starken Moderhinkebelastung gesucht wurde, damit die Tiere einem hohen Infektionsdruck ausgesetzt sind. Auch wurde die Beurteilung des Moderhinkestatus zum Ende des Winterhalbjahrs vorgenommen. Das Problem kann durch die in dieser Jahreszeit in beiden Betrieben vorherrschende Stallhaltung verschärft worden sein. Auch bei den Untersuchungen von Lottner (2006) waren die Tiere in Stallhaltung häufiger betroffen als Tiere in Weidehaltung. Die Schafe stehen auf einer kleineren Fläche, die Übertragung des Keims wird dadurch erleichtert. Die Probennahme bei Kuhlemann (2011) fand überwiegend während der Weideperiode im Frühjahr/Sommer statt, Thoms (2006) untersuchte die Tiere mehrmals im Verlauf eines ganzen Jahres. Zum anderen ist es möglich, dass durch die adspektorische Einteilung zu viele Tiere falsch-positiv bewertet wurden. Im Rahmen einer weiteren, noch nicht veröffentlichten Arbeit an *D. nodosus* wurde ein *D. nodosus* PCR-Nachweis an einer Stichproben der als betroffen eingeteilten Klauen durchgeführt. Die adspektorisch getroffenen Einteilungen in positiv und negativ bestätigten sich dabei. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass sich unter den beprobten und nicht mit PCR nachuntersuchten Tieren auch falsch-positive befinden. Dieses Problem kann nur umgangen werden, wenn alle Proben zusätzlich zur adspektorischen Einteilung auch mit PCR untersucht werden.

Die Herdenprävalenz kann einen Hinweis auf die Form der Erkrankung geben. Im Rahmen des australischen Eradikationsprogramms wird davon ausgegangen, dass die bösartige und virulentere Form der Moderhinke dann vorliegt, wenn mehr als 10% der Tiere ein unterminiertes Klauenhorn aufweisen oder wenn über 1% der Schafe Läsionen bis zur abaxialen Wand haben (Western Australia Department of Agriculture 2001, Egerton 2007). Die Prävalenz der Moderhinke allgemein überschreitet in beiden der für die Studie herangezogenen Herden die 10%-Grenze deutlich. Da keine Aufzeichnungen über die Art der Läsion vorgenommen wurden kann nicht sicher gesagt werden, ob auch die Grenze für die Läsionen bis zur abaxialen Wand überschritten wurde. Die hohe Prävalenz lässt jedoch eine hohe Virulenz vermuten.

Es konnte auch beobachtet werden, dass Tiere trotz immer wiederkehrender Moderhinkeerkrankungen weiter in der Herde verbleiben, da sie laut Aussage des Schäfers trotzdem noch sehr gute Lämmer bringen. Diese Tiere werden weiter zur Zucht benutzt und können so genetische Prädispositionen für eine Moderhinkeerkrankung vererben. Auch Kuhlemann (2011) stellte bei ihren Untersuchungen fest, dass die Schäfer nur ungern Tiere merzten. Dem Tier entsteht durch die Erkrankung erhebliche Leiden und Schmerzen (Ley *et al.* 1991, Ley *et al.* 1992, Ley *et al.* 1994, Kümper & Stumpf 2000), die durch das zusätzliche Gewicht im Rahmen der Trächtigkeit noch verstärkt werden weswegen dieses Vorgehen auch aus tierschutzrechtlichen Gründen bedenklich ist.

Die Ergebnisse von χ^2 -Test bzw. Fisher's Exact Test und der Varianzanalyse decken sich in drei SNPs: TGM1_5, KGF_1 und LAMC2_15 (Tab. 5-2, Tab. 5-3). Der einzige von diesen, welcher auch bei Einbeziehen der Daten aus dem Vorjahr (Betrieb 1) signifikante Genotypfrequenzen ergab, ist TGM1_5. Zu beachten ist dabei, dass der SNP mit 81,4% die niedrigste *call rate* der ausgewerteten SNPs hatte. Betrachtet man die absoluten Zahlen – von Betrieb 1 liegen Ergebnisse von 131 der 140 untersuchten Proben vor, bei Betrieb 2 von 224 der 289 Proben – so sind diese jedoch trotzdem hoch. Keiner der SNPs zeigte auf allen Betrieben eine signifikante Genotypfrequenz, was ihre Aussagekraft schmälert. Die SNPs LAMC2_14, LAMC2_15 und LAMC2_48

waren nur auf Betrieb 3 unterhalb der Signifikanzgrenze von 5% (Tab. 5-2). Aufgrund der Datenlage können diese einen Hinweis auf die Klauengesundheit allgemein geben.

Tab. 5-2: Darstellung der SNPs, für die χ^2 -Test und Fisher's Exact Test in mindestens einem Betrieb signifikante Genotypfrequenzen mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit unter $p = 0,10$ ergaben.

	Betrieb 1 (Moment)	Betrieb 1 (Dauer)	Betrieb 2	Betrieb 3
TGM1_5	*	*	*	n.s.
LOR_chip	(*)	n.s.	**	n.s.
KGF_1	*	n.s.	n.s.	n.s.
LAMC2_1	*	n.s.	(*)	n.s.
LAMC2_14	n.s.	n.s.	(*)	**
LAMC2_15	n.s.	n.s.	*	*
LAMC2_18	n.s.	n.s.	n.s.	(*)
LAMC2_48	n.s.	n.s.	n.s.	*

n. s. = nicht signifikant

(*) = Grenzwert mit Irrtumswahrscheinlichkeit von 10% ($p = 0,10$)

* = signifikant bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% ($p = 0,05$)

** = signifikant bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1% ($p = 0,01$)

Tab. 5-3: Darstellung der SNPs, die bei der Varianzanalyse ein Signifikanzniveau unter $p = 0,05$ ergaben.

	Genotyp	Rasse	Gewicht
TGM1_5	**	n. s.	n. s.
KGF_1	*	n. s.	n. s.
LAMC2_15	*	n. s.	n. s.

n. s. = nicht signifikant

* = signifikant bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% ($p = 0,05$)

** = signifikant bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1% ($p = 0,01$)

Im Rahmen der Varianzanalyse konnte weder ein signifikanter Einfluss auf den Moderhinkestatus durch die Rasse noch durch das Gewicht nachgewiesen werden (Tab. 5-3). Dies widerspricht den Aussagen, dass Tiere mit einem höheren Körpergewicht empfänglicher für eine Moderhinkeinfektion seien (Beveridge 1941, Skerman *et al.* 1988, Nieuwhof *et al.* 2008 b). Allerdings besteht das Problem in beiden untersuchten Herden bereits über einen längeren Zeitraum. Eine Moderhinkeinfektion – wie jede Erkrankung – geht mit Leistungseinbußen, wozu auch Gewichtsverlust gehört, einher (Nieuwhof *et al.* 2008a). Die Ergebnisse könnten insofern verfälscht

sein, dass ein durch die Erkrankung erfolgter Gewichtsverlust bereits vor Beginn der Studie erfolgt sein kann. Zudem muss beachtet werden, dass die Gewichte der Tiere nur geschätzt wurden. Die gezogenen Rückschlüsse können somit nur einen Hinweis geben. Eine zuverlässige Aussage kann nur gemacht werden, wenn das Gewicht der Tiere durch Wiegen sicher bestimmt wird.

Auch Rasseunterschiede in der Empfänglichkeit sind vielfach beschrieben worden wobei Merinorassen allgemein als am empfänglichsten gelten (Emery *et al.* 1984, Skerman & Moorhouse 1987, Rahmann 2003, Kuhlemann 2011). Da in der vorliegenden Studie nur Merinorassen bzw. Kreuzungen mit Merinolandschafen in der Varianzanalyse untersucht wurden, ist das Fehlen eines Rasseneffekts dadurch zu erklären. Auch Lottner (2006) konnte bei gleichen Haltungsbedingungen zwischen Merinoschafen und Schwarzköpfigen Fleischschafen keinen signifikanten Unterschied nachweisen. Außerdem verliert sich laut Emery *et al.* (1984) bei hohem Infektionsdruck der Rasseneffekt. Wenn man den rassespezifischen Effekt jedoch auch als Betriebseffekt zwischen Betrieb 1 und 2 berücksichtigt, ist dessen Fehlen wiederum verwunderlich. Ein Effekt des Betriebs wurde erwartet, da zwischen den beiden Betrieben deutliche Unterschiede unter anderem in Standort, klimatischen Bedingungen, Herdenmanagement und Bodenbeschaffenheit herrschen. Jedoch konnte auch Lottner (2006) bei ihren Untersuchungen keinen signifikanten Betriebs-effekt mehr nachweisen, sobald auf den untersuchten Betrieben nur die Merinoschafe betrachtet wurden, nicht jedoch die teilweise ebenfalls vorhandenen Schwarzköpfigen Fleischschafe.

Bei den SNPs mit signifikanten Unterschieden in den Genotypfrequenzen ist oft derselbe Genotyp in beiden Gruppen der häufigste (TGM1_5, LOR_chip, LAMC2_1, LAMC2_48). Lediglich seine Frequenz und das Verhältnis zu den anderen Genotypen unterscheiden sich zwischen den moderhinkepositiven und -negativen Tieren. Deswegen ist eine Beurteilung der Genotypfrequenzen schwierig. Beispiele für SNPs, bei welchen ein Genotyp nur in einer der beiden Gruppen auftritt sind KGF_1, LAMC2_1 und LAMC2_48. Die Frequenz des entsprechenden Genotyps ist jedoch jeweils sehr niedrig. Bei TGM1_5 und LOR_chip ist in der Gruppe der moderhinke-

positiven Tiere der heterozygote Genotyp häufiger vertreten als in der Gruppe der nicht erkrankten Schafe. Die Heterozygotie ist bei diesen SNPs augenscheinlich ein Nachteil.

Für die Bestimmung der Allelfrequenzen der ausgewählten SNPs standen Stichproben von jeweils mindestens 32 Tieren der Rassen Braunes Bergschaf, Bentheimer Landschaf, Coburger Fuchsschaf und Graue Gehörnte Heidschnucke zur Verfügung. Zusätzlich zu dem Material aus den betroffenen Betrieben waren noch weitere 18 Proben von Merinolandschafen, 30 von Rhönschafen und 16 von Deutschen Schwarzköpfigen Fleischschafen verfügbar. Die Probenanzahl von 32 zur Schätzung der Allelfrequenzen orientiert sich an der für das ECONOGENE-Projekt untersuchten Tierzahl pro Rasse (Peter 2005, www.econogene.eu). Betrieb 3 hat bereits seit Längerem ein Problem mit Moderhinke und die verfügbaren Daten geben nur Auskunft über stattgefundene Klauenbehandlungen. Deswegen kann nicht ausgeschlossen werden, dass die dortigen Merinofleischschafe auf eine geringere Moderhinkeempfindlichkeit hin selektiert wurden. Die Ergebnisse der Allel- und Genotypfrequenzen für diese Rasse sind deswegen kritisch zu bewerten.

Da Merinoschafe allgemein als am moderhinkeanfälligesten gelten (Emery *et al.* 1984, Jopp *et al.* 1984a, Morgan 1987) wurden Allel- und Genotypfrequenz von Merinolandschafen im Vergleich zu den Frequenzen von als widerstandsfähig geltenden Rassen betrachtet.

Das Braune Bergschaf ging aus dem Weißen Bergschaf hervor (Sambraus 2010) und gehört laut der Gesellschaft zur Erhaltung alter und gefährdeter Haustierrassen zu den stark gefährdeten Nutztierassen (www.g-e-h.de). Die Rasse ist an das Klima im Alpenraum mit hohen Niederschlägen angepasst und besitzt harte Klauen (Sambraus 2001). Harte Klauen gelten als widerstandsfähiger gegenüber Moderhinke (Herrmann 1963). Dies alles macht sie für die vorliegende Untersuchung interessant. Es wurde erwartet, auch auf genetischer Basis Hinweise auf eine geringe Anfälligkeit gegenüber Moderhinke zu finden. In ihrer Arbeit konnte Peter (2005) für Weißes und Braunes Bergschaf keine nennenswerte genetische Differenzierung zwischen den

beiden Rassen feststellen, sie unterscheiden sich zu allererst durch ihre Fellfarbe. Das bedeutet, dass die Ergebnisse von Braunem Bergschaf vermutlich auf das Weiße übertragbar sind.

Vergleicht man die Allelfrequenzen mit den als anfällig geltenden Merinolandschafen so gibt es deutliche Unterschiede in der Frequenz der Allele nur an den Positionen der SNPs TGM1_3 (Unterschied = 30%), KGF_2 (Unterschied = 22%) und LAMC2_15 (Unterschied = 25%). Von diesen SNPs ist nur die Genotypfrequenz von LAMC2_15 in dieser Studie signifikant mit dem Moderhinkestatus verknüpft.

Die Vermutung einer geringeren Empfänglichkeit wird durch die Ergebnisse der SNPs LAMC2_14 und LAMC2_15 in soweit unterstützt, als dass die an dieser Position mit einer geringeren Moderhinke-Prävalenz in Verbindung gebrachten Genotypen CT bzw. AT am häufigsten sind (38% bzw. 44%). Auch unterstützt wird die These dadurch, dass der Genotyp AC, welcher bei dem SNP KGF_1 nur in der Gruppe der nicht erkrankten Tiere auftritt, der zweithäufigste bei den Braunen Bergschafen ist (35%). Für den SNP LOR_chip ist der günstiger erscheinende Genotyp CC mit 90% vertreten. Das C-Allel hat eine Frequenz von 0,95. Da der heterozygote Genotyp CT bei den moderhinkekranken Tieren häufiger auftritt als bei den Gesunden ist eine niedrige Allelfrequenz für das T-Allel günstig zu bewerten. Gegen die Annahme einer geringeren Empfänglichkeit spricht das Ergebnis an Position LAMC2_1. Der TT-Genotyp, welcher nur bei den nicht erkrankten Tieren auftritt, kommt bei den Braunen Bergschafen nicht vor, das T-Allel hat mit 0,13 eine niedrige Frequenz. Das C-Allel, welches bei den moderhinkepositiven Tieren häufiger ist hat die zweithöchste Frequenz von allen untersuchten Rassen (0,87). Auch für den SNP TGM1_5 ist das G-Allel, welches vermehrt bei den nicht erkrankten Tieren auftritt, selten vertreten (0,17). Die Genotypfrequenzen der übrigen SNPs mit signifikantem Einfluss auf den Moderhinkestatus oder die Klauengesundheit lassen keinen Rückschluss auf eine mögliche geringere Empfänglichkeit der Braunen Bergschafe zu.

Aus Heide- und Marschschafen entstand Anfang des 20. Jahrhunderts das Bentheimer Landschaf (Sambraus 2001). Wie viele Landschaftsrassen gilt es als bedroht

(Gesellschaft zur Erhaltung alter und gefährdeter Haustierte, www.g-e-h.de). Die Moderhinkefestigkeit wird bei dieser Rasse stark betont und auch im Zuchtziel erwähnt (Sambraus 2001, Wagner 2009) weswegen eine Untersuchung im Rahmen der vorliegenden Studie naheliegend war. Auch stellte Rahmann (2003) fest, dass das Bentheimer Landschaf seltener und schwächer an Moderhinke erkrankte als die in der gleichen Untersuchung betrachteten Merinolandschafe.

Den Hinweis auf eine Bestätigung dieser Aussage lässt nur die Genotypverteilung für den SNP LAMC2_1 zu. Der nur bei den nicht an Moderhinke erkrankten Tieren vorkommende Genotyp TT ist mit 19% in dieser Rasse sehr hoch, das T-Allel hat die zweithöchste Frequenz aller untersuchter Rassen (0,47). Übertroffen werden die Genotyp- und Allelfrequenz nur von den Grauen Gehörnten Heidschnucken (39% bzw. 0,61). Dagegen widerspricht besonders die Verteilung bei TGM1_5 einer Kopplung mit einer geringeren Moderhinkeanfälligkeit bei den Bentheimer Landschafen. Der mit einer Erkrankung assoziierte Genotyp AG ist hier nicht nur der häufigste innerhalb der Rasse (62%) sondern auch im Vergleich mit allen untersuchten Rassen. Das G-Allel, welches eine höhere Frequenz innerhalb der Gruppe der nicht erkrankten Schafe hat, hat eine Frequenz von 0,16. Im Vergleich mit den übrigen Rassen, auch den Merinorassen, ist dies niedrig. Ähnlich verhält es sich bei der Genotyp- und Allelfrequenz für den SNP LOR_chip. Der auf Basis der vorliegenden Untersuchung erwünschte Genotyp CC ist mit 42% selten vertreten. Auffällig ist die hohe Frequenz des T-Allels (0,39) und des TT-Genotyps (19%). Dieses ungünstige Allel bzw. dieser ungünstige Genotyp tritt bei Brauen Bergschafen, Grauen Gehörnten Heidschnucken, Merinofleischschafen und Schwarzköpfigen Fleischschafen nicht in Erscheinung, bei den übrigen Rassen nur mit einstelliger Häufigkeit. Eine ähnliche Situation findet sich für LAMC2_18, wo die Frequenz für das T-Allel (0,31) bzw. der TT-Genotyp (9%) wesentlich niedriger ist als in den übrigen Rassen. Dies lässt sich zum einen dadurch erklären, dass die Population der Bentheimer Landschafe in den 1970 Jahren auf 50 Herdbuchtiere geschrumpft war, ein Flaschenhals, welcher in der Population immer noch bemerkbar ist (Wagner 2009). Eine andere mögliche Ursache kann sein, dass diese beiden SNPs mit Merkmalen gekoppelt sind, die beim Bentheimer Landschaf selektiert werden oder

wurden. Dies müssten jedoch für Bentheimer Landschaft spezifische Merkmale sein, welche höchstens mit dem Coburger Fuchsschaf geteilt werden, da deren Frequenz ähnlich ist. Eine weitere Möglichkeit ist, dass die Kopplung der SNPs mit den unter Selektion stehenden Merkmalen nur beim Bentheimer Landschaft, und zu einem geringeren Grad beim Coburger Fuchsschaf, gegeben ist.

Die Verteilung der Genotypen für die SNPs LAMC2_15 und LAMC2_48 gibt Hinweise auf eine gute allgemeine Klauengesundheit der Bentheimer Landschaft.

Rahmann (2003) beschreibt auch bei den Coburger Fuchsschafen eine geringere Anfälligkeit gegenüber Moderhinke und eine schnellere Genesung. Die Rasse ist marschfähig und widerstandsfähig, angepasst an das Klima der Mittelgebirge (Sambras 2001). Die Bestände haben sich in den letzten Jahren kontinuierlich erhöht. Die Rasse wird bei der Gesellschaft zur Erhaltung alter und gefährdeter Haustiere (www.g-e-h.de) in der Vorwarnstufe geführt.

Die Annahme, dass die Coburger Fuchsschafe weniger anfällig für Moderhinke sind, kann nicht durch die Genotypfrequenzen der SNPs TGM1_5, LOR_chip, KGF_1 oder LAMC2_1 bestätigt werden. Für den SNP TGM1_5 tritt der homozygote Genotyp GG vermehrt in der Gruppe der nicht erkrankten Schafe auf. Dieser Genotyp ist bei den Coburger Fuchsschafen mit 13% niedrig im Vergleich mit den übrigen Rassen. Auch das G-Allel (0,30) ist in dieser Rasse deutlich seltener vertreten. Der bei dem SNP LOR_chip in der Gruppe der moderhinkekranken Schafe häufiger vertretene Genotyp CT ist bei den Coburger Fuchsschafen der häufigste im Vergleich mit den anderen untersuchten Rassen. Das günstige C-Allel liegt nur bei einer Frequenz von 0,67 und hat den zweitniedrigsten Wert von allen Rassen. Bei dem SNP KGF_1 sind der Genotyp AC (3%), der nur bei den nicht erkrankten Schafen auftritt, und das A-Allel (0,02) niedrig. Ebenso verhält es sich bei dem SNP LAMC2_1 mit dem Genotyp TT (0%) bzw. dem T-Allel (0,08).

Der Genotyp TT bzw. das T-Allel, welche bei LAMC2_14 (13% bzw. 0,37) und LAMC2_15 (17% bzw. 0,38) vor allem bei den Tieren mit Klauenerkrankung eine Rolle spielen, sind bei den Coburger Fuchsschafen niedrig. Ähnlich verhält es sich auch mit der Allel- und Genotypverteilung des SNPs LAMC2_48. Somit kann auf

Basis der vorliegenden Daten nur eine höhere allgemeine Klauengesundheit vermutet werden. Geht man davon aus, dass die untersuchten SNPs in allen Rassen einen Einfluss auf die Moderhinkeempfänglichkeit haben, deuten die Daten sogar auf eine höhere Empfänglichkeit als bei den Merinolandschafen hin.

Die Verteilung der Allele und Genotypen an der Position der SNPs LOR_chip und LAMC2_18 ist ähnlich der bei den Bentheimer Landschafen. Die möglichen Ursachen sind auch in diesem Fall zum einen eine Kopplung mit Merkmalen, auf die in der Rasse selektiert wurde und der Flaschenhals, den die Rasse durchlaufen hat. Allerdings liegt dieser Flaschenhals mehrere Jahrzehnte vor dem der Bentheimer Landschaft, in der Mitte des 20. Jahrhunderts (Sambraus 2010). Dies könnte eine Erklärung sein, warum die Genotypfrequenzen nicht so stark von denen der sechs übrigen Rassen abweichen wie die der Bentheimer Landschaft. Auch die Frequenzen für KGF_1 und LAMC2_4 sind sehr ähnlich denen der Bentheimer Landschaft. Da die beiden Rassen im Verlauf ihrer Zuchtgeschichte nicht gekreuzt wurden, ist dies unerwartet. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Genotypen mit einem bei beiden Rassen unter Selektion stehenden Merkmal gekoppelt sind.

Die seit 1930 in einem Zuchtbuch geführte aber wesentlich ältere Rasse der Grauen Gehörnten Heidschnucke gilt als anspruchslos und widerstandsfähig, teilweise als widerstandsfähigste aller Schafrassen und allgemein krankheitsresistent (Sambraus 2010). Peter (2005) bescheinigt der Rasse die größte genetische Distanz zu den von ihr untersuchten übrigen Rassen Deutschlands und Europas sowie eine niedrige Diversität innerhalb der Rasse. Ein Vergleich der Allelfrequenzen für die in dieser Arbeit ausgewählten SNPs ist dadurch interessant.

Die Krankheitsresistenz gegen Moderhinke im Besonderen und Klauenerkrankungen allgemein kann aufgrund der Daten für die SNPs TGM1_5, LOR_chip und LAMC2_1 bestätigt werden. Hier ist jeweils der Genotyp innerhalb der Rasse am häufigsten vertreten, welcher gehäuft bei den nicht erkrankten Tieren auftrat. Ebenso verhält es sich mit dem jeweils für eine geringere Krankheitsanfälligkeit günstigen Allel. Bei dem SNP LAMC2_1 ist der nur bei den moderhinkenegativen Tieren auftretende Genotyp TT (39%) mit Abstand am häufigsten im Vergleich mit den anderen Rassen.

Das T-Allel hat die höchste Frequenz von allen Rassen (0,61). Für den SNP LOR_chip sind die Proben der Rasse homozygot für das günstige C-Allel.

Bei den SNPs LAMC2_14 und LAMC2_15 ist zwar der heterozygote Genotyp, der bei den nicht erkrankten Tieren häufiger ist, auch innerhalb der Rasse am häufigsten. Das ungünstige T-Allel jedoch hat in beiden Fällen eine hohe Frequenz (0,61 bzw. 0,61). Dies spricht gegen eine gute Klauengesundheit. Auch für die SNPs KGF_1 und LAMC2_48 spricht die Situation gegen eine geringere Krankheitsanfälligkeit. Das in beiden Fällen erwünschte A-Allel kommt nicht vor (KGF_1) bzw. hat eine niedrige Frequenz im Vergleich mit den übrigen Rassen (0,16 bei LAMC2_48).

Besonders auffällig ist die Rasse für den SNP TGM1_5. Hier ist die Verteilung gegenläufig zu der bei allen übrigen untersuchten Rassen, was auf Basis der Ergebnisse von Peter (2005) nicht erstaunlich ist. Die Frequenz des A-Allels (0,26) liegt deutlich (16%) unter den Vergleichsfrequenzen, der GG-Genotyp (58%) liegt 27% oberhalb der Frequenzen der anderen Rassen. Ähnlich, wenn auch schwächer ist die Situation für das T-Allel bzw. den TT-Genotyp des LAMC2_1.

Eine weitere Nutztier rasse in der Vorwarnstufe der Gesellschaft zur Erhaltung alter und gefährdeter Haustiere (www.g-e-h.de) ist das Rhönschaf. Namentlich bekannt ist es seit über 150 Jahren. Es wird jedoch davon ausgegangen, dass die Rasse noch älter ist (Sambraus 2010). Ihre Merkmale sind Genügsamkeit, Widerstandsfähigkeit gegenüber feuchtem Wetter und Krankheiten sowie eine gute Marschfähigkeit (Sambraus 2001). Rahmann (2003) beobachtete, dass das Rhönschaf wesentlich schwächer und seltener an Moderhinke erkrankt als Merinolandschafe. Auch in der Arbeit von Thoms (2006) waren die Rhönschafe wesentlich seltener von Moderhinke betroffen als die Merinolandschafe.

Diese Beobachtung kann nicht durch die SNPs TGM1_5 oder LAMC2_1 bestätigt werden. Auch die Allelfrequenz des SNPs LOR_chip scheint nicht für eine geringere Moderhinkeanfälligkeit zu sprechen. Die Frequenz des ungünstigen T-Allels (0,20) ist hoch, höher als bei den untersuchten Merinorassen. Bei KGF_1 hingegen ist der nur bei nicht erkrankten Tieren aufgetretene Genotyp AC mit 50% vertreten. Das A-Allel (0,44) hat die mit Abstand höchste Frequenz im Vergleich der untersuchten

Rassen, welche überwiegend homozygot oder annähernd homozygot für das C-Allel sind. Die Verteilung bei KGF_2 ist ebenfalls gegenläufig zu anderen Rassen. Dies könnte ein Hinweis sein, dass das ganze *KGF*-Gen beim Rhönschaf im Rahmen der Züchtung beeinflusst wurde. Peter (2005) fand in ihren Untersuchungen bei der Rasse Hinweise auf einen kürzlich durchlaufenen Flaschenhals. Somit könnte die Besonderheit des *KGF*-Gens auch darauf beruhen.

Bezüglich der Klauengesundheit lässt sich aufgrund der vorliegenden Daten keine Vermutung anstellen. Für die SNPs LAMC2_14, LAMC2_15 und LAMC2_48 sind die jeweils günstigen und ungünstigen Allele und Genotypen fast gleich häufig.

Rahmann (2003) stellte bei Untersuchungen fest, dass Schwarzköpfige Fleischschafe widerstandsfähiger gegenüber Moderhinke sind als Merinolandschafe. Auch bei Lottner (2006) lag die Moderhinke-Prävalenz der Schwarzköpfigen Fleischschafe deutlich unter derjenigen der Merinoschafe. Auf Basis dieser Beobachtungen wurde erwartet, dass sich auch bei den im χ^2 -Test und in der Assoziationsstudie signifikanten SNPs diese geringere Anfälligkeit widerspiegelt.

Dies scheinen vor allem die SNPs LOR_chip und KGF_1 zu bestätigen. Die bei LOR_chip vermehrt bei den moderhinkeskranken Schafen auftretende Genotypen CT und TT bzw. das T-Allel kommen beim Schwarzköpfigen Fleischschaf nicht vor. Der nur bei nicht betroffenen Tieren vorkommende Genotyp AC bei KGF_1 hat eine Frequenz von 19%, bei Merinolandschafen liegt diese nur bei 6%. Das A-Allel hat die dritthöchste Frequenz mit 0,10. Für TGM1_5 sieht die Situation anders aus. Der vermehrt in der Gruppe der moderhinkeneutralen Schafe vorkommende Genotyp GG bzw. das G-Allel haben die niedrigsten Frequenzen (0% und 0,08%) bei den Schwarzköpfigen Fleischschafen. Der nur bei nicht betroffenen Tieren gefundene Genotyp TT bei LAMC2_1 ist mit 5% in der Rasse nicht sehr häufig vertreten, aber noch häufiger als beim Merinolandschaf (2%). Das T-Allel hat eine geringe Frequenz (0,20), in etwa auf gleichem Niveau wie die Verteilung bei den Merinorassen. Diese beiden SNPs widersprechen somit der Aussage, dass Schwarzköpfige Fleischschafe eine höhere Moderhinkeresistenz haben als Merinorassen.

Die mit der Klauengesundheit assoziierten SNPs LAMC2_14 und LAMC2_15 sprechen in ihrer Frequenz für eine gute allgemeine Klauengesundheit. Der bei beiden SNPs verstärkt mit einer notwendigen Behandlung der Klaue in Verbindung stehende Genotypen TT hat jeweils die niedrigste Frequenz von allen untersuchten Rassen. Auch das T-Allel hat mit die niedrigste Frequenz (0,29 bzw. 0,30). Ganz anders erscheint die Situation für LAMC2_48. Der nur bei nicht behandelten Tieren auftretende Genotyp AA kommt nicht vor. Von allen Rassen ist die Frequenz des erwünschten A-Allels (0,07) am kleinsten.

Die beschriebene geringere Anfälligkeit gegenüber Moderhinke der untersuchten Rassen lässt sich nicht auf Basis der in dieser Studie untersuchten SNPs erklären. Da die Assoziation der SNPs mit Moderhinke jedoch hauptsächlich an Merinorassen und deren Kreuzungen stattfand, ist es möglich, dass die SNPs nur für diese Tiere eine Aussage zulassen. Bezüglich der rasse- und haltungsformübergreifenden Assoziation mit Moderhinke ist der SNP TGM1_5 am vielversprechendsten. Er zeigte auf beiden von Moderhinke betroffenen Betrieben eine signifikante Frequenz der Genotypen.

Eine interessante Beobachtung ist, dass sich die Allel- und Genotypfrequenzen in der Merinolandschaf-Kreuzungsherde auf Betrieb 2 nicht immer durch die, laut Aussage des Schäfers, vor allem eingekreuzten Schwarzköpfigen Fleischschafen erklären lassen. So fallen die Frequenzen an den Positionen der fünf SNPs TGM1_3, TGM1_5, LAMC2_1, LAMC2_48 und LAMC2_51 aus der Reihe. Die Tiere scheinen häufig näher mit den Rhönschafen verwandt zu sein. Tiere der Rasse Rhönschaf wurden laut Schäfer ebenfalls eingekreuzt, allerdings zu einem deutlich geringeren Anteil als Schwarzköpfige Fleischschafe. Da keine Aufzeichnungen über die tatsächlichen stattgefundenen Anpaarungen vorliegen ist eine engere Verwandtschaft mit den Rhönschafen unabhängig von der Aussage des Schäfers möglich.

Auch bei den Merinofleischschaf-Merinolandschaf-Kreuzungstieren gibt es SNPs, bei denen die Allel- und Genotypfrequenzen von den erwarteten Werten auf Basis der Frequenzen der einzelnen Rassen abweichen, so zu sehen bei LOR_chip, LAMC2_42,

LAMC2_48 und LAMC2_30. Auch in diesem Fall liegen keine weiteren Unterlagen vor, so dass nicht sicher ist, ob es sich um Kreuzungstiere der ersten Generation handelt. Sind sie aus der zweiten oder einer späteren Generation lässt sich, ohne genaue Daten, die Genotypfrequenz nicht sicher vorhersagen. Vor allem, wenn erneut Merinofleischschafe oder -landschafe eingekreuzt wurden.

Moderhinke kommt in vielen Schafrassen vor, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß. Deswegen wurde erwartet, dass ein ursächliches Gene oder SNP für die Anfälligkeit gegenüber dieser Erkrankung in allen betroffenen Rassen und auf allen untersuchten Betrieben einen Einfluss hat. So ist es zum Beispiel der Fall für einen Aminosäureaustausch (K232A) im DGAT1-Gen bei Rindern (Winter et al. 2002, Kaupe et al. 2004).

Doch obwohl in dieser Studie kein solcher SNP gefunden werden konnte, muss dies nicht bedeuten, dass die hier besprochenen SNPs keinen Einfluss haben. Moderhinke ist eine Faktorenerkrankung (Beveridge 1941, Roberts & Egerton 1969) mit einer moderaten Heritabilität (Skerman *et al.* 1988, Woolaston 1993, Lottner 2006, Russell *et al.* 2010, Sawalha *et al.* 2010). Der Einfluss mehrerer Gene und SNPs auf die Empfänglichkeit gegenüber dieser Krankheit und deren Verlauf ist zu vermuten. So gibt auch der Genmarker Test aus Neuseeland (Gene-Marker Laboratory, New Zealand <http://www.lincoln.ac.nz/gene-marker-lab>) nur Tendenzen an, die bei der Selektion weniger empfänglicher Tiere helfen sollen.

Besonders das *TGM1*-Gen hat sich in dieser Arbeit im Rahmen der Assoziationsstudie als vielversprechend gezeigt und weitere Untersuchungen an diesem Gen sollten in Betracht gezogen werden. Auch das *KGF*-Gen ist funktionell von Bedeutung und im Rahmen der Assoziationsstudie in dieser Arbeit aufgefallen, allerdings ist die Frequenz des günstigen Allels des SNPs *KGF_1* sehr niedrig. Die Bearbeitung des Gens ist auch aufgrund der geringen Anzahl an SNPs schwierig. Hier wäre eine Analyse der mRNA, unter Umständen in Kombination mit einer Expressionsstudie, denkbar.

Eine Bearbeitung des Themas mit Hilfe des ovinen 50k Chip im Rahmen einer genomweiten Assoziationsstudie ist denkbar. Jedoch muss dabei beachtet werden,

dass von keinem der in dieser Arbeit untersuchten Gene SNPs auf dem Chip vertreten sind. Die Marker liegen im Vergleich zu anderen Haustierarten und besonders dem Menschen, für welchen der aktuellste Chip 1'000'000 Marker enthält, noch sehr weit auseinander. Die Wahrscheinlichkeit ist somit hoch, auch mit der Chip-Technologie nicht ursächliche Gene zu finden sondern weitere Marker, welche nur indirekt das Merkmal beeinflussen. Goddard & Hayes (2009) schätzten die benötigte Anzahl SNPs, um ursächliche Genabschnitte zu finden, für Studien innerhalb der Gattung Rind auf 300'000. Die SNPs sollten nicht mehr als 10 kb Abstand haben. Die interessanten Genregionen ließen sich trotz des verhältnismäßig großen Abstands zwischen den Markern weiter eingrenzen und könnten dann genau untersucht werden.

Allgemein bieten sich die Haut und ihre Barrierefunktion sowie die Klauenkonformität als Fokusthema an. Mehreren Arbeiten (Herrmann 1963, Emery *et al.* 1984, Thoms 2006) lieferten Hinweise, dass die Anfälligkeit gegenüber Klauenerkrankungen und Moderhinke beim Schaf damit in Zusammenhang steht. Studien an Ziegen zeigen einen deutlich harmloseren Verlauf der Moderhinke (Ghimire *et al.* 1999). Der Grund dafür wird unter anderem in ihrer dickeren Haut im Zwischenklauenspalt vermutet.

Eine Schwierigkeit bei der genetischen Untersuchung der Moderhinkeempfindlichkeit liegt in der Definition des Phänotyps. Es ist bekannt, dass unterschiedliche Individuen unterschiedlich stark erkranken und spontane Selbstheilung auftritt (Green & George 2008). Auch erkranken unter Feldbedingungen nicht alle Tiere gleichzeitig. Das Vorhandensein des Erregers auf der Klaue ist nicht gleichbedeutend mit einer Infektion, da das Festsetzen des Erregers an weiche oder verletzte Haut im Zwischenklauenspalt gebunden ist (Beveridge 1941), was in einem Versuch simuliert werden müsste. Daraus ergibt sich, dass die exakteste Bestimmung des Moderhinkestatus des einzelnen Tieres nur über engmaschige Verlaufskontrollen erfolgen kann, optimal in Verbindung mit einem Infektionsversuch mit einer definierten Menge an Erregern und unter gleichen Umweltbedingungen für alle Tiere. Um echte Kopplung

mit dem Merkmal zu bekommen, sollten zudem Rassen getrennt und nur nicht verwandte Tiere untersucht werden (Goddard & Hayes 2009).

Obwohl die Moderhinke seit vielen Jahrzehnten bekannt ist (Beveridge 1941) und sowohl für das Einzeltier als auch auf Herdenbasis eine Reihe Behandlungsvorschläge existieren (Hosie 2004, Lottner & Ganter 2004, Abbott & Lewis 2005, Strobel 2009, Bennett & Hickford 2011) stellt ihre Bekämpfung weiterhin ein großes Problem dar (Bennet & Hickford 2010). In Teilen Australiens (Macdonald 2009, Western Australia Department of Agriculture 2001), in Neuseeland (Greer 2005) sowie in der Schweiz (Beratungs- und Gesundheitsdienst für Klein-Wiederkäuer 2007) wurden deswegen nationale Bekämpfungsstrategien entwickelt. Dass eine Zucht auf eine deutlich verringerte Moderhinkeempfindlichkeit möglich ist, zeigt das Beispiel der Rasse Broomfield Corriedale (Skerman & Moorehouse 1987). Gerade im Hinblick auf die Entwicklung in der Schafhaltung hin zu größeren Herden in Koppelhaltung, um die Wirtschaftlichkeit zu erhalten, und andererseits durch den verstärkten Fokus auf Schafe zur Landschaftspflege (Eurostat 2011 <http://ec.europa.eu/eurostat>, Statistisches Bundesamt Deutschland 2011 <http://www.destatis.de>), ist eine gute Klauengesundheit wichtig und erstrebenswert. Eine Bekämpfung der Moderhinke allein durch Klauenschnitt und Klauenbad ist bei großen Herden häufig nicht ausreichend, da die Reinfektionsgefahr mit einer steigenden Tierzahl ebenfalls ansteigt. Zum Beispiel wenn aus Zeitgründen nur jeweils ein Teil der Herde behandelt wird oder werden kann (Kuhlemann 2011). Dies kann auch eine Erklärung für die Unterschiede in der Moderhinkeprävalenz auf den beiden untersuchten Betrieben sein. Betrieb 2, auf welchem jeweils im Wochenabstand nur ein Teil der Herde behandelt wurde, hat eine rund 17% höhere Prävalenz als Betrieb 1. Auf diesem, der 146 Tiere weniger hält, wurde die ganze Herde auf einmal behandelt.

Weniger empfängliche Tiere brauchen auf lange Sicht geringere Mengen an Arzneimitteln, Impfstoffen und Chemikalien (Greer 2005). Ein Aspekt, der nicht nur die Behandlungskosten senkt, sondern auch bezüglich einer geringeren Umweltbelastung (Lottner 2006) und der Gefahr einer möglichen Medikamentenresistenz erstrebenswert ist. Ebenso sollte der Tierschutzaspekt keinesfalls außer Acht gelassen

werden, da ein erkranktes Tier starke Schmerzen leidet (Ley *et al.* 1991, Ley *et al.* 1992, Ley *et al.* 1994, Kümper & Stumpf 2000).

Ein Problem bei der Zucht auf eine geringere Moderhinkeempfänglichkeit ist die mögliche Beeinträchtigung von Produktionsmerkmalen. In den bisher dazu durchgeführten Studien, welche sich mit den Wolleigenschaften befassten, konnten keine negativen Effekte ausgemacht werden (Marshall *et al.* 1991). Auch eine Beeinflussung der Parasitenresistenz gegen *Haemonchus contortus* konnte bisher nicht nachgewiesen werden (Woolaston 1993). Trotz dieser Arbeiten ist ein Einfluss auf Produktionsmerkmale oder Toleranzen gegenüber anderen Krankheiten, insbesondere parasitären Erkrankungen und Scrapie, durch SNPs aus der vorliegenden Arbeit oder Marker, die in Zukunft im Zusammenhang mit einer Moderhinketoleranz identifiziert werden, nicht auszuschließen.

6 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung von Sequenzvarianten in funktionellen Kandidatengenen, die einen Einfluss auf die Anfälligkeit von Schafen gegenüber der Erkrankung Moderhinke haben.

Als Probenmaterial standen 468 Blutproben von drei Betrieben mit Daten über den Moderhinkestatus zur Verfügung und 129 Proben eines Betriebs mit Daten zu Klauenbehandlungen. Zusätzlich wurden insgesamt 182 Proben der Rassen Braunes Bergschaf (32), Bentheimer Landschaf (32), Coburger Fuchsschaf (32), Graue Gehörnte Heidschnucke (32), Merinolandschaf (8), Rhönschaf (10) und Schwarzköpfiges Fleischschaf (16) zur Bestimmung von Allel- und Genotypfrequenzen untersucht.

Die kodierenden Abschnitte und angrenzende Bereiche der Gene Transglutaminase 1 (*TGM1*), Loricrin (*LOR*), keratinocyte growth factor (*KGF*) und des Gens für die γ -2 Untereinheit des Laminin-332 (*LAMC2*) wurden amplifiziert und sequenziert. Identifiziert wurden zwölf Varianten im *TGM1*-Gen, keine im *LOR*-Gen, vier im *KGF*-Gen und 46 im *LAMC2*-Gen. Die Allel- und Genotypfrequenzen ausgewählter SNPs wurden im Probenmaterial und in den Proben verschiedener Rassen mit MALDI-TOF MS bestimmt. Mit χ^2 - Test sowie Varianzanalyse wurden sie auf ihre Signifikanz im Zusammenhang mit einer Moderhinkeinfektion oder Klauenerkrankung untersucht.

Die Ergebnisse von χ^2 -Test einerseits und Varianzanalyse andererseits deckten sich nur zum Teil. Signifikante Unterschiede in den Genotypfrequenzen zwischen moderhinkepositiven und -negativen Tieren ergaben sich beim χ^2 -Test für die SNPs TGM1_5 (Betrieb 1 mit $p = 0,016$ bei der Momentaufnahme bzw. $p = 0,037$ bei Einbeziehen der Daten aus den Vorjahren, Betrieb 2 mit $p = 0,047$), LOR_chip (Betrieb 2 mit $p = 0,008$), KGF_1 (Betrieb 1 mit $p = 0,013$), LAMC2_1 (Betrieb 1 mit $p = 0,055$), LAMC2_14 (Betrieb 3 mit $p = 0,004$), LAMC2_15 (Betrieb 2 mit $p = 0,035$, Betrieb 3 mit $p = 0,012$), LAMC2_48 (Betrieb 3 mit $p = 0,037$). Bei der Varianzanalyse für Betrieb 1 und 2 hatten TGM1_5, KGF_1 und LAMC2_15 einen signifikanten

Einfluss ($p = 0,05$) auf den Moderhinkestatus, weder Gewicht noch Rasse auf den Betrieben hatten einen signifikanten Einfluss auf eine Moderhinkeerkrankung.

Bei keiner der untersuchten Rassen entsprachen die Genotypfrequenzen aller SNPs im Vergleich zu den Frequenzen bei den Merinolandschafen den Erwartungen bezüglich der in der Literatur erwähnten Moderhinkeanfälligkeit. Die Annahme einer geringeren Empfänglichkeit wird für das Braune Bergschaf durch die Genotypfrequenzen von LOR_chip, KGF_1, LAMC2_14 und LAMC2_15, beim Bentheimer Landschaf durch LAMC2_1 und beim Coburger Fuchsschaf durch LAMC2_14, LAMC2_15 und LAMC2_48 unterstützt. Für die Graue Gehörnte Heidschnucke entsprechen TGM1_5, LOR_chip und LAMC2_1 den Erwartungen, für das Deutsche Schwarzköpfige Fleischschaf LOR_chip, KGF_1, LAMC2_14 und LAMC2_15. Für das Rhönschaf kann eine geringere Moderhinkeempfänglichkeit auf Basis der Genotypfrequenzen der in dieser Untersuchung signifikanten SNPs nicht bestätigt werden.

7 Summary

The aim of this study was the identification of sequence variants in functional candidate genes, which influence the susceptibility of sheep against footrot.

For this purpose 468 blood samples from three farms with data on the footrot status and 129 blood samples from a farm with data on treatments of the claws were analysed. Additionally a total of 182 samples from the breeds Brown Mountain Sheep (32), Landrace of Bentheim (32), Coburger Fox Sheep (32), German Grey Heath (32), German Merino (8), Rhoen Sheep (10) and German Blackheaded Mutton Sheep (16) were used to determine allele and genotype frequencies.

The coding and adjacent regions of the transglutamine 1 (*TGM1*), loricrin (*LOR*), keratinocyte growth factor (*KGF*) genes and the gene for the γ -2 subunit of laminin-332 (*LAMC2*) were amplified and sequenced. Twelve variants were identified in the *TGM1*-gene, none in the *LOR*-gene, four in the *KGF*-gene and 46 in the *LAMC2*-gene. Selected SNPs were sequenced in the samples using MALDI-TOF MS. Their significance concerning infection with footrot or claw disease was tested using χ^2 test as well as analysis of variance.

The results from χ^2 test on the one hand and analysis of variance on the other did not completely match. Significant differences in the genotype frequencies were found for the SNPs TGM1_5 (farm 1 with $p = 0,016$ for the snapshot and $p = 0,037$ when looking at all available data, farm 2 with $p = 0,047$), LOR_chip (farm 2 with $p = 0,008$), KGF_1 (farm 1 with $p = 0,013$), LAMC2_1 (farm 1 with $p = 0,055$), LAMC2_14 (farm 3 with $p = 0,004$), LAMC2_15 (farm 2 with $p = 0,035$, farm 3 with $p = 0,012$) and LAMC2_48 (farm 3 with $p = 0,037$). With the analysis of variance including the data from farm 1 and 2 the genotype frequencies of the SNPs TGM1_5, KGF_1 and LAMC2_15 had a significant influence on footrot status while neither weight nor breed had a significant influence.

None of the SNP's genotypes matched the expected frequencies according to the susceptibility for footrot in all of the breeds used in this study compared to German Merino. The assumed lower susceptibility is being supported for Brown Mountain Sheep by the genotype frequencies of LOR_chip, KGF_1, LAMC2_14 and LAMC2_15,

for Landrace of Bentheim by LAMC2_1 and for Coburger Fox Sheep by LAMC2_14, LAMC2_15 and LAMC2_48. In the case of German Grey Heath TGM1_5, LOR_chip, LAMC2_1 match the expectations, for German Blackheaded Mutton it is supported by LOR_chip, KGF_1, LAMC2_14 and LAMC2_15. A lower susceptibility for footrot based on the genotype frequencies of the SNPs showing a significance in this study cannot be confirmed for Rhoen Sheep.

8 Literaturverzeichnis

- ABBOTT, K., EGERTON, J.** (2003): Eradication of footrot of lesser clinical severity (intermediate footrot). *Aust. Vet. J.* 81, 688–693.
- ABBOTT, K., LEWIS, C.** (2005): Current approaches to the management of ovine footrot. *Vet. J.* 169, 28–41.
- ABERDAM, D., GALLIANO, M., VAILLY, J., PULKKINEN, L., BONIFAS, J., CHRISTIANO, A., TRYGGVASON, K., UITTO, J., EPSTEIN, E., ORTONNE, J.** (1994): Herlitz's junctional epidermolysis bullosa is linked to mutations in the gene (*LAMC2*) for the gamma 2 subunit of nicein/kalinin (LAMININ-5). *Nat. Genet.* 6, 299–304.
- ALHAIDARI, Z., ORTONNE, J., PISANI, A.** (1994): Congenital ichthyosis in two Cavalier King Charles Spaniel littermates. *Vet. Dermatol.* 5, 117–121.
- ARCHIBALD, A., COCKETT, N., DALRYMPLE, B., FARAUT, T., KIJAS, J., MADDOX, J., MCEWAN, J., HUTTON ODDY, V., RAADSMAN, H., WADE, C., WANG, J., WANG, W., XUN, X.** (2010): The sheep genome reference sequence: a work in progress. *Anim. Genet.* 41, 449–453.
- ARRANZ, J., BAYÓN, Y., SAN PRIMITIVO, F.** (1998): Genetic relationships among Spanish sheep using microsatellites. *Anim. Genet.* 29, 435–440.
- AUMAILLEY, M., BRUCKNER-TUDERMAN, L., CARTER, W., DEUTZMANN, R., EDGAR, D., EKBLUM, P., ENGEL, J., ENGVALL, E., HOHENESTER, E., JONES, J., KLEINMAN, H., MARINKOVICH, M., MARTIN, G., MAYER, U., MENEGUZZI, G., MINER, J., MIYAZAKI, K., PATARROYO, M., PAULSSON, M., QUARANTA, V., SANES, J., SASAKI, T., SEKIGUCHI, K., SOROKIN, L., TALTS, J., TRYGGVASON, K., UITTO, J., VIRTANEN, I., MARK, K. VON DER, WEWER, U., YAMADA, Y., YURCHENCO, P.** (2005): A simplified laminin nomenclature. *Matrix Biol.* 24, 326–332.
- BAKER, J., WARD, W.** (1985): Ichthyosis in domestic animals: a review of the literature and a case report. *Br. Vet. J.* 141, 1–8.
- BANCROFT, D.** (1995): A microsatellite polymorphism at the ovine pituitary adenylate cyclase activating polypeptide gene in sheep which can be coamplified with two other loci. *Anim. Genet.* 26, 59.

- BANGSOW, T., DEUTSCH, U., ENGEL, H., KORFHAGE, C., LÖFFERT, D.** (2007): Polymerase-Kettenreaktion (PCR). In: JANSOHN, M. (Hrsg.): Gentechnische Methoden. Elsevier Spektrum Akad. Verl., München, 152–187.
- BECKER, D., TETENS, J., BRUNNER, A., BÜRSTEL, D., GANTER, M., KIJAS, J., DRÖGEMÜLLER, C.** (2010): Microphthalmia in Texel sheep is associated with a missense mutation in the paired-like homeodomain 3 (*PITX3*) gene. *PLoS ONE* 5, e8689.
- BELKNAP, E., DUNSTAN, R.** (1990): Congenital ichthyosis in a llama. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 197, 764–767.
- BELLOY, L., GIACOMETTI, M., BOUJON, P., WALDVOGEL, A.** (2007): Detection of *Dichelobacter nodosus* in wild ungulates (*Capra ibex ibex* and *Ovis aries musimon*) and domestic sheep suffering from foot rot using a two-step polymerase chain reaction. *J. Wildl. Dis.* 43, 82–88.
- BENNETT, G., HICKFORD, J., ZHOU, H., LAPORTE, J., GIBBS, J.** (2009): Detection of *Fusobacterium necrophorum* and *Dichelobacter nodosus* in lame cattle on dairy farms in New Zealand. *Res. Vet. Sci.* 87, 413–415
- BENNETT, G., HICKFORD, J.** (2011): Ovine footrot: New approaches to an old disease. *Vet. Microbiol.* 148, 1–7.
- BENTLEY, D.** (2004): Genomes for medicine. *Nature* 429, 440–445.
- BEVERIDGE, W.** (1941): Foot-rot in sheep: a transmissible disease due to infection with *Fusiformis Nodosus* (n. Sp.): Studies on its cause, epidemiology, and control. *Counc. Sci. Ind. Res. Bulletin No.* 140, 1–64.
- BOTSTEIN, D., RISCH, N.** (2003): Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. *Nat. Genet.* 33 Suppl, 228–237.
- BOTTARO, D., RUBIN, J., RON, D., FINCH, P., FLORIO, C., AARONSON, S.** (1990): Characterization of the receptor for keratinocyte growth factor. Evidence for multiple fibroblast growth factor receptors. *J. Biol. Chem.* 265, 12767–12770.
- BRAY, M., BOERWINKLE, E., DORIS, P.** (2001): High-throughput multiplex SNP genotyping with MALDI-TOF mass spectrometry: practice, problems and promise. *Hum. Mutat.* 17, 296–304.

- BRUCKNER-TUDERMAN, L.** (2005): Hereditäre Epidermolysen. In: BRAUN-FALCO, O., BURGENDORF, W., LANDTHALER, M., PLEWIG, G., WOLFF, H., (Hrsg.): Dermatologie und Venerologie. Springer Medizin, Heidelberg, 596–606.
- BULLER, N., ASHLEY, P., PALMER, M., PITMAN, D., RICHARDS, R., HAMPSON, D.** (2010): Understanding the molecular epidemiology of the footrot pathogen *Dichelobacter nodosus* to support control and eradication programs. J. Clin. Microbiol. 48, 877–882.
- BURGESON, R., CHIQUET, M., DEUTZMANN, R., EKBLUM, P., ENGEL, J., KLEINMAN, H., MARTIN, G., MENEGUZZI, G., PAULSSON, M., SANES, J.** (1994): A new nomenclature for the laminins. Matrix Biol. 14, 209–211.
- BURKE, J., PARKER, C.** (2007): Effect of breed on response to foot rot treatment in mature sheep and lambs. Small Ruminant Res. 71, 165–169.
- BUXMAN, M., BUEHNER, G., WEUPPER, K.** (1976): Isolation of substrates of epidermal transglutaminase from bovine epidermis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 73, 470–478.
- BYRNE, T., MCHUGH, M., CROMIE, A., PABIOU, T., DONNELLAN, P., AMER, P.** (2010): Calculation of the economic value of footrot for the irish sheep industry. World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Leipzig, 01.-06. August 2010, Abstract PP4-136.
- CANDI, E., MELINO, G., MELI, G., TARCSA, E., CHUNG, S., MAREKOV, L., STEINERT, P.** (1995): Biochemical, structural, and transglutaminase substrate properties of human loricrin, the major epidermal cornified cell envelope protein. J. Biol. Chem. 270, 26382–26390.
- CANDI, E., ODDI, S., PARADISI, A., TERRINONI, A., RANALLI, M., TEOFOLI, P., CITRO, G., SCARPATO, S., PUDDU, P., MELINO, G.** (2002): Expression of transglutaminase 5 in normal and pathologic human epidermis. J. Invest. Dermatol. 119, 670–677.
- CANDI, E., SCHMIDT, R., MELINO, G.** (2005): The cornified envelope: a model of cell death in the skin. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 6, 328–340.
- CAPON, F., ALLEN, M., AMEEN, M., BURDEN, A., TILLMAN, D., BARKER, J., TREMBATH, R.** (2004): A synonymous SNP of the corneodesmosin gene leads to increased mRNA stability and demonstrates association with psoriasis across diverse ethnic groups. Hum. Mol. Genet. 13, 2361–2368.

- CAVANAGH, C., JONAS, E., HOBBS, M., THOMSON, P., TAMMEN, I., RAADSMA, H. (2010): Mapping quantitative trait loci (QTL) in sheep. III. QTL for carcass composition traits derived from CT scans and aligned with a meta-assembly for sheep and cattle carcass QTL. *Genet. Sel. Evol.* 42, 36-50.
- CHAMPLAUD, M., LUNSTRUM, G., ROUSSELLE, P., NISHIYAMA, T., KEENE, D., BURGESSON, R. (1996): Human amnion contains a novel laminin variant, laminin 7, which like laminin 6, covalently associates with laminin 5 to promote stable epithelial-stromal attachment. *J. Cell Biol.* 132, 1189–1198.
- CHEETHAM, B., TANJUNG, L., SUTHERLAND, M., DRUITT, J., GREEN, G., MCFARLANE, J., BAILEY, G., SEAMAN, J., KATZ, M. (2006): Improved diagnosis of virulent ovine footrot using the intA gene. *Vet. Microbiol.* 116, 166–174.
- CHEETHAM, B., TATTERSALL, D., BLOOMFIELD, G., ROOD, J., KATZ, M. (1995): Identification of a gene encoding a bacteriophage-related integrase in a vap region of the *Dichelobacter nodosus* genome. *Gene* 162, 53–58.
- CHETWIN, D., WHITEHEAD, L., THORLEY, S. (1991): The recognition and prevalence of *Bacteroides nodosus* serotype M in Australia and New Zealand. *Aust. Vet. J.* 68, 154–155.
- CHITTICK, E., OLIVRY, T., DALLDORF, F., WRIGHT, J., DALE, B., WOLFE, B. (2002): Harlequin ichthyosis in two greater kudu (*Tragelaphus strepsiceros*). *Vet. Pathol.* 39, 751–756.
- CHU, M., YANG, J., FENG, T., CAO, G., FANG, L., DI, R., HUANG, D., TANG, Q., MA, Y., LI, K., LI, N. (2010): GDF9 as a candidate gene for prolificacy of Small Tail Han sheep. *Mol. Biol. Rep.* 38, 5199-5204
- CHUNG, S., FOLK, J. (1972): Transglutaminase from hair follicle of guinea pig (crosslinking-fibrin-glutamyllysine-isoenzymes-purified enzyme). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 69, 303–307.
- CLAXTON, P., RIBEIRO, L., EGERTON, J. (1983): Classification of *Bacteroides nodosus* by agglutination tests. *Aust. Vet. J.* 60, 331–334.
- COCKETT, N., JACKSON, S., SHAY, T., NIELSEN, D., MOORE, S., STEELE, M., BARENDSE, W., GREEN, R., GEORGES, M. (1994): Chromosomal localization of the callipyge gene in sheep (*Ovis aries*) using bovine DNA markers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 3019–3023.

- CONINGTON, J., GIBBONS, J., HASKELL, M., BÜNGER, L. (2010): Breeding for better animal health and welfare – The use of breeding to improve animal welfare. World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Leipzig, 01.-06. August 2010, Abstract 0057
- CONINGTON, J., HOSIE, B., NIEUWHOF, G., BISHOP, S., BÜNGER, L. (2008): Breeding for resistance to footrot - the use of hoof lesion scoring to quantify footrot in sheep. *Vet. Res. Commun.* 32, 583–589.
- CRAWFORD, A., DODDS, K., EDE, A., PIERSON, C., MONTGOMERY, G., GARMONSWAY, H., BEATTIE, A., DAVIES, K., MADDOX, J., KAPPES, S. (1995): An autosomal genetic linkage map of the sheep genome. *Genetics* 140, 703–724.
- CREDILLE, K., MINOR, J., BARNHART, K., LEE, E., COX, M., TUCKER, K., DIEGEL, K., VENTA, P., HOHL, D., HUBER, M., DUNSTAN, R. (2009): Transglutaminase 1-deficient recessive lamellar ichthyosis associated with a LINE-1 insertion in Jack Russell terrier dogs. *Br. J. Dermatol.* 161, 265–272.
- CREDILLE, K., PETERSEN, A., SONG, M., DUNSTAN, R. (1996): Clinical, histological, and ultrastructural features of ichthyosis in a cat and two dogs. *Vet. Pathol.* 33, 606.
- CREDILLE, K., VENTA, P., BREEN, M., LOWE, J., MURPHY, K., OSTRANDER, E., GALIBERT, F., DUNSTAN, R. (2001): DNA sequence and physical mapping of the canine transglutaminase 1 gene. *Cytogenet. Cell Genet.* 93, 73–76.
- DALRYMPLE, B., KIRKNESS, E., NEFEDOV, M., MCWILLIAM, S., RATNAKUMAR, A., BARRIS, W., ZHAO, S., SHETTY, J., MADDOX, J., O'GRADY, M., NICHOLAS, F., CRAWFORD, A., SMITH, T., JONG, P. DE, MCEWAN, J., ODDY, V., COCKETT, N. (2007): Using comparative genomics to reorder the human genome sequence into a virtual sheep genome. *Genome Biol.* 8, R152.
- DARDANO, S., GANDOLFI, B., PARMA, P., POLLI, M., BIGHIGNOLI, B., STRILLACCI, M., COZZI, M., MOLteni, L., LONGERI, M. (2007): Characterization of bovine *TGM1* and exclusion as candidate gene for ichthyosis in Chianina. *J. Hered.* 99, 81–83.
- DELÉTRAZ, C. (2002): Le piétin chez les ongulés sauvage: Étude clinique et épidémiologique chez les Bouquetin des Alpes. DVM thesis, École Nationale Vétérinaire de Lyon, Lyon, Frankreich.

- DEMIRKAN, I., CARTER, S., WINSTANLEY, C., BRUCE, K., MCNAIR, N., WOODSIDE, M., HART, C. (2001): Isolation and characterisation of a novel spirochaete from severe virulent ovine foot rot. *J. Med. Microbiol.* 50, 1061–1068.
- DEPIAZZI, L., RICHARDS, R., HENDERSON, J., ROOD, J., PALMER, M., PENHALE, W. (1991): Characterisation of virulent and benign strains of *Bacteroides nodosus*. *Vet. Microbiol.* 26, 151–160.
- DEPIAZZI, L., ROBERTS, W., HAWKINS, C., PALMER, M., PITMAN, D., MCQUADE, N., JELINEK, P., DEVEREAUX, D., RIPPON, R. (1998): Severity and persistence of footrot in Merino sheep experimentally infected with a protease thermostable strain of *Dichelobacter nodosus* at five sites. *Aust. Vet. J.* 76, 32–38.
- DEWHIRST, F., PASTER, B., LA FONTAINE, S., ROOD, J. (1990): Transfer of *Kingella indologenes* (Snell and Lapage 1976) to the genus *Suttonella* gen. nov. as *Suttonella indologenes* comb. nov.; transfer of *Bacteroides nodosus* (Beveridge 1941) to the genus *Dichelobacter* gen. nov. as *Dichelobacter nodosus* comb. nov.; and assignment of the genera *Cardiobacterium*, *Dichelobacter*, and *Suttonella* to *Cardiobacteriaceae* fam. nov. in the gamma division of Proteobacteria on the basis of 16S rRNA sequence comparisons. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40, 426–433.
- DHAWI, A., HART, C., DEMIRKAN, I., DAVIES, I., CARTER, S. (2005): Bovine digital dermatitis and severe virulent ovine foot rot: a common spirochaetal pathogenesis. *Vet. J.* 169, 232–241.
- DIRKSEN, G. (2006): Krankheiten der Bewegungsorgane. In: DIRKSEN, G., BAUMGARTNER, W. (Hrsg.): *Innere Medizin und Chirurgie des Rindes*. Parey, Stuttgart, 753–1029.
- EGERTON, J. (2007): Diseases of the feet – Foot-rot. In: AITKEN, I. D. (Hrsg.): *Diseases of sheep*. Blackwell Science, Oxford, UK, 274–277.
- EGERTON, J., PARSONSON, I. (1969): Benign foot-rot -- a specific interdigital dermatitis of sheep associated with infection by less proteolytic strains of *Fusiformis nodosus*. *Aust. Vet. J.* 45, 345–349.
- EGERTON, J., ROBERTS, D. (1971): Vaccination against ovine foot-rot. *J. Comp. Pathol.* 81, 179–185.

- EGERTON, J., ROBERTS, D., PARSONSON, I. (1969): The aetiology and pathogenesis of ovine foot-rot. I. A histological study of the bacterial invasion. *J. Comp. Pathol.* 79, 207–215.
- EMERY, D. (1984): Reactivity of sera from sheep immunised with individual outer membrane proteins of *Bacteroides nodosus* against heterologous bacterial strains. *Vet. Microbiol.* 9, 453–466.
- EMERY, D., STEWART, D., CLARK, B. (1984): The comparative susceptibility of five breeds of sheep to foot-rot. *Aust. Vet. J.* 61, 85–88.
- ENNEN, S., HAMANN, H., DISTL, O., HICKFORD, J., ZHOU, H., GANTER, M. (2009): A field trial to control ovine footrot via vaccination and genetic markers. *Small Ruminant Res.* 86, 22–25.
- ERLEWEIN, S. (2002): Genetische Untersuchungen über Klauenmerkmale beim Merinoland- und Rhönschaf. Diss. vet. med., Justus-Liebig-Universität, Gießen.
- ESCAYG, A. (1995): The ovine MHC class II region: polymorphism, organisation, and association with footrot. PhD thesis, Lincoln University, New Zealand.
- ESCAYG, A., HICKFORD, J., BULLOCK, D. (1997): Association between alleles of the ovine major histocompatibility complex and resistance to footrot. *Res. Vet. Sci.* 63, 283–287.
- FINCH, P., MURPHY, F., CARDINALE, I., KRUEGER, J. (1997): Altered expression of keratinocyte growth factor and its receptor in psoriasis. *Am. J. Pathol.* 151, 1619–1628.
- FINCH, P., RUBIN, J., MIKI, T., RON, D., AARONSON, S. (1989): Human KGF is FGF-related with properties of a paracrine effector of epithelial cell growth. *Science* 245, 752–755.
- GABRIEL, S., SCHAFFNER, S., NGUYEN, H., MOORE, J., ROY, J., BLUMENSTIEL, B., HIGGINS, J., DEFELICE, M., LOCHNER, A., FAGGART, M., LIU-CORDERO, S., ROTIMI, C., ADEYEMO, A., COOPER, R., WARD, R., LANDER, E., DALY, M., ALTSHULER, D. (2002): The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science* 296, 2225–2229.
- GANTER, M., LOTTNER, S. (2004): Moderhinke. Klauenkrankheiten III. *Dtsch. Schafzucht* 20, 4–6.

- GAO, J., LIU, K., LIU, H., BLAIR, H., LI, G., CHEN, C., TAN, P., MA, R. (2010): A complete DNA sequence map of the ovine major histocompatibility complex. *BMC Genomics* 11, 466.
- GEDICKE, M., TRAUPE, H., FISCHER, B., TINSCHERT, S., HENNIES, H. (2006): Towards characterization of palmoplantar keratoderma caused by gain-of-function mutation in lorycin: analysis of a family and review of the literature. *Br. J. Dermatol.* 154, 167–171.
- GELASAKIS, A., ARSENOS, G., HICKFORD, J., PSIFIDI, A., ZHOU, H., BANOS, G. (2010): Polymorphism Of The DQA2 Gene In The Chios Dairy Sheep Population And Its Association With Footrot. World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Leipzig, 01.-06. August 2010, Abstract PP4-148.
- GELDERMANN, H. (1975): Investigations on inheritance of quantitative characters in animals by genetic markers. I. *Methods Theor. Appl. Genet.* 46, 319–330.
- GHIMIRE, S., EGERTON, J., DHUNGYEL, O. (1999): Transmission of virulent footrot between sheep and goats. *Aust. Vet. J.* 77, 450–453.
- GHIMIRE, S., EGERTON, J., DHUNGYEL, O., JOSHI, H. (1998): Identification and characterisation of serogroup M among Nepalese isolates of *Dichelobacter nodosus*, the transmitting agent of footrot in small ruminants. *Vet. Microbiol.* 62, 217–233.
- GHIMIRE, S., WHITTINGTON, R., DHUNGYEL, O., JOSHI, H., EGERTON, J. (2002): Diagnosis of footrot in goats: application of ELISA tests for response to antigens of *Dichelobacter nodosus*. *Vet. Microbiol.* 87, 237–251.
- GHOHESTANI, R., LI, K., ROUSSELLE, P., UITTO, J. (2001): Molecular organization of the cutaneous basement membrane zone. *Clin. Dermatol.* 19, 551–562.
- GODDARD, M., HAYES, B. (2009): Mapping genes for complex traits in domestic animals and their use in breeding programmes. *Nat. Rev. Genet.* 10, 381–391.
- GOLDSMITH, L., BADEN, H., ROTH, S., COLMAN, R., LEE, L., FLEMING, B. (1974): Vertebral epidermal transamidases. *Biochim. Biophys. Acta* 351, 113–125.
- GORTARI, M. DE, FREKING, B., CUTHBERTSON, R., KAPPES, S., KEELE, J., STONE, R., LEYMASTER, K., DODDS, K., CRAWFORD, A., BEATTIE, C. (1998): A second-generation linkage map of the sheep genome. *Mamm. Genome* 9, 204–209.

- GRADIN, J., SONN, A., PETROVSKA, L.** (1993): Serogrouping of *Bacteroides nodosus* isolates from 62 sources in the United States. *Am. J. Vet. Res.* 54, 1069–1073.
- GRAHAM, N., EGERTON, J.** (1968): Pathogenesis of ovine foot-rot: the role of some environmental factors. *Aust. Vet. J.* 44, 235–240.
- GRATZL, M., WEDLICH, D.** (2005): Epithelgewebe. In: GRATZL, M. (Hrsg.), Junqueira, Carneiro: *Histologie*. Springer Medizin Verlag Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 38–57.
- GREEN, L., GEORGE, T.** (2008): Assessment of current knowledge of footrot in sheep with particular reference to *Dichelobacter nodosus* and implications for elimination or control strategies for sheep in Great Britain. *Vet. J.* 175, 173–180.
- GREEN, R.** (1985): A method to differentiate between virulent and benign isolated of *Bacteroides nodosus* based on the thermal stability of their extracellular proteinases. *New Zeal. Vet. J.* 33, 11–13.
- GREER, G.** (2005): The costs of footrot and the impact of the Footrot Gene-Marker Test in New Zealand – A report to the Sustainable Farming Fund. Agribusiness and Economics Research Unit, Lincoln University, NZ, Download unter http://www.lincoln.ac.nz/Documents/622_RR274_s2670.pdf. (Abruf am 28.02.2011).
- GUNDERSON, K., STEEMERS, F., LEE, G., MENDOZA, L., CHEE, M.** (2005): A genome-wide scalable SNP genotyping assay using microarray technology. *Nat. Genet.* 37, 549–554.
- GURUNG, R., DHUNGYEL, O., TSHERING, P., EGERTON, J.** (2006): The use of an autogenous *Dichelobacter nodosus* vaccine to eliminate clinical signs of virulent footrot in a sheep flock in Bhutan. *Vet. J.* 172, 356–363.
- HASHIMOTO, I., GEDDE-DAHL, T., SCHNYDER, U., ANTON-LAMPRECHT, I.** (1976): Ultrastructural studies in epidermolysis bullosa hereditaria. IV. Recessive dystrophic types with junctional blistering. (Infantile or Herlitz-Pearson type and adult type). *Arch. Dermatol. Res.* 257, 17–32.
- HERLITZ, G.** (1935): Kongenitaler, nicht syphilitischer Pemphigus. Eine Übersicht nebst Beschreibung einer neuen Krankheitsform (Epidermolysis bullosa hereditaria letalis). *Acta Paediatr.* 17, 315–371.

- HERMAN, M., FARASAT, S., STEINBACH, P., WEI, M.-H., TOURE, O., FLECKMAN, P., BLAKE, P., BALE, S., TORO, J.** (2009): Transglutaminase-1 gene mutations in autosomal recessive congenital ichthyosis: summary of mutations (including 23 novel) and modeling of TGase-1. *Hum. Mutat.* 30, 537–547.
- HERRMANN, H.-J.** (1963): Das Verhalten der Extremitäten im Röntgenbild und bei pathologisch-anatomischen Veränderungen der Klauen bei der Moderhinke der Schafe. *Diss. med. vet.*, Humboldt-Universität Berlin.
- HINTNER, H., WOLFF, K.** (1982): Generalized atrophic benign epidermolysis bullosa. *Arch. Dermatol.* 118, 375–384.
- HÖGER, P.** (2007): *Kinderdermatologie – Differenzialdiagnostik und Therapie bei Kindern und Jugendlichen.* Schattauer, Stuttgart. 2. Aufl.
- HOHL, D., MEHREL, T., LICHTI, U., TURNER, M., ROOP, D., STEINERT, P.** (1991): Characterization of human loricrin. Structure and function of a new class of epidermal cell envelope proteins. *J. Biol. Chem.* 266, 6626–6636.
- HOSIE, B.** (2004): Footrot and lameness in sheep. *Vet. Rec.* 154, 37–38.
- HOVEY, R., DAVEY, H., VONDERHAAR, B., MACKENZIE, D., MCFADDEN, T.** (2001): Paracrine action of keratinocyte growth factor (*KGF*) during ruminant mammaryogenesis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 181, 47–56.
- HUNT, J., JACKSON, D., BROWN, L., WOOD, P., STEWART, D.** (1994): Antigenic competition in a multivalent foot rot vaccine. *Vaccine* 12, 457–464.
- INADA, R., MATSUKI, M., YAMADA, K., MORISHIMA, Y., SHEN, S., KURAMOTO, N., YASUNO, H., TAKAHASHI, K., MIYACHI, Y., YAMANISHI, K.** (2000): Facilitated wound healing by activation of the Transglutaminase 1 gene. *Am. J. Pathol.* 157, 1875–1882.
- ISHIDA-YAMAMOTO, A., TAKAHASHI, H., IIZUKA, H.** (1998): Loricrin and human skin diseases: molecular basis of loricrin keratodermas. *Histol. Histopathol.* 13, 819–826.
- ISHIDA-YAMAMOTO, A.** (2003): Loricrin keratoderma: a novel disease entity characterized by nuclear accumulation of mutant loricrin. *J. Dermatol. Sci.* 31, 3–8.
- ITOH, N., ORNITZ, D.** (2011): Fibroblast growth factors: from molecular evolution to roles in development, metabolism and disease. *J. Biochem.* 149, 121–130.

- JANETT, F. (1993): Bekämpfung der Moderhinke auf Herdenbasis. Diss. med. vet., Universität Zürich.
- JARNIK, M., VIRAGH, P. DE, SCHÄRER, E., BUNDMAN, D., SIMON, M., ROOP, D., STEVEN, A. (2002): Quasi-normal cornified cell envelopes in loricrin knockout mice imply the existence of a loricrin backup system. *J. Invest. Dermatol.* 118, 102–109.
- JENSEN, J., ESTERLY, N. (1977): The ichthyosis mouse: histologic, histochemical, ultrastructural, and autoradiographic studies of interfollicular epidermis. *J. Invest. Dermatol.* 68, 23–31.
- JIANG, Q.-J., UITTO, J. (2005): Animal models of epidermolysis bullosa—targets for gene therapy. *J. Invest. Dermatol.* 124, 11–13.
- JOHNSON, D., WILLIAMS, L. (1993): Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. *Adv. Cancer Res.* 60, 1–41.
- JOPP, A., JACKSON, R., MULVANEY, C. (1984a): A survey on the prevalence, treatment and control of footrot in Central Otago. *New Zeal. Vet. J.* 32, 172–173.
- JOPP, A., JACKSON, R., MULVANEY, C. (1984b): A perspective on ovine footrot control. *New Zeal. Vet. J.* 32, 211–212.
- JORDE, L., WATKINS, W., BAMSHAD, M., DIXON, M., RICKER, C., SEIELSTAD, M., BATZER, M. (2000): The distribution of human genetic diversity: a comparison of mitochondrial, autosomal, and Y-chromosome data. *Am. J. Hum. Genet.* 66, 979–988.
- KALER, J., MEDLEY, G., GROGONO-THOMAS, R., WELLINGTON, E., CALVO-BADO, L., WASSINK, G., KING, E., MOORE, L., RUSSELL, C., GREEN, L. (2010): Factors associated with changes of state of foot conformation and lameness in a flock of sheep. *Prev. Vet. Med.* 97, 237–244.
- KALLUNKI, T., IKONEN, J., CHOW, L., KALLUNKI, P., TRYGGVASON, K. (1991): Structure of the human laminin B2 chain gene reveals extensive divergence from the laminin B1 chain gene. *J. Biol. Chem.* 266, 221–228.
- KAUPE, B., WINTER, A., FRIES, R., ERHARDT, G. (2004): DGAT1 polymorphism in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle breeds. *J. Dairy Res.* 71, 182–187.

- KEMP, D., SMITH, D., FOOTE, S., SAMARAS, N., PETERSON, M.** (1989): Colorimetric detection of specific DNA segments amplified by polymerase chain reactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 2423–2427.
- KERKMANN, A.** (2008): Untersuchungen zu kongenitalen Anomalien bei Schaf und Ziege. *Diss. med. vet., Tierärztliche Hochschule, Hannover.*
- KERKMANN, A., GANTER, M., FRASE, R., OSTMEIER, M., HEWICKER-TRAUTWEIN, M., DISTL, O.** (2010): Epidermolysis bullosa in German black headed mutton sheep. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* 123, 413–421.
- KIM, H., LEWIS, M., GORMAN, J., PARK, S., GIRARD, J., FOLK, J., CHUNG, S.** (1990): Protransglutaminase E from guinea pig skin. Isolation and partial characterization. *J. Biol. Chem.* 265, 21971–21978.
- KIVIRIKKO, S., MCGRATH, J., BAUDOIN, C., ABERDAM, D., CIATTI, S., DUNNILL, M., MCMILLAN, J., EADY, R., ORTONNE, J., MENEGUZZI, G.** (1995): A homozygous nonsense mutation in the alpha 3 chain gene of laminin 5 (LAMA3) in lethal (Herlitz) junctional epidermolysis bullosa. *Hum. Mol. Genet.* 4, 959–962.
- KORGE, B., ISHIDA-YAMAMOTO, A., PÜNTER, C., DOPPING-HEPENSTAL, P., IIZUKA, H., STEPHENSON, A., EADY, R., MUNRO, C.** (1997): Loricrin mutation in Vohwinkel's keratoderma is unique to the variant with ichthyosis. *J. Invest. Dermatol.* 109, 604–610.
- KRÜGEL, J., MIOSGE, N.** (2010): Basement membrane components are key players in specialized extracellular matrices. *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 2879–2895.
- KUHLEMANN, J.** (2011): Epidemiologie und Bekämpfung der Moderhinke auf regionaler Ebene. *Diss. med. vet., Tierärztliche Hochschule, Hannover.*
- KÜMPER, H., STUMPF, H.** (2000): Moderhinke als Tierschutzproblem. In: 7. Tagung "Schaf und Ziegenkrankheiten" der Fachgruppe Krankheiten der kleinen Wiederkäuer in Verbindung mit der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz der Justus-Liebig-Universität Gießen, Gießen 12. Mai 2000, 1–5.
- KÜSTER, W.** (2005): Verhornungsstörungen. In: BRAUN-FALCO, O., BURGDORF, W., LANDTHALER, M., PLEWIG, G., WOLFF, H.: *Dermatologie und Venerologie.* Springer Medizin, Heidelberg, 738–762.

- KWOK, P.** (2001): Methods for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2, 235–258.
- LA FONTAINE, S., EGERTON, J., ROOD, J.** (1993): Detection of *Dichelobacter nodosus* using species-specific oligonucleotides as PCR primers. *Vet. Microbiol.* 35, 101–117.
- LAING, E., EGERTON, J.** (1978): The occurrence, prevalence and transmission of *Bacteroides nodosus* infection in cattle. *Res. Vet. Sci.* 24, 300–304.
- LAMBELL, R.** (1986): A field trial with a commercial vaccine against foot-rot in sheep. *Aust. Vet. J.* 63, 415–418.
- LEY, S., WATERMAN, A., LIVINGSTON, A., PARKINSON, T.** (1994): Effect of chronic pain associated with lameness on plasma cortisol concentrations in sheep: a field study. *Res. Vet. Sci.* 57, 332–335.
- LEY, S., LIVINGSTON, A., WATERMAN, A.** (1992): Effects of clinically occurring chronic lameness in sheep on the concentrations of plasma noradrenaline and adrenaline. *Res. Vet. Sci.* 53, 122–125.
- LEY, S., LIVINGSTON, A., WATERMAN, A.** (1991): Effects of chronic lameness on the concentrations of cortisol, prolactin and vasopressin in the plasma of sheep. *Vet. Rec.* 129, 45–47.
- LIU, D.** (1994): Development of gene probes of *Dichelobacter nodosus* for differentiating strains causing virulent, intermediate or benign ovine footrot. *Br. Vet. J.* 150, 451–462.
- LORAND, L., GRAHAM, R.** (2003): Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 140–156.
- LOTTNER, S.** (2006): Felduntersuchung zur Bekämpfung der Moderhinke bei Schafen mittels Vakzinen und genetischer Marker. *Diss. med. vet., Tierärztliche Hochschule, Hannover.*
- LOTTNER, S., GANTER, M.** (2004): Moderhinke konsequent und erfolgreich sanieren. *Klauenkrankheiten IV. Dtsch. Schafzucht* 21, 4–8.
- LÜHKEN, G.** (2007): Molekulare Charakterisierung des Interleukin-2-Gens von Schaf-, Ziegen- und Rinderarten sowie Kartierung und funktionelle Analyse von DNA-

- Varianten des Interleukin-2-Gens von *Ovis aries*. Diss. med. vet., Justus-Liebig-Universität Gießen.
- LUSIS, A. (1988): Genetic factors affecting blood lipoproteins: the candidate gene approach. *J. Lipid Res.* 29, 397–429.
- MACDONALD, I. (Media Release: 28.07.2009): Footrot controlled in NSW after 20 year battle. NSW Department of Primary Industries, New South Wales, Australia, Download unter http://www.dpi.nsw.gov.au/_data/assets/pdf_file/0017/291212/Footrot-controlled-in-NSW-after-20-year-battle.pdf. (Abruf 20.12.2010).
- MADDOX, J., DAVIES, K., CRAWFORD, A., HULME, D., VAIMAN, D., CRIBIU, E., FREKING, B., BEH, K., COCKETT, N., KANG, N., RIFFKIN, C., DRINKWATER, R., MOORE, S., DODDS, K., LUMSDEN, J., VAN STIJN, T., PHUA, S., ADELSON, D., BURKIN, H., BROOM, J., BUITKAMP, J., CAMBRIDGE, L., CUSHWA, W., GERARD, E., GALLOWAY, S., HARRISON, B., HAWKEN, R., HIENDLEDER, S., HENRY, H., MEDRANO, J., PATERSON, K., SCHIBLER, L., STONE, R., VAN HEST, B. (2001): An enhanced linkage map of the sheep genome comprising more than 1000 loci. *Genome Res.* 11, 1275–1289.
- MAESTRINI, E., MONACO, A., MCGRATH, J., ISHIDA-YAMAMOTO, A., CAMISA, C., HOVNANIAN, A., WEEKS, D., LATHROP, M., UITTO, J., CHRISTIANO, A. (1996): A molecular defect in lorocrin, the major component of the cornified cell envelope, underlies Vohwinkel's syndrome. *Nat. Genet.* 13, 70–77.
- MARCHESE, C., CHEDID, M., DIRSCH, O., CSAKY, K., SANTANELLI, F., LATINI, C., LAROCHELLE, W., TORRISI, M., AARONSON, S. (1995): Modulation of keratinocyte growth factor and its receptor in reepithelializing human skin. *J. Exp. Med.* 182, 1369–1376.
- MARSHALL, D., WALKER, R., CULLIS, B., LUFF, M. (1991): The effect of footrot on body weight and wool growth of sheep. *Aust. Vet. J.* 68, 45–49.
- MARTIN, G., TIMPL, R. (1987): Laminin and other basement membrane components. *Annu. Rev. Cell Biol.* 3, 57–85.
- MATTICK, J., ANDERSON, B., COX, P., DALRYMPLE, B., BILLS, M., HOBBS, M., EGERTON, J. (1991): Gene sequences and comparison of the fimbrial subunits representative of *Bacteroides nodosus* serotypes A to I: class I and class II strains. *Mol. Microbiol.* 5, 561–573.

- MEHREL, T., HOHL, D., ROTHNAGEL, J., LONGLEY, M., BUNDMAN, D., CHENG, C., LICHTI, U., BISHOP, M., STEVEN, A., STEINERT, P.** (1990): Identification of a major keratinocyte cell envelope protein, loricrin. *Cell* 61, 1103–1112.
- MERKER, H.** (1994): Morphology of the basement membrane. *Microsc. Res. Tech.* 28, 95–124.
- MIKI, T., BOTTARO, D., FLEMING, T., SMITH, C., BURGESS, W., CHAN, A., AARONSON, S.** (1992): Determination of ligand-binding specificity by alternative splicing: two distinct growth factor receptors encoded by a single gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 246–250.
- MILLS, J., ZARLENGA, D., DYER, R.** (2009a): Bovine coronary region keratinocyte colony formation is supported by epidermal-dermal interactions. *J. Dairy Sci.* 92, 1913–1923.
- MILLS, J., ZARLENGA, D., HABECKER, P., DYER, R.** (2009b): Age, segment, and horn disease affect expression of cytokines, growth factors, and receptors in the epidermis and dermis of the bovine claw. *J. Dairy Sci.* 92, 5977–5987.
- MITCHELL, J., MCINNES, C.** (1998): Cloning of a cDNA encoding ovine keratinocyte growth factor. *DNA Seq.* 9, 121–123.
- MÖMKE, S., KERKMANN, A., WÖHLKE, A., OSTMEIER, M., HEWICKER-TRAUTWEIN, M., GANTER, M., KIJAS, J., DISTL, O.** (2011): A frameshift mutation within LAMC2 is responsible for Herlitz type junctional epidermolysis bullosa (HJEB) in black headed mutton sheep. *PLoS ONE* 6, e18943.
- MONTGOMERY, G., SISE, J.** (1990): Extraction of DNA from sheep white blood cells. *New Zeal. J. Agr. Res.*, 437–441.
- MOORE, L., WASSINK, G., GREEN, L., GROGONO-THOMAS, R.** (2005): The detection and characterisation of *Dichelobacter nodosus* from cases of ovine footrot in England and Wales. *Vet. Microbiol.* 108, 57–67.
- MOORE, S., SARGEANT, L., KING, T., MATTICK, J., GEORGES, M., HETZEL, D.** (1991): The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. *Genomics* 10, 654–660.
- MORGAN, K.** (1987): Footrot. In *Practice* 9, 124–129.

- MÜLHARDT, C. (2009): Der Experimentator: Molekularbiologie, Genomics. Spektrum Akad. Verl., Heidelberg. 6. Aufl., 316 S.
- MULLIS, K., FALOONA, F. (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155, 335–350.
- NACKLEY, A., SHABALINA, S., TCHIVILEVA, I., SATTERFIELD, K., KORCHYNSKYI, O., MAKAROV, S., MAIXNER, W., DIATCHENKO, L. (2006): Human catechol-O-methyltransferase haplotypes modulate protein expression by altering mRNA secondary structure. *Science* 314, 1930–1933.
- NAYLOR, R., MARTIN, P., JONES, J., BURNELL, M. (1998): Isolation of spirochaetes from an incident of severe virulent ovine footrot. *Vet. Rec.* 143, 690–691.
- NEMES, Z., STEINERT, P. (1999): Bricks and mortar of the epidermal barrier. *Exp. Mol. Med.* 31, 5–19.
- NG, P., LEVY, S., HUANG, J., STOCKWELL, T., WALENZ, B., LI, K., AXELROD, N., BUSAM, D., STRAUSBERG, R., VENTER, J. (2008): Genetic variation in an individual human exome. *PLoS Genet.* 4, e1000160.
- NGUYEN, B., RYAN, M., GIL, S., CARTER, W. (2000): Deposition of laminin 5 in epidermal wounds regulates integrin signaling and adhesion. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 554–562.
- NIEUWHOF, G., BISHOP, S. (2005): Costs of the major endemic diseases of sheep in Great Britain and the potential benefits of reduction in disease impact. *Anim. Sci.* 81, 23–29.
- NIEUWHOF, G., BISHOP, S., HILL, W., RAADSMA, H. (2008a): The effect of footrot on weight gain in sheep. *Animal* 2, 1427–1436.
- NIEUWHOF, G., CONINGTON, J., BÜNGER, L., HARESIGN, W., BISHOP, S. (2008b): Genetic and phenotypic aspects of foot lesion scores in sheep of different breeds and ages. *Animal* 2, 1289–1296.
- NUSS, K., JANETT, F. (2007): Lahmheiten beim kleinen Wiederkäuer. Abteilung Chirurgie und Orthopädie, Klinik für Wiederkäuer der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität München, Download unter <http://www2.vetmed.uni-muenchen.de/med2/lehre/CM13.pdf>. (Abruf am 10.01.2011).

- O'MEARA, T., EGERTON, J., RAADSMA, H.** (1993): Recombinant vaccines against ovine footrot. *Immunol. Cell Biol.* 71, 473–488.
- ORNITZ, D., YAYON, A., FLANAGAN, J., SVAHN, C., LEVI, E., LEDER, P.** (1992): Heparin is required for cell-free binding of basic fibroblast growth factor to a soluble receptor and for mitogenesis in whole cells. *Mol. Cell. Biol.* 12, 240–247.
- OUTTERIDGE, P., STEWART, D., SKERMAN, T., DUFTY, J., EGERTON, J., FERRIER, G., MARSHALL, D.** (1989): A positive association between resistance to ovine footrot and particular lymphocyte antigen types. *Aust. Vet. J.* 66, 175–179.
- PETER, C.** (2005): Molekulargenetische Charakterisierung von Schafrassen Europas und des Nahen Ostens auf der Basis von Mikrosatelliten. Diss. med. vet., Justus-Liebig-Universität, Gießen.
- PETER, C., BRUFORD, M., PEREZ, T., DALAMITRA, S., HEWITT, G., ERHARDT, G.** (2007): Genetic diversity and subdivision of 57 European and Middle-Eastern sheep breeds. *Anim. Genet.* 38, 37–44.
- PETERSON, L., ZETTERGREN, J., WUEPPER, K.** (1983): Biochemistry of transglutaminases and cross-linking in the skin. *J. Invest. Dermatol.* 81, 95s-100s.
- PETKOVSKI, E., KEYSER-TRACQUI, C., HIENNE, R., LUDES, B.** (2005): SNPs and MALDI-TOF MS: tools for DNA typing in forensic paternity testing and anthropology. *J. Forensic Sci.* 50, 535–541.
- PULKKINEN, L., CHRISTIANO, A., AIRENNE, T., HAAKANA, H., TRYGGVASON, K., UITTO, J.** (1994): Mutations in the gamma 2 chain gene (*LAMC2*) of kalinin/laminin 5 in the junctional forms of epidermolysis bullosa. *Nat. Genet.* 6, 293–297.
- PULKKINEN, L., MCGRATH, J., CHRISTIANO, A., UITTO, J.** (1995): Detection of sequence variants in the gene encoding the beta 3 chain of laminin 5 (*LAMB3*). *Hum. Mutat.* 6, 77–84.
- RAADSMA, H., MCEWAN, J., STEAR, M., CRAWFORD, A.** (1999): Genetic characterisation of protective vaccine responses in sheep using multivalent *Dichelobacter nodosus* vaccines. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 72, 219–229.
- RAADSMA, H., JONAS, E., MCGILL, D., HOBBS, M., LAM, M., THOMSON, P.** (2009b): Mapping quantitative trait loci (QTL) in sheep. II. Meta-assembly and identification of novel QTL for milk production traits in sheep. *Genet. Sel. Evol.* 41, Article 45.

- RAADSMAN, H., THOMSON, P., ZENGER, K., CAVANAGH, C., LAM, M., JONAS, E., JONES, M., ATTARD, G., PALMER, D., NICHOLAS, F.** (2009a): Mapping quantitative trait loci (QTL) in sheep. I. A new male framework linkage map and QTL for growth rate and body weight. *Genet. Sel. Evol.* 41, Article 34.
- RAGOUSSIS, J., ELVIDGE, G., KAUR, K., COLELLA, S.** (2006): Matrix-assisted laser desorption/ionisation, time-of-flight mass spectrometry in genomics research. *PLoS Genet.* 2, e100.
- RAHMANN, G.** (2003): Moderhinke-Empfindlichkeit und Therapie bei unterschiedlichen Fleischschafzuchten. *Dtsch. Schafzucht* 7, 4–7.
- RICHARDS, R., DEPIAZZI, L., EDWARDS, J., WILKINSON, F.** (1980): Isolation and characterisation of *Bacteroides nodosus* from foot lesions of cattle in Western Australia. *Aust. Vet. J.* 56, 517–521.
- ROBERTS, D., EGERTON, J.** (1969): The aetiology and pathogenesis of ovine foot-rot. II. The pathogenic association of *Fusiformis nodosus* and *F. necrophorus*. *J. Comp. Pathol.* 79, 217–227.
- RODRÍGUEZ-PAZOS, L., GINARTE, M., VEGA-GLIEMMO, A., TORIBIO, J.** (2009): Lamellar ichthyosis with a novel homozygous C-terminal mutation in the transglutaminase-1 gene. *Int. J. Dermatol.* 48, 1195–1197.
- ROSS, P., HALL, L., SMIRNOV, I., HAFF, L.** (1998): High level multiplex genotyping by MALDI-TOF mass spectrometry. *Nat. Biotechnol.* 16, 1347–1351.
- ROTHBARD, S., WATSON, R.** (1972): Demonstration of collagen in human tissues by immunofluorescence. *Lab. Invest.* 27, 76–84.
- ROUSSELLE, P., KEENE, D., RUGGIERO, F., CHAMPLAUD, M., REST, M., BURGESSON, R.** (1997): Laminin 5 binds the NC-1 domain of type VII collagen. *J. Cell Biol.* 138, 719–728.
- ROUSSELLE, P., LUNSTRUM, G., KEENE, D., BURGESSON, R.** (1991): Kalinin: an epithelium-specific basement membrane adhesion molecule that is a component of anchoring filaments. *J. Cell Biol.* 114, 567–576.
- ROZEN, S., SKALETSKY, H.** (2000): Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol. Biol.* 132, 365–386.

- RUBIN, J., OSADA, H., FINCH, P., TAYLOR, W., RUDIKOFF, S., AARONSON, S.** (1989): Purification and characterization of a newly identified growth factor specific for epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 802–806.
- RUSSELL, L., DIGIOVANNA, J., HASHEM, N., COMPTON, J., BALE, S.** (1994): Linkage of autosomal recessive lamellar ichthyosis to chromosome 14q. *Am. J. Hum. Genet.* 55, 1146–1152.
- RUSSELL, L., DIGIOVANNA, J., ROGERS, G., STEINERT, P., HASHEM, N., COMPTON, J., BALE, S.** (1995): Mutations in the gene for transglutaminase 1 in autosomal recessive lamellar ichthyosis. *Nat. Genet.* 9, 279–283.
- RUSSELL, V., BISHOP, S., MEDLEY, G., GREEN, L.** (2010): Factors affecting the presentation of footrot and interdigital dermatitis in a UK sheep flock. World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Leipzig, 01.-06. August 2010, Abstract PP4-144.
- RYAN, M., TIZARD, R., VANDEVANTER, D., CARTER, W.** (1994): Cloning of the LamA3 gene encoding the alpha 3 chain of the adhesive ligand epiligrin. Expression in wound repair. *J. Biol. Chem.* 269, 22779–22787.
- RYSER, M., HOBY, S.** (2004): Merkblatt Moderhinke. Zentrum für Fisch- und Wildtierbiologie. Universität Bern, Schweiz, Download unter <http://www.itpa.vetsuisse.unibe.ch/fiwi/downloads/Moderhinke.pdf>. (Abruf am 10.01.2011).
- SAMBRAUS, H.** (2010): Gefährdete Nutzierrassen – Ihre Zuchtgeschichte, Nutzung und Bewahrung. Ulmer Verlag, Stuttgart. 3. Aufl.
- SAMBRAUS, H.** (2001): Farbatlas Nutzierrassen, Ulmer Verlag, Stuttgart. 6. Aufl.
- SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A.** (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 5463–5467.
- SARKAR, N., CLARKE, D., WAELSCH, H.** (1957): An enzymically catalyzed incorporation of amines into proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 25, 451–452.
- SAUNA, Z., KIMCHI-SARFATY, C., AMBUDKAR, S., GOTTESMAN, M.** (2007): Silent polymorphisms speak: how they affect pharmacogenomics and the treatment of cancer. *Cancer Res.* 67, 9609–9612.

- SAWALHA, R., NAVAJAS, E., DUTHIE, C., ROEHE, R., ROUGHSEDGE, T.** (2010): Selection responses in UK sheep breeding program with the application of genomic selection and inclusion of production efficiency traits. World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Leipzig, 01.-06. August 2010, Abstract PP2-155.
- SCHLÖTTERER, C.** (2004): The evolution of molecular markers -- just a matter of fashion? *Nat. Rev. Genet.* 5, 63–69.
- SCHMUTH, M., FLUHR, J., CRUMRINE, D., UCHIDA, Y., HACHEM, J.-P., BEHNE, M., MOSKOWITZ, D., CHRISTIANO, A., FEINGOLD, K., ELIAS, P.** (2004): Structural and functional consequences of loricrin mutations in human loricrin keratoderma (Vohwinkel syndrome with ichthyosis). *J. Invest. Dermatol.* 122, 909–922.
- SCHULER, A.** (1996): Moderhinke in Tiroler Schafzuchtbetrieben. Diss. med. vet., Veterinärmedizinische Universität, Wien.
- SELBITZ, H.-J.** (2001): Bakterielle Krankheiten. In: BEHRENS, H., GANTER, M., HIEPE, T., BRAUN, U.: *Lehrbuch der Schafkrankheiten*. Parey, Berlin, 216–279.
- SELMANOWITZ, V.** (1971): Ectodermal dysplasias in cattle. Analogues in man. *Br. J. Dermatol.* 84, 258–265.
- SKERMAN, T., JOHNSON, D., KANE, D., CLARKE, J.** (1988): Clinical footscald and footrot in a New Zealand Romney flock: phenotypic and genetic parameters. *Aust. J. Agric. Res.* 39, 907–916.
- SKERMAN, T., MOORHOUSE, S.** (1987): Broomfield Corriedales: a strain of sheep selectively bred for resistance to footrot. *N. Z. Vet. J.* 35, 101–106.
- SOKOLOV, B.** (1990): Primer extension technique for the detection of single nucleotide in genomic DNA. *Nucleic Acids Res.* 18, 3671.
- STEINERT, P., MAREKOV, L.** (1995): The proteins elafin, filaggrin, keratin intermediate filaments, loricrin, and small proline-rich proteins 1 and 2 are isodipeptide cross-linked components of the human epidermal cornified cell envelope. *J. Biol. Chem.* 270, 17702–17711.
- STEWART, D.** (1978): The role of various antigenic fractions of *Bacteroides nodosus* in eliciting protection against foot-rot in vaccinated sheep. *Res. Vet. Sci.* 24, 14–19.
- STROBEL, H.** (2009): *Klauenpflege Schaf und Ziege – Grundlagen, Praxis, Moderhinke*. Ulmer Verlag, Stuttgart.

- STROM, M., LORY, S. (1993): Structure-function and biogenesis of the type IV pili. *Annu. Rev. Microbiol.* 47, 565–596.
- THOMS, H. (2006): Untersuchungen zum genetischen Hintergrund der Moderhinke beim Rhön- und Merinolandschaf auf der Basis von Klauenmaßen und biochemischen Polymorphismen. Diss. med. vet., Justus-Liebig-Universität Gießen.
- THONGNOPPAKHUN, W., JIEMSUP, S., YONGKIETTRAKUL, S., KANJANAKORN, C., LIMWONGSE, C., WILAIRAT, P., VANASANT, A., RUNGROJ, N., YENCHITSOMANUS, P.-T. (2009): Simple, efficient, and cost-effective multiplex genotyping with matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of hemoglobin beta gene mutations. *J Mol Diagn* 11, 334–346.
- TIMPL, R., ROHDE, H., ROBESY, P., RENNARD, S., FOIDART, J., MARTIN, G. (1979): Laminin—a glycoprotein from basement membranes. *J. Biol. Chem.* 254, 9933–9937.
- VAIMAN, D., PAILHOUX, E., PAYEN, E., SAÏDI-MEHTAR, N., COTINOT, C. (1995): Evolutionary conservation of a microsatellite in the Wilms tumour (WT) gene: mapping in sheep and cattle. *Cytogenet. Cell Genet.* 70, 112–115.
- VENTER, J., ADAMS, M., MYERS, E., LI, P., MURAL, R., SUTTON, G., SMITH, H., YANDELL, M., EVANS, C., HOLT, R., GOCAYNE, J., AMANATIDES, P., BALLEW, R., HUSON, D., WORTMAN, J., ZHANG, Q., KODIRA, C., ZHENG, X., CHEN, L., SKUPSKI, M., SUBRAMANIAN, G., THOMAS, P., ZHANG, J., GABOR MIKLOS, G., NELSON, C., BRODER, S., CLARK, A., NADEAU, J., MCKUSICK, V., ZINDER, N., LEVINE, A., ROBERTS, R., 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, A., GAN, W., GE, W., GONG, F., GU, Z., GUAN, P., HEIMAN, T., HIGGINS, M., JI, R., KE, Z., KETCHUM, K., LAI, Z., LEI, Y., LI, Z., LI, J., LIANG, Y., LIN, X., LU, F., MERKULOV, G., MILSHINA, N., MOORE, H., NAIK, A., NARAYAN, V., NEELAM, B., NUSSKERN, D., RUSCH, D., 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, M., 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., HLDUN, 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, Y., ROMBLAD, D., RUHFEL, B., SCOTT, R., SITTER, C., SMALLWOOD, M., STEWART, E., STRONG, R., SUH, E., THOMAS, R., TINT, N., TSE, S., VECH, C., WANG, G., WETTER, J., WILLIAMS, S., WILLIAMS, M., WINDSOR, S., WINN-DEEN, E., WOLFE, K., ZAVERI, J., ZAVERI, K., ABRIL, J., GUIGÓ, R., CAMPBELL, M., SJOLANDER, K., 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., YOUSEPH, S., ALLEN, D., BASU, A., BAXENDALE, J., BLICK, L., CAMINHA, M., CARNES-STINE, J., CAULK, P., CHIANG, Y., 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., ZHU, X. (2001): The sequence of the human genome. *Science* 291, 1304–1351.
- VENTER, J., ADAMS, M., SUTTON, G., KERLAVAGE, A., SMITH, H., HUNKAPILLER, M. (1998): Shotgun sequencing of the human genome. *Science* 280, 1540–1542.
- VOLMER, K., HECHT, W., WEIB, R., GRAUHEDING, D. (2008): Treatment of foot rot in free-ranging mouflon (*Ovis gmelini musimon*) populations – does it make sense? *Eur. J. Wildl. Res.* 54, 657–665.
- WAGNER, H. (2009): Erhaltung der Population der Bentheimer Landschaft unter Minimierung der Inzucht und Berücksichtigung der Zucht auf Scrapie-Resistenz. *Diss. agr., Justus-Liebig-Universität Gießen.*
- WALSH, C., XU, G. (2006): Cytosine methylation and DNA repair. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 301, 283–315.

- WANI, S., SAMANTA, I. (2006): Current understanding of the aetiology and laboratory diagnosis of footrot. *Vet. J.* 171, 421–428.
- WANI, S., SAMANTA, I., KAWOOSA, S. (2007): Isolation and characterization of *Dichelobacter nodosus* from ovine and caprine footrot in Kashmir, India. *Res. Vet. Sci.* 83, 141–144.
- WASSINK, G., GEORGE, T., KALER, J., GREEN, L. (2010): Footrot and interdigital dermatitis in sheep: farmer satisfaction with current management, their ideal management and sources used to adopt new strategies. *Prev. Vet. Med.* 96, 65–73.
- WASSINK, G., GREEN, L. (2001): Farmers' practices and attitudes towards foot rot in sheep. *Vet. Rec.* 149, 489–490.
- WASSINK, G., GROGONO-THOMAS, R., MOORE, L., GREEN, L. (2003): Risk factors associated with the prevalence of footrot in sheep from 1999 to 2000. *Vet. Rec.* 152, 351–358.
- WASSINK, G., MOORE, L., GROGONO-THOMAS, R., GREEN, L. (2005): Footrot and interdigital dermatitis in sheep: farmers' practices, opinions and attitudes. *Vet. Rec.* 157, 761–765.
- WERNER, S. (1998): Keratinocyte growth factor: a unique player in epithelial repair processes. *Cytokine Growth Factor Rev.* 9, 153–165.
- WESTERN AUSTRALIA DEPARTMENT OF AGRICULTURE (2001): Strategic assessment concerning footrot – StockGuard Sheep and Goats. Download unter http://www.agric.wa.gov.au/objectwr/imported_assets/content/pw/ah/dis/sl/sheepfootrot.pdf. (Abruf am 28.02.2011).
- WHITTINGTON, R. (1995): Observations on the indirect transmission of virulent ovine footrot in sheep yards and its spread in sheep on unimproved pasture. *Aust. Vet. J.* 72, 132–134.
- WHITTINGTON, R., NICHOLLS, P. (1995): Grading the lesions of ovine footrot. *Res. Vet. Sci.* 58, 26–34.
- WINTER, A., KRÄMER, W., WERNER, F., KOLLERS, S., KATA, S., DUSTEWITZ, G., BUITKAMP, J., WOMACK, J., THALLER, G., FRIES, R. (2002): 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. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99, 9300–9305.

WOOLASTON, R. (1993): Factors affecting the prevalence and severity of footrot in a merino flock selected for resistance to *Haemonchus contortus*. Aust. Vet. J. 70, 365–369.

ZHOU, H., LOTTNER, S., GANTER, M., HICKFORD, J. (2010): Identification of two new *Dichelobacter nodosus* strains in Germany. Vet. J. 184, 115–117.

ZHU, M., ZHAO, S. (2007): Candidate gene identification approach: progress and challenges. Int. J. Biol. Sci. 3, 420–427.

VERWENDETE INTERNETSEITEN

<http://bgk.caprovis.ch/cms09/showsingle.asp?lang=1&urlid=9>

<http://ec.europa.eu/eurostat>

<http://primer3.sourceforge.net>

<http://rubens.its.unimelb.edu.au/~jillm/jill.htm>

<http://www.destatis.de>

http://www.illumina.com/documents/%5Cproducts%5Cdatasheets%5Cdatasheet_ovinesnp50.pdf

<http://www.lincoln.ac.nz/gene-marker-lab>

<http://www.livestockgenomics.csiro.au/sheep/>

<http://www.livestockgenomics.csiro.au/sheep/oar2.0.php>

<http://www.livestockgenomics.csiro.au/sheep/vsheep.php>

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

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

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

<http://www.sheephapmap.org/>

<http://www.sheephapmap.org/goals.php>

http://www.ualberta.ca/~fyeh/popgene_info.html

<https://isgdata.agresearch.co.nz/>

9 Anhang

Tab. 9-1: Genotypen der sequenzierten Schafe für das *TGM1*-Gen unter Angabe der Rasse. T = Thymin, A = Adenin, C = Cytosin, G = Guanin, n. a. = nicht analysierbar.

Rasse	TierID	TGM1 _1	TGM1 _2	TGM1 _3	TGM1 _4	TGM1 _5	TGM1 _6	TGM1 _7	TGM1 _8	TGM1 _9	TGM1 _10	TGM1 _11	TGM1 _12
RH	2008-2	T	C	A/G	A	A/G	C	G	C	T	G	G	A
ML	2008-3	T	C	A	A	G	C	G	C/T	T	G	G	A
ML	2008-6	T	C	A/G	A	A	C	G	C	C/T	G	G	A
RH	2008-9	T	T	A	A	A	C	G	C	C	G	A	C
RH	2008-10	T	C	A/G	A	A/G	C	G	C	C/T	G	A/G	A/C
MFS	2008-404	C/T	C/T	A	n.a.	n.a.	C	G/T	C	C	A/G	A/G	A/C
MFS	2008-405	C/T	C	A/G	A	A	C/T	G/T	C/T	C	A/G	G	A
MFS	2008-412	T	C/T	A/G	A	A	C	G	C	C	G	A/G	A/C
SKF	2008-417	T	C/T	A	A	A/G	C	G	C	T	G	A/G	A/C
MFS	2008-424	C/T	C	A/G	A/G	A	C/T	G/T	C	C	G	A	A/C
MFS	2008-426	C/T	C	A	A/G	A/G	C/T	G/T	C/T	C/T	A/G	G	A
SKF	2008-446	T	C/T	A/G	A	A	C	G	C	C	G	n.a.	A/C
LS	2008-455	C/T	C	A	G	A/G	C	G/T	C	C	A/G	G	A
MFS	2008-537	T	C/T	A/G	A	A	C	G	C/T	C	G	A/G	A/C
LS	2008-570	T	C/T	A/G	A	A	C	G	C	C	G	A/G	A/C

Tab. 9-2: Genotypen der sequenzierten Schafe für das *KGF*-Gen unter Angabe der Rasse. T = Thymin, A = Adenin, C = Cytosin, G = Guanin, n. a. = nicht analysierbar.

Rasse	TierID	KGF_3	KGF_4	KGF_1	KGF_2
RH	2008-2	A	C/T	G	C
ML	2008-3	A	C	A	A
ML	2008-6	A	C	A	A
RH	2008-9	A/G	C/T	A	A
RH	2008-10	A	T	G	C
MFS	2008-404	A/G	C	A	A
MFS	2008-405	A	C	A	C
MFS	2008-412	A/G	C/T	A	A
SKF	2008-417	G	C	A	A
MFS	2008-424	A/G	C	A	A
MFS	2008-426	G	C	A	A
SKF	2008-446	A	C	G	C
LS	2008-455	A/G	C	A	A
MFS	2008-537	A/G	C	A	A
LS	2008-570	A/G	C	A	A

Tab. 9-3: Genotypen der sequenzierten Schafe für das LAMC2-Gen unter Angabe der Rasse. T = Thymin, A = Adenin, C = Cytosin, G = Guanin, / = Deletion, n. a. = nicht analysierbar. Die Nummerierungen LAMC2_3, LAMC2_6, LAMC2_40 und LAMC2_50 wurden nicht vergeben.

Rasse	TierID	LAMC2_1	LAMC2_2	LAMC2_41	LAMC2_42	LAMC2_43	LAMC2_4	LAMC2_5	LAMC2_7	LAMC2_8	LAMC2_9	LAMC2_10
RH	2008-2	T	T	T	T	T	C	T	T	T	G	G
ML	2008-3	C	C	C	G	C	T	C	n.a.	C	C	A
ML	2008-6	C	C	n.a.	n.a.	n.a.	T	C	C	C	C	A
RH	2008-9	C	C	C/T	G	C	T	C	C	C	C	A
RH	2008-10	T	T	T	T	T	C	T	C/T	T	G	G
MFS	2008-404	C	C	T	T	T	C/T	C	C	n.a.	n.a.	n.a.
MFS	2008-405	C/T	C/T	T	T	T	T	C	C	n.a.	n.a.	n.a.
MFS	2008-412	n.a.	n.a.	T	T	T	T	C	C	n.a.	n.a.	n.a.
SKF	2008-417	n.a.	n.a.	T	T	T	C	C	C/T	T	G	G
MFS	2008-424	C/T	C/T	T	T	T	T	C	C	n.a.	n.a.	n.a.
MFS	2008-426	C	C	T	T	T	C/T	C	C/T	n.a.	n.a.	n.a.
SKF	2008-446	n.a.	n.a.	T	T	T	T	C	C	n.a.	n.a.	n.a.
LS	2008-455	C	C	C/T	G	C	T	C	C	n.a.	n.a.	n.a.
MFS	2008-537	C	C	C/T	G	C	T	C	C	C	C	A
LS	2008-570	C	C	C/T	G	C	T	C	C	C	C	A

TierID	LAMC2 _11	LAMC2 _12	LAMC2 _13	LAMC2 _44	LAMC2 _14	LAMC2 _15	LAMC2 _45	LAMC2 _16	LAMC2 _17	LAMC2 _18	LAMC2 _19	LAMC2 _20	LAMC2 _21
2008-2	A	T	A	A	C	A	G	C	A	C	G	C	C
2008-3	A/C	T	A/C	A/G	C/T	A/T	A/G	C/T	A/G	C/T	A/G	C/T	C/T
2008-6	C	T	C	G	T	T	G	T	G	T	A	T	T
2008-9	A/C	T	A/C	A/G	C/T	A/T	G	C/T	A/G	C/T	A/G	C/T	C/T
2008-10	A	T	A	A	C	A	G	C/T	A/G	C/T	A/G	C/T	C/T
2008-404	A	n.a.	A	A	C	A	G	C/T	A/G	C/T	A/G	C/T	C/T
2008-405	C	T	C	G	T	T	G	T	G	T	A	T	T
2008-412	C	T	C	G	T	T	G	T	G	T	A	T	T
2008-417	n.a.	A/T	A	A	C	n.a.	A/G	n.a.	A	C	G	C	C
2008-424	A/C	T	A/C	A/G	C/T	A/T	G	T	G	T	A	T	T
2008-426	C	T	A/C	A/G	C/T	n.a.	G	C/T	A/G	C/T	A/G	C/T	C/T
2008-446	n.a.	A/T	A/C	A/G	C/T	n.a.	A/G	C/T	A/G	C/T	A/G	C/T	C/T
2008-455	A/C	T	A/C	A/G	C/T	A/T	n.a.	T	A/G	C/T	A/G	C/T	C/T
2008-537	C	T	C	G	T	T	G	T	G	T	A	T	T
2008-570	C	T	C	G	T	T	G	T	G	T	A	T	T

Anhang

TierID	LAMC2 _22	LAMC2 _23	LAMC2 _24	LAMC2 _25	LAMC2 _26	LAMC2 _46	LAMC2 _47	LAMC2 _48	LAMC2 _49	LAMC2 _51	LAMC2 _27	LAMC2 _28	LAMC2 _29
2008-2	A	A	G	C	G	A	C	A	C	G	A	G	C
2008-3	G	G	A	C	C	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	G	A	T
2008-6	G	G	A	C	C	/	T	G	T	A	A	A	C/T
2008-9	A/G	A/G	A/G	C	C/G	n.a.	n.a.	A/G	C/T	G	A	A	C
2008-10	A/G	A/G	A/G	C	C/G	n.a.	n.a.	A/G	C/T	A/G	A	A/G	C
2008-404	A/G	A/G	A/G	C	C/G	A	C	n.a.	n.a.	n.a.	G	A	C/T
2008-405	G	G	A	C	C	/	T	G	T	A	A	A	C
2008-412	G	G	A	C	C	/	T	G	T	A	A	A	C
2008-417	A/G	A	A/G	C/T	C/G	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	G	A	T
2008-424	G	G	A	C	C	n.a.	n.a.	A/G	C/T	A/G	A	A/G	C
2008-426	G	A/G	A/G	C	C/G	n.a.	n.a.	G	T	A/G	A	A/G	C
2008-446	G	A/G	A	C/T	C	n.a.	n.a.	A/G	C/T	A/G	A	A	C
2008-455	G	A/G	A	C	N.A.	A/T	n.a.	G	T	A	A	A	T
2008-537	G	G	A	C	C	/	T	G	T	A	A	A	C/T
2008-570	G	G	A	C	C	A/T	C/T	G	T	A/G	A	A	T

TierID	LAMC2 _30	LAMC2 _31	LAMC2 _32	LAMC2 _33	LAMC2 _34	LAMC2 _35	LAMC2 _36	LAMC2 _37	LAMC2 _38	LAMC2 _39
2008-2	G	C	C	C	T	C	C	T	G	T
2008-3	A	T	T	C	G/T	C/T	C	C	C	T
2008-6	A/G	n.a.	t	C	G	T	C	C	C	T
2008-9	G	C/T	C/T	C	T	T	C	T	G	T
2008-10	G	C	C/T	C	G/T	C/T	C	T	C/G	C/T
2008-404	A/G	C/T	C/T	C	G	C	C	C	C	T
2008-405	G	C	T	C	G	T	C	C	C	T
2008-412	G	C	T	C	G	T	C	C	C	T
2008-417	A	T	T	C	G/T	C	C/T	C	C	C/T
2008-424	G	C	C/T	C	G/T	C/T	C	T	C/G	T
2008-426	G	C	C/T	C/T	G/T	C/T	C	T	C/G	T
2008-446	G	C	T	C/T	G	C/T	C/T	C	C	T
2008-455	A	n.a.	T	C	G	T	C	C	C	T
2008-537	A/G	n.a.	T	C	G	T	C	C	C	T
2008-570	G	T	T	C	G/T	C/T	C	T	C/G	T

Danksagung

Mein besonderer Dank geht an Herrn Professor Erhardt für die Überlassung des Themas, die Betreuung der Arbeit sowie für die Durchsicht des Manuskripts. Danke, dass ich Teil des FUGATO-plus Projekts sein durfte.

Ich danke dem BMBF, der mit seinem Projekt FUGATO-plus diese Arbeit finanziell unterstützt hat.

Danke an die Schäfer, die ihre Herden sowie ihre Zeit für das Projekt zur Verfügung gestellt haben.

Bedanken möchte ich mich auch bei einer Reihe von Personen ohne die diese Doktorarbeit so nicht zustande gekommen wäre:

- * Gesine für die Hilfestellungen und die gute Zusammenarbeit.
- * Horst dafür, dass er ein wenig Licht ins Dunkel der Statistik gebracht hat, für seine Geduld und seine fast unerschütterliche gute Laune.
- * alle Mitarbeiter des Instituts für Tierzucht und Haustiergenetik für die stetige Hilfsbereitschaft. Ganz besonders Margarete, Sylvia, Therese, Renate, Anja, Heike und Zahoxin dafür, dass sie mir so viel über Molekulargenetik und Laborarbeit beigebracht haben und dass dabei der Spaß nie verloren ging.
- * Christina für ihr tolles Lachen, Isabella für die viele Hilfestellung im Labor, meiner „Zimmergenossin“ Julia für die unterhaltsame Zeit, David und Susanne für die Zusammenarbeit am Projekt und alle Doktoranden der Arbeitsgruppe für die fachlichen und privaten Gespräche und Tipps.

Vielen Dank an Britta, Kira und meinen Vater, mit denen zusammen ich die deutschen Grammatik- und Rechtschreibregeln intensiv studiert und diskutiert habe.

Zu guter Letzt Danke an meine Familie und meine Freunde die immer an mich geglaubt haben und glauben. Selbst dann, wenn ich es selber nicht tue.

Erklärung

§ 10 Abs. 5 der Promotionsordnung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität vom 6. Februar 2002

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte 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 oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

ISBN 978-3-86345-099-1



**Verlag: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH
35392 Gießen · Friedrichstraße 17 · Tel. 0641 / 24466 · Fax: 0641 / 25375
e-mail: info@dvg.net · Homepage: <http://www.dvg.de>**