

# Molekulargenetische und zytogenetische Charakterisierung eines Hypopigmentierungssyndroms beim Kamerunschaf



**Katharina Fleck**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades eines Doctor agriculturae (Dr. agr.)  
durch den Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotrophologie und  
Umweltmanagement der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

**Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.**

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

1. Auflage 2015

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

1<sup>st</sup> Edition 2015

© 2015 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

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

Betreuer: Prof. Dr. G. Erhardt

**Molekulargenetische und zytogenetische Charakterisierung  
eines Hypopigmentierungssyndroms beim Kamerunschaf**

Inaugural Dissertation  
zur Erlangung eines Doktorgrades (Dr.agr.)  
am Fachbereich Agrarwissenschaften,  
Ökotrophologie und Umweltmanagement  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**M. Sc. Katharina Fleck**  
aus Wetter (Hessen)

Gießen, 2014

**Dissertation am Fachbereich Agrarwissenschaften,  
Ökötrophologie und Umweltmanagement**

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

Dekan: Prof. Dr. Dr. Peter Kämpfer

Prüfungskommission

Vorsitzender: Prof. Dr. Rod Snowdon

1. Gutachter: Prof. Dr. Georg Erhardt

2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. habil. Gerald Reiner

1. Prüfer: Prof. Dr. Klaus Eder

2. Prüfer: Prof. Dr. Gesine Lühken

Tag der mündlichen Prüfung: 06.11.2014

|   |             |
|---|-------------|
| <b>Inhaltsverzeichnis .....</b>         | <b>I</b>    |
| <b>Verzeichnis der Abbildungen.....</b> | <b>V</b>    |
| <b>Verzeichnis der Tabellen .....</b>   | <b>VIII</b> |
| <b>Verzeichnis der Abkürzungen.....</b> | <b>X</b>    |

## **Inhaltsverzeichnis**

|  |      |
|--|------|
| Inhaltsverzeichnis.....  | I    |
| Verzeichnis der Abbildungen.....   | V    |
| Verzeichnis der Tabellen.....  | VIII |
| Verzeichnis der Abkürzungen .....  | X    |
| 1 Einleitung .....   | 1    |
| 2 Literaturübersicht .....   | 3    |
| 2.1 Hypopigmentierung und assoziierte genetische Defekte                   | 3    |
| 2.2 Pathogenese von Hypopigmentierungssyndromen                            | 5    |
| 2.3 Vorkommen von Hypopigmentierungssyndromen bei verschiedenen<br>Spezies | 11   |
| 2.3.1 Hypopigmentierungssyndrome bei der Ratte                             | 11   |
| 2.3.2 Hypopigmentierungssyndrome bei der Maus                              | 14   |
| 2.3.3 Hypopigmentierungssyndrome beim Kaninchen                            | 19   |
| 2.3.4 Hypopigmentierungssyndrome beim Pferd                                | 19   |
| 2.3.5 Hypopigmentierungssyndrome beim Menschen                             | 20   |
| 2.4 Endothelin-Rezeptor-Typ B (EDNRB)                                      | 23   |

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 2.4.1  | Wirkungsweise von Endothelinrezeptoren und deren Liganden im adulten Organismus | 24 |
| 2.4.2  | Einfluss von <i>EDNRB</i> -Mutationen auf die embryonale Entwicklung            | 28 |
| 2.4.3  | Molekulargenetische Charakterisierung des <i>EDNRB</i> -Gens                    | 29 |
| 2.4.4  | Zytogenetische Charakterisierung des <i>EDNRB</i> -Gens                         | 32 |
| 2.4.5  | Proteinstruktur des EDNRB   | 33 |
| 3      | Material und Methoden .....   | 35 |
| 3.1    | Material  | 35 |
| 3.1.1  | Fallbeschreibung  | 35 |
| 3.1.2  | Probenmaterial  | 36 |
| 3.1.3  | Geräte  | 38 |
| 3.1.4  | Verbrauchsmaterialien   | 39 |
| 3.1.5  | Chemikalien   | 40 |
| 3.1.6  | Reaktionskits   | 43 |
| 3.1.7  | Größenstandards zur Agarose-Gelelektrophorese                                   | 44 |
| 3.1.8  | Enzyme  | 44 |
| 3.1.9  | Oligonukleotide   | 45 |
| 3.1.10 | Bakterien und Vektoren  | 45 |
| 3.1.11 | Lösungen  | 45 |
| 3.1.12 | Computerprogramme   | 46 |
| 3.1.13 | Referenzsequenzen   | 46 |
| 3.1.14 | Datenbanken für die Mikrosatellitenanalysen                                     | 47 |
| 3.1.15 | Laboratorien  | 48 |
| 3.2    | Methoden  | 48 |
| 3.2.1  | Histologisch-pathologische Untersuchung   | 48 |

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| 3.2.2     | Gewinnung von Vollblut und peripheren Leukozyten (Buffy coat) aus<br>Vollblut | 49 |
| 3.2.3     | Molekulargenetische Methoden  | 49 |
| 3.2.3.1   | Isolierung von DNA aus Blut   | 49 |
| 3.2.3.1.1 | Isolierung von DNA aus peripheren Leukozyten (Buffy coat)                     | 49 |
| 3.2.3.1.2 | Isolierung von DNA aus Vollblut   | 50 |
| 3.2.3.2   | Isolierung von DNA aus Zungengewebe   | 51 |
| 3.2.3.3   | Bestimmung der DNA-Qualität und -Quantität                                    | 51 |
| 3.2.3.4   | Amplifizierung von DNA-Abschnitten mittels PCR                                | 52 |
| 3.2.3.4.1 | Amplifizierung codierender Bereiche des Kandidatengens<br><i>EDNRB</i>        | 52 |
| 3.2.3.4.2 | Amplifizierung <i>EDNRB</i> -flankierender Bereiche auf OAR10                 | 54 |
| 3.2.3.4.3 | Mikrosatellitenanalyse zur Abstammungskontrolle                               | 58 |
| 3.2.3.5   | Aufreinigung und Konzentrierung von PCR-Fragmenten                            | 59 |
| 3.2.3.6   | Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegel                                  | 60 |
| 3.2.3.7   | Klonierung von PCR-Produkten  | 60 |
| 3.2.3.8   | Kolonie-PCR   | 63 |
| 3.2.3.9   | Herstellung von Glycerolstocks  | 64 |
| 3.2.3.10  | Präparation von Plasmid-DNA   | 64 |
| 3.2.3.11  | Sequenzierung von DNA-Fragmenten  | 65 |
| 3.2.3.12  | Real-time-quantitative-PCR (qPCR)   | 67 |
| 3.2.3.13  | Duplex-PCR  | 70 |
| 3.2.4     | Zytogenetische Methoden   | 72 |
| 3.2.4.1   | Herstellung von Lymphozytenzellkulturen und Metaphasen-<br>präparaten         | 72 |

|         |  |     |
|---------|--|-----|
| 3.2.4.2 | Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) auf<br>Metaphasenchromosomen | 74  |
| 3.2.4.3 | Mikroskopische Untersuchung und Auswertung                             | 78  |
| 4       | Ergebnisse .....   | 79  |
| 4.1     | Histologisch-pathologische Untersuchungen                              | 79  |
| 4.2     | Screening nach Mutationen im Kandidatengen <i>EDNRB</i>                | 81  |
| 4.3     | Ermitteln von Copy Number Variations (CNV) mittels qPCR                | 82  |
| 4.4     | Analyse der flankierenden Bereiche des <i>EDNRB</i> auf OAR10          | 84  |
| 4.5     | Duplex-PCR   | 87  |
| 4.6     | Zytogenetische Untersuchungen  | 89  |
| 4.7     | Mikrosatellitenanalysen  | 94  |
| 5       | Diskussion.....  | 96  |
| 6       | Zusammenfassung.....   | 108 |
| 7       | Summary.....   | 110 |
| 8       | Literaturverzeichnis .....   | 112 |
| 9       | Anhang.....  | 123 |

## Verzeichnis der Abbildungen

|   |    |
|---|----|
| Abbildung 1: Übersicht über die wichtigsten Entwicklungswege der Neuralleistenzellen.....                                     | 6  |
| Abbildung 2: <i>DCT-LacZ</i> -transgener Mäuseembryo mit markierten Melanoblasten .....                                       | 7  |
| Abbildung 3: Schematische Darstellung eines Querschnitts durch den Dünndarm .....   | 9  |
| Abbildung 4: Phänotyp einer <i>sl/sl</i> Ratte im Vergleich zum Wildtyp .....   | 12 |
| Abbildung 5: Gegenwärtiger Wissensstand über die molekulare Basis der verschiedenen Formen des Waardenburg-Syndroms.....      | 23 |
| Abbildung 6: Isoformen des Endothelins .....  | 26 |
| Abbildung 7: Biosynthese des porcinen Endothelins aus dem Vorläufer Präproendothelin.....                                     | 27 |
| Abbildung 8: Struktur des bovinen <i>EDNRB</i> .....  | 31 |
| Abbildung 9: R-gebändertes Ideogramm des ovinen Chromosom 10 .....  | 32 |
| Abbildung 10: Schematische Darstellung der allgemeinen Struktur G-Proteingekoppelter Rezeptoren.....                          | 34 |
| Abbildung 11: Lokalisation der amplifizierten Fragmente zur Untersuchung flankierender Bereiche des ovinen <i>EDNRB</i> ..... | 57 |

|  |    |
|--|----|
| Abbildung 12: Kamerunschafe mit rassetypischem Phänotyp; hypopigmentierte Lämmer; pigmentierte Kronränder des zweiten Lamms.....       | 79 |
| Abbildung 13: Augen mit hellblau gefärbter Iris und dilatiertes Cecum des zweiten hypopigmentierten Lamms.....                         | 80 |
| Abbildung 14: Quotient aus den relativen Kopienzahlen von <i>EDNRB</i> und <i>SLAIN1</i> .....   | 83 |
| Abbildung 15: Lokalisation der amplifizierten Fragmente zur Untersuchung flankierender Bereiche des ovinen <i>EDNRB</i> .....          | 86 |
| Abbildung 16: Agarose-Gelelektrophorese der Duplex-PCR .....   | 88 |
| Abbildung 17: Metaphase-Chromosomen mit RBA-Bänderung eines Schafs mit heterozygoter <i>EDNRB</i> -Deletion .....                      | 89 |
| Abbildung 18: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) auf ovinen Metaphasenchromosomen .....   | 91 |
| Abbildung 19: Heterozygotes Trägartier der <i>EDNRB</i> -Deletion bei konventioneller FISH mit DAPI-Kontrastfärbung und RBPI-FISH .... | 92 |
| Abbildung 20: Zusammenfassende schematische Darstellung der mikrochromosomalen Deletion auf OAR10.....                                 | 93 |
| Abbildung 21: Pedigree der hypopigmentierten Lämmer.....   | 95 |

Abbildungen im Anhang

|  |     |
|--|-----|
| Abbildung 1A: Gesamtsequenz des ovinen <i>EDNRB</i> (Genbank Accession Nummer JQ937242) .....                    | 126 |
| Abbildung 2A: Sequenzabschnitte in 5´-Richtung des ovinen <i>EDNRB</i> (Genbank Accession Nummer JQ959537) ..... | 129 |
| Abbildung 3A: Sequenzabschnitte in 3´-Richtung des ovinen <i>EDNRB</i> (Genbank Accession Nummer JQ959538) ..... | 131 |
| Abbildung 4A: <i>SLAIN1</i> Exon 3 ( <i>Ovis aries</i> ) (Genbank Accession Nummer JQ937243) .....               | 132 |

## Verzeichnis der Tabellen

|  |    |
|--|----|
| Tabelle 1: Genbankeinträge genomischer und codierender Sequenzen des<br><i>EDNRB</i> .....                               | 31 |
| Tabelle 2: Probenmaterial für die molekulargenetischen und zytogenetischen<br>Analysen .....                             | 37 |
| Tabelle 3: Referenzsequenzen zur Analyse des ovinen <i>EDNRB</i> .....   | 47 |
| Tabelle 4: Reaktionsansatz und Standard-Testprotokoll für die Amplifikation oviner<br><i>EDNRB</i> -Fragmente .....      | 53 |
| Tabelle 5: Amplifikation codierter Bereiche sowie flankierender Intronbereiche<br>des ovinen <i>EDNRB</i> .....          | 53 |
| Tabelle 6a: Verwendete Primersequenzen zur Amplifikation flankierender<br>Bereiche in 5`-Richtung des <i>EDNRB</i> ..... | 55 |
| Tabelle 6b: Verwendete Primersequenzen zur Amplifikation flankierender<br>Bereiche in 3`-Richtung des <i>EDNRB</i> ..... | 56 |
| Tabelle 7: Mikrosatellitenmarker zur Abstammungskontrolle.....   | 59 |
| Tabelle 8: Reaktionsansatz und Cycloerbedingungen zur Durchführung der<br>Kolonie-PCR .....                              | 64 |
| Tabelle 9: Komponenten des Reaktionsansatzes und Cycloerbedingungen für die<br>Sequenzierreaktion .....                  | 66 |
| Tabelle 10: Reaktionsansatz und Cycloerprotokoll für die Amplifikation der qPCR-<br>Fragmente.....                       | 68 |

## Tabellen

---

|  |     |
|--|-----|
| Tabelle 11: Primer für die Real-time-quantitative-PCR am Rotorgene .....   | 68  |
| Tabelle 12: Sequenzen und Lokalisation der in der Duplex-PCR verwendeten<br>Primerpaare .....                    | 70  |
| Tabelle 13: Reaktionsansätze und PCR-Bedingungen in der Duplex-PCR .....   | 71  |
| Tabelle 14: Zusammensetzung der Lymphozytenzellkulturen .....  | 72  |
| Tabelle 15: Errechnetes Templatmengenverhältnis <i>EDNRB/SLAIN1</i> .....  | 84  |
| Tabellen im Anhang   |     |
| Tabelle 1A: Verwendete Mikrosatellitenmarker für die Analyse flankierender<br>Bereiche des <i>EDNRB</i> .....    | 123 |
| Tabelle 2A: PCR-Bedingungen für die Fragmentlängenanalysen .....   | 123 |
| Tabelle 3A: Allelgrößen der Mikrosatellitenmarker in der Kamerunschafherde.....                                  | 125 |
| Tabelle 4A: Ergebnisse der Mikrosatellitenanalyse zur Abstammungskontrolle der<br>hypopigmentierten Lämmer ..... | 126 |

## Verzeichnis der Abkürzungen

|            |  |
|------------|--|
| %          | Prozent  |
| °C         | Grad Celsius                                   |
| Abb.       | Abbildung                                      |
| Aqua dest. | destilliertes Wasser                           |
| BAC        | Bacterial artificial chromosome                |
| bzw.       | beziehungsweise                                |
| Big-ET     | Big-Endothelin                                 |
| BSA        | Bovines Serum Albumin                          |
| BrdU       | Bromdesoxyuridin                               |
| CHORI      | Children`s Hospital Oakland Research Institute |
| CNV        | Copy number variations                         |
| Chr.       | Chromosom                                      |
| DAPI       | 4',6-Diamidin-2-phenylindol                    |
| dATP       | Desoxyadenosintriphosphat                      |
| dCTP       | Desoxycytosintriphosphat                       |
| ddNTP      | Didesoxyribonucleinsäure                       |
| dGTP       | Desoxyguanosintriphosphat                      |
| DNA        | Desoxyribonucleinsäure                         |
| dNTP       | Desoxynukleotidtriphosphat                     |
| dom        | dominant-spotting                              |
| dTTP       | Desoxythymidintriphosphat                      |
| dUTP       | Desoxyuridintriphosphat                        |
| E-coli     | Escherichia-coli                               |
| ECE        | Endothelin-konvertierendes Enzym               |
| EDN3       | Endothelin 3                                   |

## Abkürzungen

---

|               |   |
|---------------|---|
| EDNRA         | Endothelin-Rezeptor-Typ A   |
| EDNRB         | Endothelin-Rezeptor-Typ B   |
| En            | english-spotting  |
| <i>et al.</i> | <i>et alia</i>  |
| FISH          | Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung                                  |
| FITC          | Fluoresceinisothiocyanat  |
| h             | Stunde  |
| HD            | Morbus-Hirschsprung   |
| HMG           | High mobility group   |
| ICC           | Interstitielle Cajal-Zellen   |
| IPTG          | Isopropyl-Thio- $\beta$ -Galactopyranosid                           |
| ISCNB         | International system for chromosome nomenclature of domestic bovids |
| Kb            | Kilobasenpaare  |
| KBE           | Kolonie-bildende-Einheiten  |
| L             | Liter   |
| Lab. Nr.      | Labornummer   |
| Mbp           | Megabasenpaare  |
| $\mu$ l       | Mikroliter  |
| ml            | Milliliter  |
| min           | Minute  |
| mRNA          | messenger Ribonucleinsäure  |
| NCC           | Neuralleistenzellen   |
| ORF           | Open reading frame (offenes Leseraster)                             |
| qPCR          | Real-time-quantitative-PCR  |
| RBPI-FISH     | R-banded propidium iodide stained FISH                              |
| PBS           | Phosphate buffered saline   |
| PCR           | Polymerasekettenreaktion  |

## Abkürzungen

---

|                |                             |
|----------------|-----------------------------|
| <i>p.m.</i>    | <i>post mortem</i>          |
| <i>p.p.</i>    | <i>post partum</i>          |
| RNA            | Ribonucleinsäure            |
| RT             | Raumtemperatur              |
| sek            | Sekunde                     |
| sl             | spotting-lethal             |
| s <sup>l</sup> | piebald-lethal              |
| SLAIN1         | Slain motif family member 1 |
| SSC            | Saline sodium citrate       |
| Tgb.           | Tagebuch                    |
| WS             | Waardenburg-Syndrom         |

## 1 Einleitung

Die Diagnostik von Erbfehlern spielt in der modernen Tierzucht eine wichtige Rolle. Unter Erbfehlern in diesem Sinne versteht man Krankheiten und Missbildungen, die ausschließlich durch genetische Faktoren bestimmt sind. Diese sind zu unterscheiden von den umweltbedingten Krankheiten, die beispielsweise durch Mängel in Haltung, Fütterung und Hygiene entstehen, sowie von multifaktoriellen Krankheiten, deren Ätiologie sowohl durch eine genetische als auch durch eine umweltbedingte Komponente charakterisiert ist.

Durch moderne fortpflanzungsbiologische Verfahren können derartige Erbfehler innerhalb kurzer Zeit in einer Population verbreitet werden. Insbesondere bei rezessiv vererbten Defekten bleibt eine entsprechende Mutation bei den heterozygoten Anlageträgern relativ lange unentdeckt, da die phänotypischen Auswirkungen erst bei den homozygoten Merkmalsträgern erkennbar sind. Den Landwirten entstehen durch derartige Erbkrankheiten erhebliche wirtschaftliche Verluste. Aber auch Aspekte des Tierschutzes spielen eine bedeutende Rolle, da diese Erbdefekte oft mit Schmerzen und Leiden für die betroffenen Tiere verbunden sind. Solche Merkmalsträger können zudem als Modell für vergleichbare Erbkrankheiten des Menschen dienen.

Mit Hypopigmentierung assoziierte Störungen wurden in der Literatur bereits beim Menschen in Form des Waardenburg-Syndroms (Read und Newton 1997) beschrieben, wobei verschiedene Mutationen in unterschiedlichen Genen als Ursache identifiziert wurden. Zudem konnte gezeigt werden, dass auch bei Vorliegen der gleichen Mutation die phänotypischen Auswirkungen individuell

verschieden sein können (Tüysüz *et al.* 2009). Auch bei anderen Spezies, wie Pferd, Ratte und Maus, sind entsprechende Syndrome bekannt und wurden molekulargenetisch charakterisiert (Hosoda *et al.* 1994; Gariepy *et al.* 1996; Metallinos *et al.* 1998; Santschi *et al.* 1998).

Diese Arbeit behandelt ein offenbar letales Hypopigmentierungssyndrom in einer Herde von Kamerunschafen. Da bisher in der Literatur keine Berichte über das Auftreten entsprechender Hypopigmentierungssyndrome beim Schaf existieren, ist es Ziel dieser Arbeit, den genetischen Hintergrund des vorliegenden hypopigmentierten Phänotyps beim Kamerunschaf sowie den zugrunde liegenden Erbgang zu klären. Außerdem soll untersucht werden, ob ein entsprechendes Defektallel in der Kamerunpopulation verbreitet ist, oder ob es sich bei dem vorliegenden Fall um eine spontane Mutation in der betroffenen Schaffamilie handelt.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Hypopigmentierung und assoziierte genetische Defekte

Hypopigmentierungssyndrome stellen eine bei einigen Spezies bereits näher charakterisierte kongenitale Missbildung dar und können in die Reihe der multigenen Störungen der Neuralleistenentwicklung eingeordnet werden (Bolande 1974). Die Krankheit ist beim Menschen unter dem Begriff Waardenburg-Syndrom (WS) bekannt, wobei je nach Vorhandensein oder Fehlen bestimmter Symptome, verschiedene Typen unterschieden werden (Read und Newton 1997). Die Prävalenz liegt bei etwa 1/42.000 und etwa 1,43% der unter congenitaler Taubheit leidenden Menschen sind betroffen (Read und Newton 1997). In bestimmten Bevölkerungsgruppen (z.B. Mennoniten) wird die Erkrankung mit einer Häufigkeit von bis zu 57% vorgefunden (Cohen 1982). Betroffene Patienten zeigen Pigmentstörungen, z.B. der Haare oder der Haut und weisen meist eine intensiv blaue Iris bzw. eine Heterochromie der Augen auf (Read und Newton 1997).

Auch bei verschiedenen Tierarten (Pferd, Maus, Ratte) wurden derartige Hypopigmentierungssyndrome beschrieben (Hosoda *et al.* 1994; Gariepy *et al.* 1996; Metallinos *et al.* 1998; Santschi *et al.* 1998), wobei der Phänotyp beim Tier durch eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Scheckung des Haarkleides, bis hin zu vollständig weißen Individuen gekennzeichnet ist. Die unter den weißen Fellpartien liegende Haut ist rosafarben und enthält keine Melanozyten. Restliche Melanozyten finden sich in der Regel in

Körperregionen, deren Entwicklung eng mit der des zentralen Nervensystems verbunden ist. Beispielsweise finden sich Reste pigmentierter Bereiche entlang der Wirbelsäule und im Bereich des Kopfes (Dessinioti *et al.* 2009).

Allgemein liegen Pigmentierungsstörungen Mutationen zugrunde, die in der frühembryonalen Entwicklung Fehler in der Migration der Neuralleistenzellen verursachen (Pingault *et al.* 2010). Deren Migrationsweg in der embryonalen Entwicklung wurde am Beispiel der Melanoblasten, mit Hilfe des *LacZ*-Reportergens, bei transgenen Mäuseembryos beschrieben (Mackenzie *et al.* 1997). Es ist bekannt, dass diese Migrationsprozesse von verschiedenen Genen gesteuert werden.

Neben Mutationen des *Endothelin-Rezeptor-Typ B*-Gens (*EDNRB*) (Hosoda *et al.* 1994; Gariépy *et al.* 1996; Metallinos *et al.* 1998; Santschi *et al.* 1998), können auch Mutationen im *Kit-Oncogen (Kit)* (Mackenzie *et al.* 1997), im *Paired-box 3-Gen (PAX3)* (Tassabehji *et al.* 1992), im *SRY-related HMG-box-Gen (SOX10)* (Pingault *et al.* 1998), im *microphthalmia-associated transcription factor (MITF)* (Tassabehji *et al.* 1994) und im *Endothelin 3-Gen (EDN3)* (Yada *et al.* 1991; Puffenberger *et al.* 1994b) diesen Weg der Melanoblastenmigration beeinflussen und damit entsprechende Pigmentstörungen hervorrufen. Da Melanoblasten und Neuroblasten sich aus gemeinsamen pluripotenten Vorläuferzellen entwickeln (Calloni *et al.* 2007), verursachen einige DNA-Varianten in den genannten Genen neben Pigmentstörungen auch Taubheit und Fehlbildungen des enterischen Nervensystems.

Die Ausprägung der phänotypischen Symptomatik kann in Abhängigkeit von den beteiligten Genen variieren (Read und Newton 1997), wobei insbesondere Mutationen in *EDNRB/EDN3* schwerwiegende Fehlfunktionen des enterischen

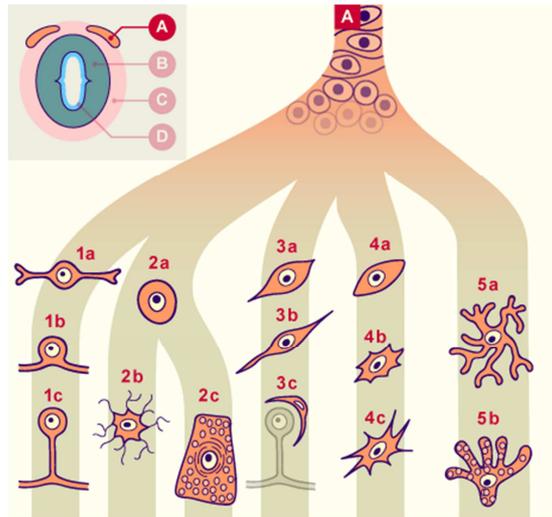
Nervensystems verursachen können, da die Interaktion von *EDN3* mit *EDNRB* essentiell für die Entwicklung enterischer Neuronen zu sein scheint (Baynash *et al.* 1994). Beim Pferd führt eine Punktmutation im *EDNRB p.p.* sofort zu schwerwiegenden Motilitätsstörungen des Darms, wobei betroffene Tiere innerhalb weniger Tage verenden (Metallinos *et al.* 1998).

## **2.2 Pathogenese von Hypopigmentierungssyndromen**

Prozesse der Migration und Kolonisation des Embryos durch Neuralleistenzellen (NCC) spielen eine entscheidende Rolle im Verständnis der Pathogenese von kongenitalen Hypopigmentierungssyndromen. Die Grenzschicht zwischen Neuralplatte und Ektoderm faltet sich zur Neuralleiste auf und stellt gleichzeitig den Entstehungsort der NCC dar. Die Migration der NCC wird dort, durch die Expression verschiedener spezifischer Transkriptionsfaktoren, in Gang gesetzt (Kashef *et al.* 2007).

Im Verlauf der Embryogenese migrieren NCC zunächst als pluripotente Zellen aus dem Neuralrohr und differenzieren sich unter dem Einfluss verschiedener Gene in den Zelltyp ihres Zielgewebes (Le Douarin und Teillet 1973; Calloni *et al.* 2009). Einerseits entstehen dabei die verschiedenen Arten der Neuroblasten, die sich zu adulten Neuronen des enterischen und peripheren Nervensystems weiterentwickeln (Abb.1: 1a-c und 2a-c). Andererseits entstehen Glioblasten, aus denen sich später die Gliazellen des Nervensystems entwickeln (Abb.1: 3a-c). Die Gliazellen stellen für die Nervenzellen ein Stützgerüst dar und sorgen für deren gegenseitige elektrische Isolation.

Des Weiteren bilden sich die Zellen des Mesenchyms sowie die Melanoblasten, die für die Pigmentierung der Haut verantwortlich sind (Abb.1: 4a-c und 5a-b).



- 1a Bipolarer Neuroblast
- 1b In Differenzierung begriffener bipolarer Neuroblast
- 1c Pseudounipolare
- 2a Spinalganglienzelle
- 2b Unipolarer Neuroblast
- 2c Multipolares Neuron eines sympathischen Ganglions
- 3a Spongioblast
- 3b Schwann-Zelle
- 3c Satellitenzelle
- 4a Mesenchymzelle
- 4b Leptomeningeale Zelle (Arachnoidea und Pia mater)
- 4c Zelle des Mesektoderms
- 5a Melanoblast (Pigmentzelle)
- 5b Melanocyt

- A Neuralleiste
- B Neuralrohr (Mantelzone)
- C Mesenchym
- D Neuralrohr (Ependym)

Abbildung 1: Übersicht über die wichtigsten Entwicklungswege der Neuralleistenzellen (<http://www.embryology.ch/allemand/vcns/tubecrete04.html> 07/2013).

Störungen der Migration von NCC verursachen verschiedene, oftmals in Kombination auftretende Defekte, wie Hypopigmentierung der Haut, Taubheit und Störungen des enterischen Nervensystems.

Die embryonale Entwicklung der Melanozyten der Haut wurde in verschiedenen Spezies beschrieben. Bei der Maus konnte, unter Verwendung eines *LacZ*-Transgens im *Trp2*-Promotor, die embryonale Migration der Melanoblasten, welche die Vorläuferzellen der Melanozyten darstellen, visualisiert werden (Lin und Fisher 2007). Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Migration der

Melanoblasten ab dem 8. Tag der Trächtigkeit zunächst in dorsolateraler Richtung erfolgt und anschließend ventral fortgesetzt wird (Abb. 2). Hypopigmentierung, die ihren Ursprung in einer Migrationsstörung von NCC hat, tritt daher, speziell bei heterozygoten Tieren, oftmals in Form von weißer Scheckung am Bauch auf, da dieser am weitesten entfernt vom Migrationsursprung liegt (Lin und Fisher 2007). Die unpigmentierten Bereiche können sich jedoch, speziell bei homozygoten Trägertieren, bis hin zu vollständig weißen Individuen ausdehnen (Garipey *et al.* 1996; Metallinos *et al.* 1998).

Diese Formen der Hypopigmentierung sind vom Albinismus zu unterscheiden, der lediglich eine Störung der Biosynthese der Melanine, bei gleichzeitig normaler Besiedlung der Haut mit Melanozyten, darstellt.

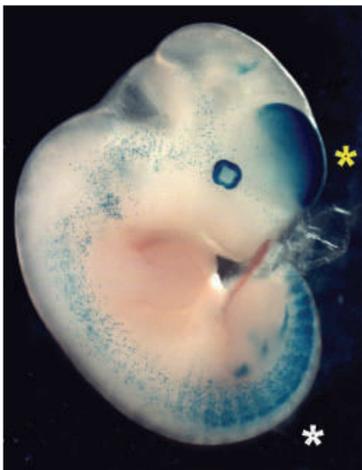


Abbildung 2: *DCT-LacZ*-transgener Mäuseembryo mit markierten Melanoblasten und Melanozyten (blau) am Tag 11,5 der Trächtigkeit. Melanoblasten befinden sich in besonders hoher Konzentration im Bereich des Neuralrohrs (weißer Stern) sowie in der cervikalen Region (gelber Stern). Die Melanoblasten migrieren zunächst dorsolateral, dann ventral (Lin und Fisher 2007).

Des Weiteren sind Migrationsstörungen von Melanozyten häufig mit sensorineuraler Taubheit verbunden. Die Besiedlung der *Stria vascularis* des Innenohrs mit Melanozyten scheint essentiell für dessen korrekte Entwicklung zu sein. Bei Versuchen mit *dominant-spotting(dom)*-Mäusen konnte diese Annahme bestätigt werden (Herbarth *et al.* 1998). Diese Mäuse sind Trägartiere einer Mutation im *SOX10*-Gen, die einen Neuralleistendefekt verursacht, der zu aganglionären Segmenten im Darm sowie zu Pigmentstörungen und Taubheit führt. Es konnte gezeigt werden, dass bei diesen Tieren die fehlende Besiedlung der *Stria vascularis* mit Melanozyten mit einer Dysfunktion der *Stria* einherging, da diese bei betroffenen Tieren nicht in der Lage war, endocochleäres Potential zu erzeugen, was letztlich ursächlich für die Taubheit der Tiere war (Steel und Barkway 1989).

Das enterische Nervensystem des Darms ist ein Teil des vegetativen Nervensystems und dort für die Regulation aller physiologischen Prozesse, wie beispielsweise Peristaltik und Sekretion, zuständig. Es ist bekannt, dass das enterische Nervensystem relativ eigenständig agiert, obgleich es ebenso unter Einfluss von parasymphathischer und sympathischer Innervation steht (Schemann und Neunlist 2004). Die Neuronen und Gliazellen des enterischen Nervensystems bilden Ganglien, wobei zwei eng miteinander verbundene Plexi unterschieden werden. Der äußere *Plexus myentericus* befindet sich zwischen den longitudinalen und zirkulären Muskelschichten des Darms und reicht über die gesamte Länge. Hier reguliert er Motilität und Peristaltik des Darms, während der weiter innen liegende *Plexus submucosus* die sekretorischen Aktivitäten der Mucosa steuert (Abb.3).

Interstitielle Cajal-Zellen (ICC) dienen als spezifische Neurotransmitter zwischen enterischen Neuronen und den Zellen der glatten Darmmuskulatur. Sie sind über *Gap junctions* miteinander verbunden, die über elektrische Impulse als aktiver Schrittmacher für die Induktion von Darmbewegungen dienen (Ward und Sanders 2006).

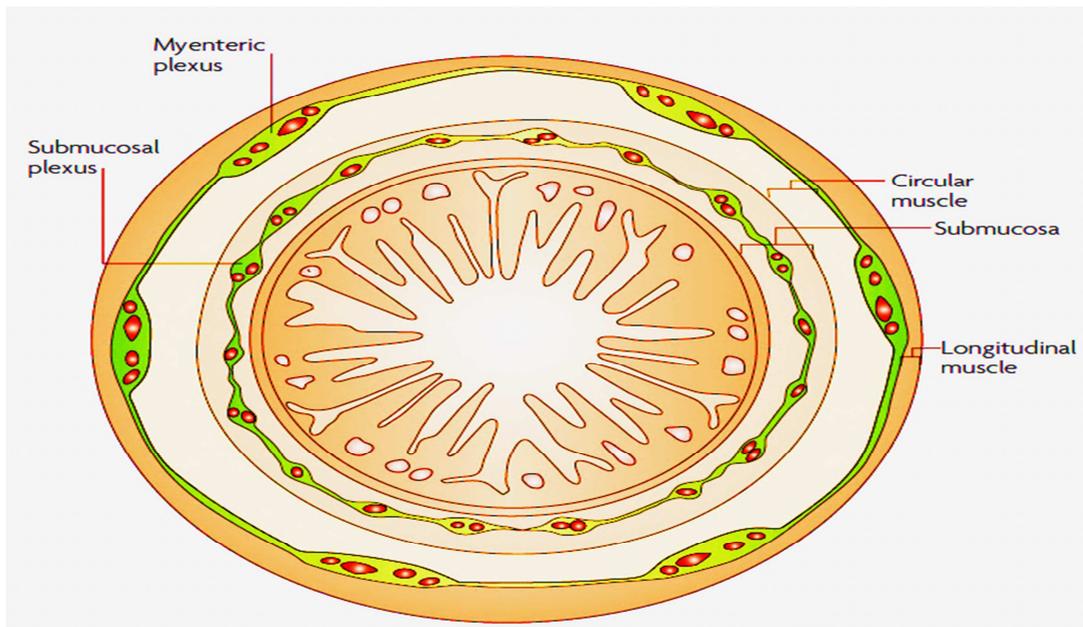


Abbildung 3: Schematische Darstellung eines Querschnitts durch den humanen Dünndarm (Heanue und Pachnis 2007).

Wenn das enterische Nervensystem nicht in der Lage ist, peristaltische Bewegungen zu induzieren bzw. den Defäkationsreflex einzuleiten, resultiert dies in längeren intestinalen Passagezeiten und Defäkationsstörungen, bis hin zu schwerwiegenden Obstipationen (Bruder und Meier-Ruge 2007).

Derartige Fehlfunktionen des enterischen Nervensystems können durch eine fehlende bzw. unvollständige Migration pluripotenter Vorläuferzellen enterischer Neuronen aus dem Neuralrohr entstehen. Dies kann eine Ganglienaplasie in

Teilen des *Plexus submucosus* bzw. *Plexus myentericus* zur Folge haben, die in den betroffenen Segmenten zu einem Darmspasmus führt. Dieser verursacht durch erhebliche Obstipationen das so genannte Megacolon und stellt in manchen Fällen einen Letalfaktor dar (Martucciello *et al.* 2007). Tritt dieser isoliert, d.h. ohne weitere Pigmentstörungen oder Taubheit auf, ist diese Erkrankung beim Menschen unter dem Begriff Morbus Hirschsprung (HD) bekannt. In Kombination mit Pigmentanomalien wird die Erkrankung als Waardenburg-Syndrom Typ IV (WS IV) bezeichnet.

Der Darmspasmus entsteht dabei durch eine Hyperplasie der dem aganglionären Segment vorgeschalteten Nervenzellen und einer dadurch verursachten gesteigerten Acetylcholinausschüttung. Durch die vermehrte Stimulation der Ringmuskulatur führt dies zu einer Dauerkontraktion des betreffenden Abschnitts. In der Regel sind nur kleinere Bereiche des Rektums betroffen, jedoch kann sich die Aganglionose auch in unterschiedlicher Ausdehnung oralwärts fortsetzen.

Zum Abbau des zu viel gebildeten Acetylcholins wird Acetylcholinesterase benötigt, weshalb die Messung der Acetylcholinesteraseaktivität einen wichtigen Parameter in der HD Diagnostik darstellt (Meier-Ruge *et al.* 1972, 2004).

## **2.3 Vorkommen von Hypopigmentierungssyndromen bei verschiedenen Spezies**

Hypopigmentierungssyndrome wurden bislang bei den Nagetieren Ratte und Maus sowie beim Kaninchen und beim Pferd beschrieben. Die zugrunde liegenden molekulargenetischen Ursachen wurden, mit Ausnahme des *En*-Locus beim Kaninchen, hinreichend aufgeklärt (Hosoda *et al.* 1994; Garipey *et al.* 1996; Metallinos *et al.* 1998; Fontanesi *et al.* 2010). Auch beim Menschen treten derartige Hypopigmentierungssyndrome auf, die nachweislich auf unterschiedliche Mutationen, in verschiedenen beteiligten Genen zurückzuführen sind (Pingault *et al.* 2010).

### **2.3.1 Hypopigmentierungssyndrome bei der Ratte**

Die *spotting-lethal(sl)*-Ratte wurde zuerst im Jahre 1979 in der Nachkommenschaft eines Wistar-Imamichi-Weibchens und einer männlichen Wild-Typ-Ratte beschrieben. Die charakteristische Eigenschaft dieser Mutante ist das Vorhandensein aganglionärer Segmente im Darm (Ikadai *et al.* 1979). Die Aganglionose führt bei betroffenen Tieren zum Megacolon und wird durch eine autosomal-rezessive Mutation hervorgerufen. Des Weiteren sind homozygote *sl/sl*-Ratten vollständig weiß, da sich in ihrer Haut keine Melanozyten befinden, während heterozygote (*sl/+*) und Wild-Typ-Ratten (*+/+*) pigmentierte Bereiche an Kopf, Rücken und Schwanz aufweisen (Abb. 4).



Abbildung 4: Phänotyp einer *sl/sl*-Ratte (links) im Vergleich zum Wild-Typ (rechts) (Garipey *et al.* 1996).

Die distale intestinale Aganglionose umfasst weitreichende Abschnitte des Dickdarms. Die *sl*-Ratte wird daher auch als Modelltier für den Morbus-Hirschsprung des Menschen verwendet. Molekulargenetische Untersuchungen ergaben, dass das Genom der *sl*-Ratte eine 301 bp große Deletion im *EDNRB*-Gen aufweist. Die deletierte Region codiert für die erste und zweite Transmembrandomäne des EDNRB-Proteins (Kunieda 1996) und umfasst das gesamte 3'-Ende des Exon 1 sowie die ersten 44 bp des Intron 1 (Ceccherini *et al.* 1995; Garipey *et al.* 1996). Durch den Verlust der ursprünglichen Spleiß-Donorseite, wird in den *sl*-Mutanten eine weitere, zuvor unerkannte Spleiß-Donorseite 15 bp strangaufwärts aktiviert, da diese nicht, wie beim ursprünglichen Spleißprozess vorgesehen, herausgeschnitten wird. Daher können vier verschiedene Transkriptionsprodukte in den *sl*-Mutanten nachgewiesen werden.

Es ist offensichtlich, dass der Verlust einer jeden Transmembrandomäne in heptahelicalen, G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit einem Verlust von funktionsfähigem Rezeptorprotein einhergeht, wie es bereits im Fall des Beta-Adrenergenen-Rezeptors beschrieben wurde (Dixon *et al.* 1987).

Homozygote Tiere sterben in der Regel innerhalb der ersten 35 Tage *p.p.* an Darmverschluss, während heterozygote (*sl/+*) Tiere keine Verminderung von

Vitalität und Fruchtbarkeit gegenüber dem Wild-Typ (+/+) aufweisen. Außerdem zeigen heterozygote Tiere keine Aganglionose, wobei histopathologische Untersuchungen ergaben, dass sowohl der *Plexus submucosus* als auch der *Plexus myentericus* eine erhöhte Größe und Dichte gegenüber dem Wild-Typ aufwiesen (Gariépy *et al.* 1996). Zudem enthielten die Ganglienzellen gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte Anzahl an Neuronen sowie eine leichte Hyperplasie der einzelnen Nervenfasern. Die Befunde ähneln den durch Bruder und Meier-Ruge (2007) beschriebenen Kriterien zur Erkennung einer intestinalen neuronalen Dysplasie. Bei der intestinalen neuronalen Dysplasie Typ B handelt es sich um eine Anomalie des *Plexus submucosus*, die sich durch eine deutliche Vermehrung von Riesenganglien (8 oder mehr Nervenzellanschnitte innerhalb eines submukösen Ganglions) äußert und typischerweise mit einer milden chronischen Obstipationssymptomatik einher geht. Die genaue Pathogenese und die Ätiologie wurden bislang allerdings nicht hinreichend geklärt (Bruder und Meier-Ruge 2007).

Bei der Ratte wurde zudem nachgewiesen, dass der genetische Hintergrund auch bei derselben zu Grunde liegenden Mutation, einen signifikanten Einfluss auf die Penetranz und Schwere der Symptomatik haben kann. Ein AGH-*EDNRB*<sup>sl</sup>-Ratten-Stamm wurde in zwei andere Rattenstämme (LEH und F344) eingekreuzt und nach Trägertieren der Mutation selektiert. Homozygote AGH-*EDNRB*<sup>sl/sl</sup>-Ratten zeigten Aganglionose und schwere Anzeichen von Obstipationen. Nur 20% dieser Tiere überlebten bis zum Absetzen, während 100% der LEH<sup>sl/sl</sup> und F344<sup>sl/sl</sup> Rattenjungen bis zum Absetzen überlebten. Trotzdem starben 90% der LEH<sup>sl/sl</sup> Tiere vor dem 40. Tag *p.p.*, während 60%

der F344<sup>sl/sl</sup> Rattenjungen keinerlei Anzeichen einer Aganglionose zeigten (Dang *et al.* 2011).

Die Beobachtungen lassen vermuten, dass der genetische Hintergrund einen großen Einfluss auf Ausprägung und Schwere der phänotypischen Symptome hat.

### 2.3.2 Hypopigmentierungssyndrome bei der Maus

Bei der Maus sind eine ganze Reihe sowohl natürlich vorkommender als auch induzierter Mutationen beschrieben, die nachweislich der Grund für Defekte in verschiedenen Neuralleistenzelllinien sind.

Scheckung kann bei der Maus in einigen Fällen auf Mutationen im *dominant spotting(W)*-Locus zurückgeführt werden. Der *W*-Locus wurde als *c-kit-Proto-Oncogen* identifiziert, das für eine Rezeptor-Tyrosin-Kinase codiert (Geissler *et al.* 1988). Es scheint, dass *W*-Mutationen die Proliferation embryonaler Stammzellen in den betroffenen Geweben hemmen und ihre weitere Entwicklung während der Embryogenese negativ beeinflussen. Dies resultiert in einer unvollständigen Besiedlung der Haut mit epidermalen Melanozyten und in einer erhöhten embryonalen Sterblichkeit (Hosoda *et al.* 1994). Neben Fellscheckung und Unfruchtbarkeit kann sich darüber hinaus, durch eine Störung der Hämatopoese, beim adulten Tier eine schwere Anämie entwickeln, die zum Tode führt (Geissler und Russell 1983). Außerdem fehlen bei betroffenen Tieren Anteile der ICC in der glatten Darmmuskulatur (Iino *et al.* 2007). Es ist bekannt, dass ICC eine entscheidende Rolle in der Regulation der

Darmmotilität übernehmen, indem sie für die Transduktion neuronaler Signale des enterischen Nervensystems verantwortlich sind (Ro *et al.* 2010).

*Piebald-spotting (s)* ist eine weitere bei der Maus auftretende Mutation, die aufgrund einer Störung der Melanozytenmigration bei homozygoten Tieren ein geschecktes Haarkleid mit etwa 20% Weißanteil verursacht. Jedoch kommt es in diesem Fall nicht zu Fehlbildungen des enterischen Nervensystems bzw. der Darmmotilität. Es konnte gezeigt werden, dass sich der *s*-Locus auf dem murinen Chromosom 14 befindet (Metallinos *et al.* 1994) und für den G-Proteingekoppelten Rezeptor *EDNRB* codiert (Hosoda *et al.* 1994). Mäuse mit dem Genotyp *s/s* exprimieren nur geringe Mengen strukturell intakter *EDNRB*-mRNA. Dies wird verursacht, durch ein 5,5 kb großes Retroposonelement im Intron 1 des *EDNRB*, welches eine Spleiß-Akzeptorseite sowie kanonische Sequenzen für ein Polyadenylierungssignal enthält. Das Retroposonelement führt zu einem fehlerhaften Spleißvorgang und zu einer vorzeitigen Termination des *EDNRB*-Transkripts. Daher sind bei betroffenen Tieren nur geringe Mengen an normalem *EDNRB*-Transkript vorzufinden (Yamada 2006).

Die *Piebald-lethal(s<sup>l</sup>)*-Maus ist Träger einer schwerwiegenderen Mutation im *EDNRB*. Ähnlich der *sl*-Ratte sind homozygote Tiere fast vollständig weiß und entwickeln, aufgrund fehlender Nervenzellen im *Plexus myentericus*, ausnahmslos ein Megacolon (Hosoda *et al.* 1994). Im Gegensatz dazu weisen heterozygote Tiere etwa 50% pigmentierte Stellen an Schwanz, Rücken und Kopf auf und sie erscheinen gesund. Das *EDNRB* wurde durch Kreuzungsversuche mit *EDNRB*-Knockout-Mäusen als ursächliches Gen für die *s<sup>l</sup>*-Mutation identifiziert. Hierzu wurden die *s<sup>l</sup>*-Mäuse auf Basis des Phänotyps klassifiziert, heterozygote (*s/s<sup>l</sup>*) Tiere ausgewählt und mit heterozygoten

*EDNRB*-Knockout-Mäusen (*ednrb/+*) verpaart. 30% der Nachkommen zeigten eine starke Weißscheckung und starben innerhalb der ersten 60 Lebenstage an einem Megacolon. Aufgrund der Ähnlichkeit des beobachteten Phänotyps dieser Nachkommen mit dem der *ednrb/ednrb*- und *s<sup>l</sup>/s<sup>l</sup>*-Mäuse, vermuteten die Autoren das Vorliegen eines Genotyps *s<sup>l</sup>/ednrb* (Hosoda *et al.* 1994). Weitere Untersuchungen ergaben das Fehlen von Endothelin-Rezeptoren in der Niere und von *EDNRB*-mRNA in Lunge, Herz und Gehirn. Auf DNA-Ebene zeigten Southern-Blot Analysen das Vorliegen einer Deletion, die das gesamte *EDNRB* mit einschließt.

Matsushima *et al.* (2002) beschrieben eine weitere Maus-Mutante, die neben intestinaler Aganglionose und Megacolon unter Taubheit litt. Auch diesen Tieren fehlten sowohl die Zellen des *Plexus myentericus* als auch die Melanozyten in der Haut. Zudem fehlten den Tieren Zellen der *Stria vascularis* des Innenohrs, was darauf zurückzuführen ist, dass sich diese Zellen zusammen mit den Melanozyten der Haut aus gemeinsamen Vorläuferzellen entwickeln (Tachibana *et al.* 1992). Daher dienen diese Tiere auch als Modelltier für das humane WS IV. Die Autoren fanden weiterhin, dass die WS IV-Mutation bei der Maus allelisch zur *s<sup>l</sup>*-Mutation ist und somit ebenfalls eine Mutation des *EDNRB* darstellt. Die Analyse der *EDNRB*-Transkripte zeigte, dass Trägertieren eine 318 bp umfassende Region fehlt, die die Exons 2 und 3 des *EDNRB* umfasst. Weitergehende Untersuchungen auf DNA-Ebene zeigten eine 598 bp große Deletion, welche von der 3`-Region des Intron 1 (304 bp), über Exon 2 (113 bp) und Intron 2 (132 bp) bis in die 5`-Region des Exon 3 (49 bp) reicht (Ohtani *et al.* 2006).

Neben Mutationen des *EDNRB* sind bei der Maus auch Mutationen im *EDN3*-Gen beschrieben, welches für einen Liganden des *EDNRB* codiert. Betroffene Tiere zeigen, verglichen mit der *sl*-Maus, einen ähnlichen Phänotyp und werden als *lethal-spotted(ls)*-Mäuse bezeichnet. Homozygote Tiere zeigen verschiedene Grade von Weißscheckung auf dem Rücken, während der Bauch fast immer vollständig weiß ist. Pigmentierte Bereiche befinden sich im Bereich des Kopfes und der Hüften. Heterozygote Tiere erscheinen phänotypisch normal (Baynash *et al.* 1994).

Der genetische Hintergrund scheint einen starken Einfluss auf die phänotypische Penetranz zu haben. Bei manchen Mäusestämmen stellt die Mutation einen Letalfaktor dar. In Untersuchungen starben alle homozygoten Tiere innerhalb der ersten 2-3 Lebenswochen und wenige erreichten die Geschlechtsreife. Mäuse anderer Herkünfte schienen weniger stark zu erkranken und überlebten in den meisten Fällen (Silvers 1979).

Es handelt sich in diesem Fall um eine Punktmutation im *EDN3*, in einem Bereich, der für die hoch konservierte C-terminale Region des *EDN3*-Proteins codiert. Die Missense-Mutation C > T an Nukleotid 409 der cDNA führt zu einer Substitution von Arg > Trp an Position 137 der Proteinsequenz. Die Substitution verhindert die proteolytische Aktivierung von *Big-Edn3* durch *Ece1* (Baynash *et al.* 1994).

Die *dominant-megacolon(dom)*-Maus ist Träger einer dominant vererbten Mutation im *SOX10*-Gen (Southard-Smith *et al.* 1998), welches ein Mitglied der *SOX(SRY-related HMG-box)*-Transkriptionsfaktoren-Familie codiert. Es ist bekannt, dass das Gen Regulationsfunktionen auf dem Weg der Zelldifferenzierung in der embryonalen Entwicklung übernimmt (Southard-Smith

*et al.* 1998). Heterozygote Tiere zeigen einen weißen Bauch und leiden unter einem Megacolon aufgrund einer Ganglienaplasie im *Plexus myentericus*. In homozygoter Form führt die Mutation in den meisten Fällen bereits in den ersten 13 Tagen der Gravidität zum Abort, da in diesem Fall die Migration von NCC in den Embryo erheblich gestört ist. Nur wenige Embryos entwickeln sich bis zur Geburt, versterben dann aber innerhalb einiger Stunden (Lane und Liu 1984).

Die Sequenzierung der *SOX10*-Transkripte der *dom*-Mäuse ergab eine A > T-Mutation an Position 32 des ORF. Hierdurch erfolgt ein Aminosäureaustausch von Glu > Val. Die zusätzliche Insertion eines G an Position 579 des ORF führt bei der Transkription zu einer Änderung des Leserasters. Dadurch bleiben die ersten 193 Aminosäuren des *SOX10*-Proteins, inklusive der HMG-Domäne intakt. Die 273 verbleibenden Aminosäuren des Proteins werden jedoch nicht korrekt translatiert. Der Carboxyl-Rest besteht in diesem Fall aus nur 99 fehlerhaften Aminosäuren, wobei offensichtlich ein entstandenes Stopp-Codon im Anschluss zum Abbruch der Translation führt.

Die *SOX10*-Genexpression im Gehirn homozygoter und heterozygoter *dom*-Mäuse war unverändert, während sie im Darm bei heterozygoten Tieren signifikant reduziert war und bei homozygoten Tieren unter der Nachweisgrenze lag (Herbarth *et al.* 1998).

### 2.3.3 Hypopigmentierungssyndrome beim Kaninchen

Der *English-spotting(En)*-Locus ist ein unvollständig dominantes Allel beim Hauskaninchen. Tiere, die nicht Träger der Mutation sind (*en/en*), tragen ein einfarbiges Haarkleid, während heterozygote Tiere eine intensive Scheckung mit pigmentierten Bereichen entlang der Wirbelsäule, des Kopfes, der Ohren und der Hüfte aufweisen (Fontanesi *et al.* 2010). Auf den *EN/en*-Genotyp wird beim *Deutschen Riesenschecken* für Schauzwecke selektiert, da das im Rassestandard festgelegte Idealbild des *Deutschen Riesenschecken* (Zentralverband Deutscher Rasse-Kaninchenzüchter e.V.) vermutlich Folge von Heterozygotie am *En*-Locus ist. Homozygote Tiere zeigen nur einen unvollständigen Aalstrich und keine Seitenzeichnung, sie werden als Hellschecken bezeichnet. Homozygote *En/En*-Tiere weisen eine verminderte Vitalität auf und leiden unter einem Megacolon (Fontanesi *et al.* 2010). Aufgrund der Ähnlichkeit des Phänotyps mit bekannten Hypopigmentierungssyndromen bei Mäusen und Ratten (Arai *et al.* 1993; Gariepy *et al.* 1996), wurde das *EDNRB*-Gen als ursächliches Kandidatengen für die Scheckung untersucht. Dabei zeigten sich keine Mutationen, mit einer signifikanten Assoziation zum Phänotyp des *Deutschen Riesenschecken* (Fontanesi *et al.* 2010). Eine Klärung der molekularen Basis des *En*-Locus steht noch weiterhin aus.

### 2.3.4 Hypopigmentierungssyndrome beim Pferd

Eine Punktmutation im *EDNRB* ist nachweislich für das Auftreten des Overo-Lethal-White-Foal(OLWF)-Syndroms beim Pferd verantwortlich. Das Syndrom

tritt bei amerikanischen (Metallinos *et al.* 1998; Santschi *et al.* 1998) und australischen (Yan *et al.* 1998) Paint Horses auf, die aus einer Anpaarung so genannter Overo-Frame-Schecken stammen. Dabei können Fohlen geboren werden, die keine Scheckung, sondern ein vollständig weißes Haarkleid tragen. Diese Fohlen leiden unter intestinalen Obstipationen, aufgrund des Fehlens myenterischer und submuköser Ganglienzellen in distalen Teilen des Dünndarms bis hin zum Dickdarm. Untersuchungen ergaben eine Punktmutation von 2 Nukleotiden (TC > AG) im *EDNRB*. Die Mutation befindet sich im Exon 1 an Position 353 und 354 der cDNA und führt zum Austausch einer Aminosäure an Position 118 des EDNRB-Proteins (Ile > Lys). Dieser Bereich der cDNA codiert für die erste Transmembrandomäne und ist im Vergleich mit anderen Säugetierspezies hoch konserviert. Der Aminosäureaustausch der hydrophoben Aminosäure Isoleucin in das polare Lysin führt zu einer Konformationsänderung und damit zum Funktionsverlust des entstehenden Proteins (Metallinos *et al.* 1998; Santschi *et al.* 1998). Alle getesteten weißgeborenen Fohlen waren homozygot für die Mutation, während sie bei den Elterntieren in heterozygoter Form nachgewiesen wurde. In diesem Fall liegt ein autosomal rezessiver Erbgang zugrunde, der bei Verpaarung von heterozygoten Anlageträgern mit einer Wahrscheinlichkeit von 25% zur Geburt homozygoter Merkmalsträger führt.

### **2.3.5 Hypopigmentierungssyndrome beim Menschen**

Beim Menschen wird das Krankheitsbild mit einer variablen Kombination aus Hypopigmentierung, Taubheit und Gesichtsdysmorphien unter dem Oberbegriff

Waardenburg-Syndrom zusammengefasst. Die Krankheit kann durch Mutationen in unterschiedlichen Genen hervorgerufen werden und tritt mit einer Häufigkeit von etwa 1/42.000 auf (Read und Newton 1997). Hierbei werden, je nach Vorhandensein oder Fehlen bestimmter Symptome, vier Untergruppen unterschieden.

Das WS Typ I ist gekennzeichnet durch Pigmentstörungen der Haare oder der Haut sowie durch eine intensiv blaue Iris bzw. Heterochromie der Augen. Des Weiteren leiden betroffene Patienten in der Regel unter einem congenitalen, sensorineuralen Hörverlust, verursacht durch das Fehlen von Melanozyten in der *Stria vascularis* des Innenohrs (Steel und Barkway 1989). Zudem zeigen WS Typ I Patienten die Gesichtsdysmorphie *Dystopia canthorum*, die beim WS Typ II fehlt. WS Typ III Patienten weisen neben den typischen Symptomen des WS Typ I eine Hypoplasie der Muskulatur in den oberen Extremitäten auf (Read und Newton 1997).

Tassabehji *et al.* (1992) identifizierten Mutationen im humanen *PAX3*-Gen in 6 von 17 nicht verwandten Patienten mit WS Typ I. Weitere Mutationen im *PAX3* wurden von Hoth *et al.* (1993) bei Patienten mit WS Typ I und III identifiziert. WS Typ II Patienten scheinen von Mutationen in *PAX3* nicht betroffen zu sein. In zwei betroffenen Familien konnten jedoch Mutationen im *MITF*-Gen nachgewiesen werden (Hughes 1994; Tassabehji *et al.* 1994).

Das WS Typ IV (Shah-Waardenburg-Syndrom) ist ebenfalls durch die genannten Pigmentanomalien charakterisiert. Zudem leiden betroffene Patienten aber unter HD. HD ist eine erbliche Fehlbildung des enterischen Nervensystems des Darms. Hierbei erfolgt im Laufe der embryonalen Entwicklung keine oder nur eine unvollständige Besiedlung des Darms mit

Nervenzellen aus der Neuralleiste (Mccallion und Chakravarti 2001; Iwashita *et al.* 2003). Dies führt, wie in den beschriebenen Tiermodellen, zur Entstehung von aganglionären Segmenten im Bereich des *Plexus submucosus* bzw. *Plexus myentericus* und damit zum aganglionären Megacolon. Die HD tritt nicht ausschließlich in Zusammenhang mit den für das WS beschriebenen Pigmentanomalien auf, sondern kommt ebenso isoliert vor (Tüysüz *et al.* 2009).

WS Typ IV Patienten sind häufig Träger von Mutationen im *EDNRB*. Es konnte belegt werden, dass ein SNP (C > G) im Codon 183 des Exon 2 zu einem Aminosäureaustausch (Ala > Gly) in der dritten Transmembrandomäne des *EDNRB*-Proteins führt (Attié *et al.* 1995).

Auch Mutationen im *EDN3* können für das Auftreten der Krankheit ursächlich sein. Eine homozygote Substitution und Deletion (GC > T) im Codon 262 des Exon 2 führte bei einer untersuchten Patientin zu totaler Colonaganglionose, bilateraler, sensorineuraler Taubheit sowie Pigmentstörungen. Die beschriebene Mutation resultiert durch eine Leserasterverschiebung downstream in 120 fehlerhaften Aminosäuren. Zudem wird die Translation durch ein entstandenes Stopp-Codon vorzeitig abgebrochen, was bei der beschriebenen Patientin zum Totalverlust von funktionellem *EDN3*-Protein führte (Edery *et al.* 1996). Der Erbgang ist in beiden Fällen rezessiv, d.h. nur homozygot betroffene Personen sind Merkmalsträger des WS Typ IV, während HD isoliert auch dominant, mit variabler, geschlechtsabhängiger Penetranz vererbt wird (Puffenberger *et al.* 1994a). Auch Mutationen im *SOX10* können für das Auftreten von WS Typ IV beim Menschen verantwortlich sein (Pingault *et al.* 1998).

Wie bei der Ratte (Dang *et al.* 2011) konnte auch beim Menschen belegt werden, dass die Familienzugehörigkeit bei identischer zu Grunde liegender Mutation einen entscheidenden Einfluss auf den Verlauf und die Ausprägung des Krankheitsgeschehens hatte (Pingault *et al.* 2010). Abbildung 5 liefert eine Übersicht über die Häufigkeiten der Beteiligung verschiedener Gene an den vier Formen des WS.

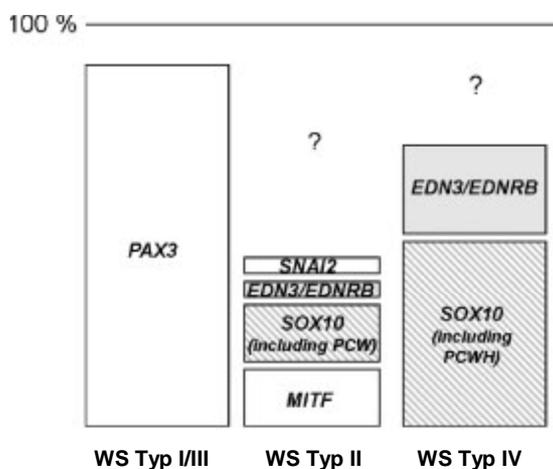


Abbildung 5: Gegenwärtiger Wissensstand über die molekulare Basis der verschiedenen Formen des Waardenburg-Syndroms (Pingault *et al.* 2010).

## 2.4 Endothelin-Rezeptor-Typ B (EDNRB)

Der EDNRB gehört zu den sogenannten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Dabei handelt es sich um metabotrope Rezeptoren, die zuerst im Zuge der Klonierung des bovinen Opsins beschrieben wurden (Nathans und Hogness 1983). Nachdem im Jahre 1986 auch die Klonierung des Gens und der cDNA für den  $\beta$ -adrenergenen Rezeptor in Säugetierzellen gelang (Dixon *et al.* 1986), wurden bis heute über 2000 weitere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren identifiziert. Diese werden in Abhängigkeit von ihrer Ligandenstruktur, der

Rezeptorfunktion und der Sequenzhomologie in über 100 Untergruppen gegliedert und spielen eine wichtige Rolle in der Verarbeitung von Sinnesreizen, beim Stofftransport durch die Zellmembran sowie bei der Regulation von Zellwachstum und Zelldifferenzierung. Des Weiteren vermitteln sie die Wirkung bestimmter Hormone und Neurotransmitter.

Mutationen in Bereichen die für derartige Rezeptoren codieren, führen in der Regel dazu, dass der Rezeptor nicht mehr in der Lage ist, den entsprechenden Liganden zu binden oder eine fehlerhafte Signaltransduktion vornimmt. Je nach Funktion des Rezeptors kann dadurch eine Vielzahl von verschiedenartigen Störungen auftreten (Saito *et al.* 1991; Ji *et al.* 1998).

In einigen Fällen treten aber auch vorteilhafte Mutationen auf. Einige Viren nutzen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren als Bindungsstelle zum Eindringen in die Zelle. Im Falle einer Mutation des entsprechenden Rezeptors ist das Virus in der Regel nicht in der Lage, die betreffende Zelle zu infizieren. Beispielsweise verhindert eine Mutation im Gen des Chemokin-5-Rezeptors, der einen Cofaktor für das humane Immundefizienz Virus darstellt, bei dafür homozygoten Personen eine Infektion (Liu *et al.* 1996).

### **2.4.1 Wirkungsweise von Endothelinrezeptoren und deren Liganden im adulten Organismus**

Das Endothel stellt die zelluläre Auskleidung aller Gefäße und serösen Körperhöhlen dar und bildet damit die anatomische Grenze zwischen dem zirkulierenden Blut und der Gefäßwand. Weiterhin handelt es sich um ein

stoffwechselaktives Organ, indem es durch Synthese und Degradation vasoaktiver Substanzen aktiv an der Regulation des Blutdrucks beteiligt ist. Bereits Hickey *et al.* (1985) berichteten über einen vasokonstriktiven Faktor in einer Zellkultur boviner Endothelzellen.

Bei diesem Faktor handelte es sich um Endothelin, welches im Jahr 1988 zunächst in Form seiner Vorstufe Präproendothelin aus dem Aorta-Endothel von Schweinen isoliert wurde (Yanagisawa *et al.* 1988). Die Klonierung und Sequenzierung der cDNA ergab ein Peptid aus 21 Aminosäuren mit 4 Cystein-Resten, die über 2 Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Dadurch erhält das Peptid eine zirkuläre Struktur (Yanagisawa *et al.* 1988). Durch Southern-Blot-Analysen konnten in der DNA von Mensch, Schwein und Ratte 3 chromosomale Loci nachgewiesen werden, die für 3 Isoformen des Endothelins codieren. Die verschiedenen Formen wurden mit Endothelin-1 (EDN1), Endothelin-2 (EDN2) und Endothelin-3 (EDN3) benannt, wobei sich die verschiedenen Formen in ihrer Sequenz nur geringfügig unterscheiden (Abb. 6) (Inoue *et al.* 1989). Die Autoren konnten weiterhin zeigen, dass die Endothelin-mRNA-Expression durch verschiedene vasoaktive Substanzen wie Thrombin und Adrenalin gesteigert werden konnte. Endothelin ist seither als wirksamer Vasokonstriktor bekannt und spielt eine entscheidende Rolle bei der physiologischen Regulation des Blutdrucks (Haynes *et al.* 1996).

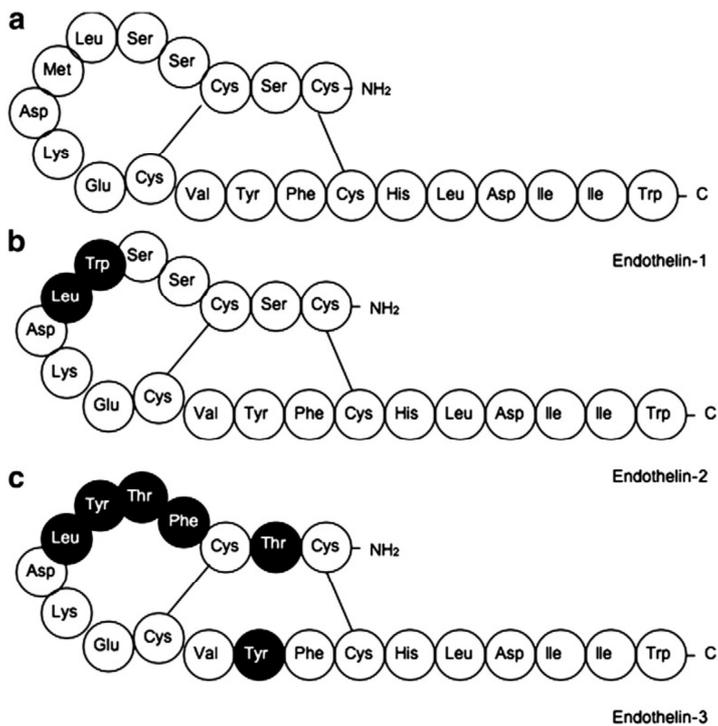
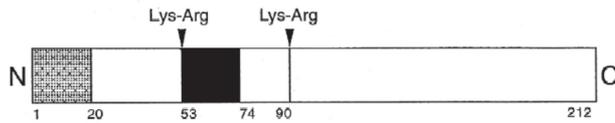


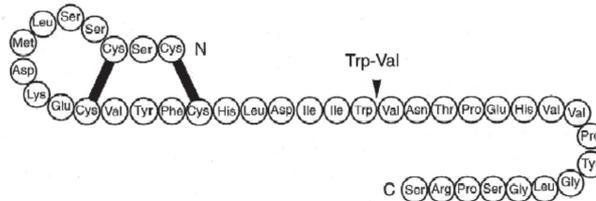
Abbildung 6: Isoformen des Endothelins. Unterschiede von EDN2 und EDN3 im Vergleich zu EDN1 sind in der Abbildung schwarz hervorgehoben (Khimji und Rockey 2010).

Die Sequenzierung der cDNA ergab, dass die Endothelinsynthese über die Vorstufe Präproendothelin und das Zwischenprodukt Big-Endothelin (Big-ET) erfolgt (Yanagisawa *et al.* 1988). Präproendothelin wird durch eine spezifische Endopeptidase gespalten und auf diese Weise in die Zwischenform Big-ET überführt. Big-ET wird nun seinerseits mit Hilfe des Endothelin-konvertierenden Enzyms (ECE) gespalten und in ET überführt (Shimada *et al.* 1994; Xu *et al.* 1994; Masaki 1998) (Abb. 7).



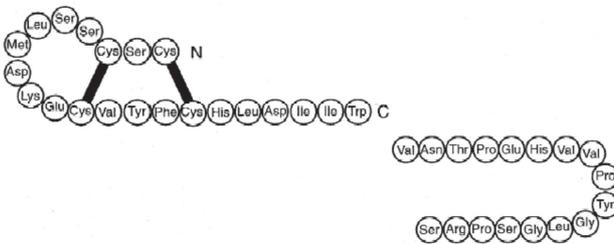
**Präproendothelin**

↓ *furin-like endopeptidase(s)*



**Big-Endothelin**

↓ *endothelin converting enzyme*



**Endothelin**

Abbildung 7: Biosynthese des porcinen Endothelin aus dem Vorläufer Präproendothelin. Eine Endopeptidase, die spezifisch Paare dibasischer Aminosäuren spaltet, generiert aus dem Vorläufer das Big-ET, welches mittels ECE zu Endothelin umgewandelt wird (Masaki 1998).

Die Klonierung der beiden entsprechenden *Endothelin-Rezeptoren A* und *B* gelang im Jahr 1990 (Arai *et al.* 1990; Sakurai *et al.* 1990). Daraufhin erfolgte die Isolierung von EDNRB-Protein aus bovinem Lungenepithel, wodurch eine weitere Charakterisierung des Rezeptors ermöglicht wurde (Kozuka *et al.* 1991).

Die beiden Endothelin-Rezeptor-Subtypen A und B haben charakteristische Affinitäten zu ihren Liganden und werden in unterschiedlichen Geweben vermehrt exprimiert. Der EDNRA hat eine höhere Affinität zu den beiden

Liganden EDN1 und EDN2 und ist vornehmlich für die endothelinduzierte Vasokonstriktion auf glatten Gefäßmuskelzellen verantwortlich (Bax *et al.* 1994). Der EDNRB hat dagegen seinen Hauptwirkungsort an den Endothelzellen der Gefäße, wo er im Gegensatz zum EDNRA für die vasodilatative Wirkung zuständig ist. Der EDNRB besitzt eine gleichmäßige Affinität zu allen 3 Endothelin-Isoformen (Tsukahara *et al.* 1994).

#### **2.4.2 Einfluss von *EDNRB*-Mutationen auf die embryonale Entwicklung**

Es ist bekannt, dass sowohl Mutationen im *EDNRB* (Hosoda *et al.* 1994) als auch Defekte im *EDN3* (Baynash *et al.* 1994) während der Embryogenese zu einer unvollständigen oder fehlenden Besiedlung der entsprechenden Gewebe mit enterischen Neuronen und Melanozyten aus der Neuralleiste führen. Aus der Neuralleiste entwickeln sich pluripotente Vorläuferzellen, unter dem Einfluss verschiedener Signalmoleküle, in die spezifischen Zellen ihres Zielgewebes (Calloni *et al.* 2009). Für eine korrekte, spezifische Entwicklung dieser Zellen ist das Vorhandensein dieser Signalmoleküle zum richtigen Zeitpunkt und am richtigen Ort von entscheidender Bedeutung. Zunächst wurde vermutet, dass das Vorhandensein von EDN3 und dessen Rezeptor EDNRB essentiell für die Differenzierung von NCC in enterische Neuronen ist (Baynash *et al.* 1994). Diese Hypothese konnte nicht erklären, warum die Besiedlung der proximalen Darmbereiche mit enterischen Neuronen auch unter Abwesenheit von EDN3 oder EDNRB erfolgt. Lahav *et al.* (1996) vermuteten, dass EDN3 aufgrund seines stark mitogenen Effekts die Zellproliferation steigert. Möglicherweise wird nur so die Menge enterischer Neuronen produziert, die ausreichend ist, um

den gesamten Darm vollständig zu kolonialisieren. Weiterhin wird vermutet, dass EDN3 und der EDNRB die Entwicklung und Differenzierung enterischer Neuronen inhibieren, bis sie den gesamten Darm kolonialisieren und an ihrem Zielgewebe angekommen sind. Eine verfrühte Ausdifferenzierung der Zellen kann zur Folge haben, dass Zellmigration und -proliferation in einem Stadium eingestellt werden, in dem die Besiedlung des entsprechenden Gewebes noch nicht vollständig erfolgt ist (Hearn *et al.* 1998; Wu *et al.* 1999).

*EDNRB*-Mutationen verursachen beim Menschen in homozygoter Form das WS Typ IV, welches sich in Pigmentstörungen sowie aganglionärem Megacolon manifestiert (Puffenberger *et al.* 1994a; Attié *et al.* 1995; Verheij *et al.* 2002). Die heterozygote Form verursacht jedoch in der Regel ausschließlich ein aganglionäres Megacolon, bekannt unter dem Begriff HD (Puffenberger *et al.* 1994a; Zhang *et al.* 2007). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass Melanozyten und enterische Ganglienzellen unterschiedlich empfindlich auf verschiedene Spiegel der *EDNRB*-Signaltransduktion reagieren.

### **2.4.3 Molekulargenetische Charakterisierung des *EDNRB*-Gens**

Für das Schaf existiert in der Genbank nur eine unvollständige codierende Sequenz des *EDNRB* (Genbank Referenz Sequenz AF349439.1) und die vorhandene genomische Sequenz „Sheep chromosome sequence 1.0“ (<https://isgdata.agresearch.co.nz/>) ist ebenfalls unvollständig und beinhaltet viele größere Lücken (Stand 01.01.2014). Bei einigen anderen Spezies sind hingegen bereits vollständige genomische und codierende Sequenzen des Gens verfügbar (Tabelle 1). Das Rind ist die einzige Spezies der Gattung

Wiederkäuer, bei der bereits eine vollständige molekulargenetische Charakterisierung des Gens erfolgt ist.

Das *EDNRB*-Gen hat beim Rind eine Gesamtlänge von etwa 96 kb, wobei die codierende Region sich in 7 Exon- und 6 Intronbereiche unterteilen lässt. Die Länge der Exonbereiche liegt zwischen 108 und 686 bp, die der Intronbereiche zwischen 134 bp und 71,4 kb, wobei das Intron 1 mit einer Länge von 18,7 kb und das Intron 4 mit 71,4 kb die längsten Intronbereiche darstellen (Genbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) Referenz Sequenz AC\_000169). Die Struktur des Gens ist in Abbildung 8 schematisch dargestellt. Die Exonbereiche korrespondieren gut mit den strukturellen Domänen des Rezeptors (Arai *et al.* 1993) und die Gesamtlänge der mRNA beträgt 2026 bp (Genbank Referenz Sequenz NM\_174309.2).

Tabelle 1: Genbankeinträge genomischer und codierender Sequenzen des *EDNRB* bei verschiedenen Spezies.

| Gattung | Spezies                  | Genbank Eintrag            | Referenz                                 |
|---------|--------------------------|----------------------------|--|
| Rind    | <i>Bos taurus</i>        | AC_000169 (genomisch)      | Zimin <i>et al.</i> (2009)               |
|         |                          | NM_174309.2 (mRNA)         | Zimin <i>et al.</i> (2009)               |
| Mensch  | <i>Homo sapiens</i>      | NG_011630.1 (genomisch)    | Ogawa <i>et al.</i> (1991)               |
|         |                          | D90402.1 (mRNA)            | Wilson <i>et al.</i> (2012)              |
| Maus    | <i>Mus musculus</i>      | NC_000080.5 (genomisch)    | Church <i>et al.</i> (2009)              |
|         |                          | NM_001136061 (mRNA)        | Kisanuki <i>et al.</i> (2010)            |
| Ratte   | <i>Rattus norvegicus</i> | NC_005114.2 (genomisch)    | Gibbs <i>et al.</i> (2004)               |
|         |                          | NM_017333.1(mRNA)          | Sandhu <i>et al.</i> (2010)              |
| Pferd   | <i>Equus caballus</i>    | NC_009160.2 (genomisch)    | Horse Genome Project (2010)              |
|         |                          | NM_001081837.1(mRNA)       | Keen <i>et al.</i> (2008)                |
| Schwein | <i>Sus scrofa</i>        | NC_010453.2 (genomisch)    | Porcine Genome Sequencing Project (2010) |
|         |                          | NM_001038002 (mRNA)        | Farhat <i>et al.</i> (2008)              |
| Schaf   | <i>Ovis aries</i>        | NC_019467 (genomisch)      | Int. Sheep Genomics Consortium (2010)    |
|         |                          | XM_004012321.1 (mRNA)      |  |
| Ziege   | <i>Capra hircus</i>      | EU644500.1 (Exons 2, 6, 7) | Nicoloso <i>et al.</i> (2012)            |



Abbildung 8: Struktur des bovinen *EDNRB* (Genbank Referenz Sequenz AC\_000169).

#### 2.4.4 Zytogenetische Charakterisierung des *EDNRB*-Gens

Das *EDNRB*-Gen wurde beim Schaf durch Di Meo *et al.* (2007) anhand R-gebänderter Präparate auf dem ovinen Chromosom 10q22 kartiert (Abb. 9). Beim Rind befindet sich das Gen auf dem homologen Chromosom 12q22 (Schläpfer *et al.* 1997) und beim Menschen auf Chromosom 13q22 (Arai *et al.* 1993).

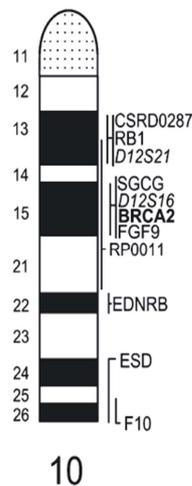


Abbildung 9: R-gebändertes Ideogramm des ovinen Chromosom 10 mit zytogenetischer Kartierung des *EDNRB* auf OAR10q22 (Di Meo *et al.* 2007).

Beim Wasserbüffel (*Bubalus bubalis*) wurde das *EDNRB* auf Chromosom 13q22 kartiert (Iannuzzi *et al.* 2003), wobei diese Stelle auch als fragiler Bereich identifiziert wurde (Nicodemo *et al.* 2008). Fragile Bereiche sind spezifische Loci auf Metaphasenchromosomen, die unter bestimmten Kulturbedingungen in unterschiedlicher Häufigkeit Lücken, Bruchstellen oder Translokationen aufweisen (Schwartz *et al.* 2006).

#### 2.4.5 Proteinstruktur des EDNRB

Alle G-Protein-gekoppelten Rezeptoren weisen eine ähnliche Struktur auf (Abb. 10). Allgemein befindet sich auf der extrazellulären Seite ein N-terminales Segment mit einer Aminogruppe. Das C-terminale Segment ist auf der cytoplasmatischen Seite lokalisiert und trägt eine Carboxylgruppe. Der Rezeptor wird durch 7 Transmembrandomänen in der Zellmembran verankert. Diese sind über 3 Exoloops und 3-4 Cytoloops miteinander verbunden. Wenn das Cystein am C-terminalen Segment palmitoliert ist, entsteht ein vierter, zusätzlicher Cytoloop. Jede der Transmembrandomänen besteht aus etwa 20-27 Aminosäuren, die Längen der N-terminalen (7-595 Aminosäuren) und C-terminalen (12-395 Aminosäuren) Enden und die der Loops (5-230 Aminosäuren) können dagegen stark variieren (Ji *et al.* 1998). Die Aminosäuresequenz des EDNRB ist innerhalb verschiedener Säugetierspezies hoch konserviert. Der bovine EDNRB-Rezeptor weist eine Gesamtlänge von 441 Aminosäuren auf und die Sequenzhomologie zwischen dem Rind und dem Menschen wird mit 89% angegeben (Davenport 2002).

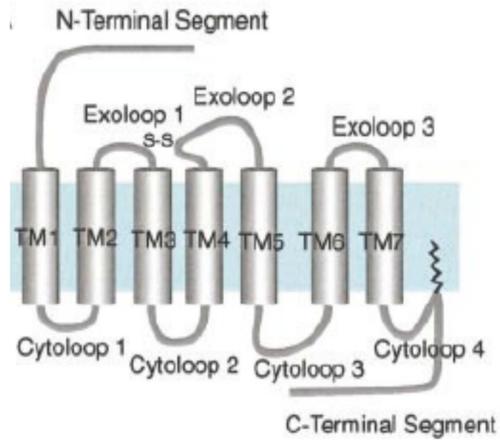


Abbildung 10: Schematische Darstellung der allgemeinen Struktur G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (Ji *et al.* 1998).

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Material**

##### **3.1.1 Fallbeschreibung**

In einer kleinen Herde ( $n = 27$ ) von Kamerunschafen wurden über einen Zeitraum von 2 Jahren insgesamt 5 Lämmer mit weißer Fellfarbe und blauen Augen geboren. Üblicherweise zeigen Kamerunschaflämmer eine rassetypische braunschwarze Färbung des Fells sowie eine braun gefärbte Iris (Verein der Kamerunschafzüchter und -halter e.V.). Die betroffenen Lämmer überlebten *p.p.* maximal 48 h und stammten von demselben Bock ab. Dieser Bock war über einen Zeitraum von mindestens 3 Jahren als Deckbock in der Herde eingesetzt worden, wobei er auch an seine eigene weibliche Nachzucht wieder angepaart wurde. Der betreuende Tierarzt kontaktierte das Institut für Tierzucht und Haustiergenetik nach dem Tod des 4. hypopigmentierten Lamms.

Das 4. hypopigmentierte Lamm (Lab. Nr. 2914-2008) wurde völlig weiß mit blauen Augen geboren. Nach wenigen Tagen verstarb das Lamm. Der Kadaver wurde in Stoff eingehüllt und beerdigt, anschließend exhumiert und bis zur Abholung über 2 Tage im Kühlschrank gelagert. Der Kadaver wurde in der Veterinär-Pathologie der JLU Gießen fotografiert und obduziert. Etwa 3 Wochen später, wurde in der Herde ein weiteres Lamm mit hypopigmentiertem Phänotyp geboren. Dieses Lamm war ebenfalls fast vollständig weiß und hatte blaue Augen, erschien aber anfänglich den Besitzern vitaler als die bisherigen betroffenen Lämmer. Wie auch bei dem vorangegangenen Lamm, hatten die

Besitzer bis zum Tode des Tieres keinen Absatz von Mekonium bzw. Kot beobachten können. Zwei Tage *p.p.* wurde durch den Haustierarzt ein schlechter Allgemeinzustand des Lamms festgestellt. Daraufhin erfolgte eine Blutentnahme zur Bestimmung klinischer und hämatologischer Parameter. Das Lamm (Lab. Nr. 3077-2008) verstarb 2 Tage *p.p.*. Der Kadaver wurde gekühlt gelagert und transportiert und etwa 24 h *p.m.* in der Veterinär-Pathologie der JLU Gießen fotografiert und obduziert (Tgb.-Nr. 959/08).

### **3.1.2 Probenmaterial**

Das für diese Arbeit gesammelte Probenmaterial ist in Tabelle 2 aufgeführt. Aus der betroffenen Herde (Betrieb 1) wurden Blutproben von 27 Tieren genommen. Darunter befanden sich auch 3 Mutterschafe, die bereits ein hypopigmentiertes Lamm geboren hatten sowie eine Großmutter und eine Urgroßmutter der hypopigmentierten Lämmer. Außer in dieser Kamerunschafherde (Betrieb 1), wurden insgesamt 127 Proben in 8 weiteren Kamerunschafherden (Betrieb 2-9) gesammelt. Davon wiesen insgesamt 10 Tiere weiß gescheckte Bereiche im Fell auf. Die Blutentnahme erfolgte für die molekulargenetischen Untersuchungen in Monovetten mit K-EDTA (*Sarstedt AG & Co.*, Nümbrecht). Für die zytogenetischen Untersuchungen wurden 2 Blutproben aus der betroffenen Herde sowie je eine Probe aus der Schafherde und der Rinderherde der Lehr- und Forschungsstation Oberer Hardthof (LuF OH) der JLU Gießen in BD-Vacutainern mit Na-Heparin (*BD Plymouth*, United Kingdom) entnommen. Die Entnahme von Blutproben im Rahmen dieser Arbeit diente

diagnostischen Zwecken und stellt daher, nach §8a (1) 2a des deutschen Tierschutzgesetzes, keinen genehmigungspflichtigen Tierversuch dar.

Tabelle 2: Probenmaterial für die molekulargenetischen und zytogenetischen\* Analysen.

| <b>Herkunft</b> | <b>Tierart/Rasse</b>             | <b>Phänotyp</b> | <b>Probenmaterial</b> | <b>Anzahl</b> |
|-----------------|----------------------------------|-----------------|-----------------------|---------------|
| Betrieb 1       | Kamerunschaf                     | hypopigmentiert | Zungengewebe          | 2             |
|                 | Kamerunschaf                     | rassetypisch    | Vollblut              | 27            |
|                 | Kamerunschaf                     | rassetypisch    | Vollblut              | 2*            |
| Betrieb 2       | Kamerunschaf                     | rassetypisch    | Vollblut              | 6             |
| Betrieb 3       | Kamerunschaf                     | rassetypisch    | Vollblut              | 14            |
| Betrieb 4       | Kamerunschaf                     | rassetypisch    | Vollblut              | 20            |
| Betrieb 5       | Kamerunschaf                     | rassetypisch    | Vollblut              | 9             |
| Betrieb 6       | Kamerunschaf                     | rassetypisch    | Vollblut              | 30            |
| Betrieb 7       | Kamerunschaf                     | rassetypisch    | Vollblut              | 16            |
| Betrieb 8       | Kamerunschaf                     | rassetypisch    | Vollblut              | 10            |
| Betrieb 9       | Kamerunschaf                     | rassetypisch    | Vollblut              | 22            |
| LuF OH          | Merinolandschaf<br>(männlich)    | rassetypisch    | Vollblut              | 1*            |
| LuF OH          | Dt. Holstein-<br>Rind (männlich) | rassetypisch    | Vollblut              | 1*            |

### 3.1.3 Geräte

|  |   |
|--|---|
| ABI 3130 Genetic Analyzer                            | <i>Applied Biosystems, Darmstadt</i>  |
| Analysewaage AC211S                                  | <i>Sartorius AG, Göttingen</i>  |
| Autoklav Webeco Modell C                             | <i>Webeco, Bad Schwartau</i>  |
| Bidestanlage Bi-Dest 2302                            | <i>Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel</i>                         |
| Corbett Rotor Gene RG 3000                           | <i>Corbett LifeScience, Mortlake, Australien</i>                            |
| Digital Graphic Printer UP-D895                      | <i>Sony, Tokyo, Japan, Vertrieb in Deutschland über Biometra, Göttingen</i> |
| Distribiman Pipette                                  | <i>Gilson International B.V., Bad Camberg</i>                               |
| Eismaschine Scotsman AF10                            | <i>Kälte Mack, Maintal</i>  |
| Elektrophoresekammer                                 | <i>Peqlab, Erlangen</i>   |
| Fluoreszenzmikroskop                                 | <i>Olympus Europa Holding GmbH, Hamburg</i>                                 |
| Gelkämme und Gelschlitten                            | <i>Peqlab, Erlangen</i>   |
| Genetic Analyzer 3130                                | <i>Applied Biosystems, Darmstadt</i>  |
| Inkubator Certomat H                                 | <i>B.Braun, Melsungen</i>   |
| Inkubator Heraeus BC 50042301                        | <i>Heraeus Instruments GmbH, Hanau</i>                                      |
| Magnetrührer MR2002                                  | <i>Heidolph, Kelkheim</i>   |
| Mikrowelle   | <i>Siemens-Elektrogeräte GmbH, München</i>                                  |
| Multipette   | <i>Eppendorf AG, Hamburg</i>  |
| Nanodrop Spectrophotometer ND-100                    | <i>Thermo Scientific, Schwerte</i>  |
| Netzgerät ConsortE425 f. Elektrophorese              | <i>MAGV, Rabenau-Londorf</i>  |
| Netzgeräte Power Pac 1000 und 3000 f. Elektrophorese | <i>Bio-Rad, München</i>   |
| Pipetten Pipetman P10, P20, P100, P200, P1000        | <i>Gilson International B.V., Bad Camberg</i>                               |

|   |   |
|---|---|
| Schüttelplatte KS10                             | <i>Edmund Bühler, Tübingen</i>                      |
| Thermocycler iCycler 96well                     | <i>Bio-Rad, München</i>                             |
| Thermocycler Peqstar 96 Universal Gradient      | <i>Peqlab Biotechnologiers GmbH,<br/>Erlangen</i>   |
| Transferpette <sup>®</sup> -8 von 2,5 bis 25 ml | <i>Brand GmbH + Co KG,<br/>Wertheim</i>             |
| Transilluminator Biometra Ti5                   | <i>Biometra, Göttingen</i>                          |
| Vortex Reax 2000                                | <i>Heidolph, Kelkheim</i>                           |
| Waage E1B120                                    | <i>OHAUS, Schweiz</i>                               |
| Waage KERN EW2200                               | <i>Kern &amp; Sohn, Balingen</i>                    |
| Wasserbad                                       | <i>Köttermann Labortechnik, Uetze-<br/>Hänigsen</i> |
| Wasserbad GFL                                   | <i>MAGV, Rabenau-Londorf</i>                        |
| Wasserbad Julabo 22A                            | <i>Julabo Labortechnik, Saalbach</i>                |
| Zentrifuge Biofuge 13R                          | <i>Heraeus Instruments GmbH,<br/>Hanau</i>          |
| Zentrifuge 5804 mit Rotor A-2-DWP               | <i>Eppendorf AG, Hamburg</i>                        |
| Zentrifuge 5810R mit Rotor A-4-62               | <i>Eppendorf AG, Hamburg</i>                        |
| Zentrifuge/Vortex Combi-spin FVL 2400           | <i>Peqlab, Erlangen</i>                             |
| Zentrifuge Minispin Plus                        | <i>Eppendorf AG, Hamburg</i>                        |

### 3.1.4 Verbrauchsmaterialien

|   |   |
|---|---|
| 4-titude Adhesive PCR Seal                                | <i>Units 4B&amp;C, United Kingdom</i>   |
| BD Vacutainer (Na-Heparin) 6 ml                           | <i>BD Plymouth, United Kingdom</i>      |
| Biosphere <sup>®</sup> Filter Tips 10 µl, 100 µl, 1000 µl | <i>Sarstedt AG &amp; Co., Nümbrecht</i> |
| Falconröhrchen 15 ml & 50 ml                              | <i>Sarstedt AG &amp; Co., Nümbrecht</i> |
| Latexhandschuhe Manufix sensitiv                          | <i>B.Braun, Melsungen</i>               |
| Light Duty Tissue Wipers                                  | <i>VWR Int. GmbH, Darmstadt</i>         |
| Micro Amp <sup>™</sup> Optical 96 Well Reaction Plate     | <i>Applied Biosystems, Darmstadt</i>    |
| Mikro Schraubröhren 1,5 ml                                | <i>Sarstedt AG &amp; Co., Nümbrecht</i> |
| Monovetten 9 ml (K-EDTA)                                  | <i>Sarstedt AG &amp; Co., Nümbrecht</i> |

|   |  |
|---|--|
| Objektträger mit Schliff                    | <i>Carl Roth GmbH, Karlsruhe</i>                 |
| Pasteurpipetten                             | <i>Carl Roth GmbH, Karlsruhe</i>                 |
| Petrischalen                                | <i>Sarstedt AG &amp; Co., Nümbrecht</i>          |
| Photopapier Type V UPP-110HG                | <i>Sony, Tokyo, Japan</i>                        |
| Plate Septa, 96 Well                        | <i>Applied Biosystems, Darmstadt</i>             |
| Rotilabo <sup>®</sup> Spitzenfilter steril  | <i>Carl Roth GmbH, Karlsruhe</i>                 |
| Reagiergefäße 1,5 ml, 2,0 ml (Cups)         | <i>Sarstedt AG &amp; Co., Nümbrecht</i>          |
| Reagiergefäße 0,2 ml SP0018                 | <i>Biostep GmbH, Jahnsberg</i>                   |
| Strips 0,2 ml 8er Kette mit 8er Deckelkette | <i>Thermo Scientific, Schwerte</i>               |
| Zellkulturflasche, 50 ml, steril            | <i>Greiner Bio One, Kremsmünster, Österreich</i> |
| <br>  |  |
| Zentrifugenröhrchen 100 ml                  | <i>Thermo Scientific, Schwerte</i>               |

### 3.1.5 Chemikalien

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

|   |   |
|---|---|
| Agarose Rotiphorese <sup>®</sup>  | <i>Carl Roth GmbH, Karlsruhe</i>              |
| Ammoniumchlorid (1 M)   | <i>Merck KG aA, Darmstadt</i>                 |
| Antibiotika, Antimykotika für Zellkulturen<br>(Penicillin, Streptomycin, Fungizone <sup>®</sup> ) | <i>Life Technologies GmbH,<br/>Darmstadt</i>  |
| Anti-Digoxigenin-Rhodamine  | <i>Roche Diagnostics GmbH,<br/>Mannheim</i>   |
| Ampicillin-Na-Salz  | <i>Sigma-Aldrich Chemie<br/>GmbH, München</i> |
| Agar Agar   | <i>Carl Roth GmbH, Karlsruhe</i>              |
| Agarose   | <i>Carl Roth GmbH, Karlsruhe</i>              |
| Biotin-16dUTP   | <i>Roche Diagnostics GmbH,<br/>Mannheim</i>   |

|  |   |
|--|---|
| Biotinylated Anti-Avidin D                               | <i>Vector Laboratories,</i><br>Peterborough, UK       |
| Bromdesoxyuridin (BrdU)                                  | <i>Life Technologies GmbH,</i><br>Darmstadt           |
| Bovines Serum Albumin                                    | <i>Sigma-Aldrich Chemie</i><br><i>GmbH, München</i>   |
| Concanavalin   | <i>MP Biomedicals, Illkirch</i><br>Cedex, France      |
| DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)                     | <i>Carl Roth GmbH, Karlsruhe</i>                      |
| Desoxyribonucleosidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) | <i>Peqlab Biotechnologie</i><br><i>GmbH, Erlangen</i> |
| Desoxyribonucleinsäure aus Kalb Thymus                   | <i>Sigma-Aldrich Chemie</i><br><i>GmbH, München</i>   |
| Desoxyribonucleinsäure aus Lachssperma                   | <i>Life Technologies GmbH,</i><br>Darmstadt           |
| Dextran Sulfat   | <i>Sigma-Aldrich Chemie</i><br><i>GmbH, München</i>   |
| Digoxigenin-11dUTP                                       | <i>Roche Diagnostics GmbH,</i><br>Mannheim            |
| Dimethylsulfoxid (DMSO)                                  | <i>Carl Roth GmbH, Karlsruhe</i>                      |
| Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat                       | <i>Merck KGaA, Darmstadt</i>                          |
| Dodecylsulfat-Na-Salz (SDS)                              | <i>Serva Feinbiochemica GmbH</i><br>& Co., Heidelberg |
| EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat                              | <i>AppliChem, Darmstadt</i>                           |
| Essigsäure   | <i>Carl Roth GmbH, Karlsruhe</i>                      |
| Ethanol  | <i>Carl Roth GmbH, Karlsruhe</i>                      |
| Ethidiumbromid   | <i>Sigma-Aldrich Chemie</i><br><i>GmbH, München</i>   |
| Fluorescein Avidin                                       | <i>Vector Laboratories,</i><br>Peterborough, UK       |
| Fötale Kälberserum                                       | <i>Life Technologies GmbH,</i><br>Darmstadt           |
| Formamid   | <i>AppliChem GmbH, Darmstadt</i>                      |
| Glucose  | <i>Carl Roth GmbH, Karlsruhe</i>                      |

## Material und Methoden

---

|   |   |
|---|---|
| Glycerol $\geq$ 98%                               | <i>Carl Roth GmbH, Karlsruhe</i>            |
| Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid (IPTG) | <i>Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg</i> |
| Hefeextrakt                                       | <i>AppliChem GmbH, Darmstadt</i>            |
| High-Dye-Formamid                                 | <i>Applied Biosystems, Darmstadt</i>        |
| Hoechst 33258                                     | <i>Life Technologies GmbH, Darmstadt</i>    |
| Kaliumchlorid                                     | <i>Merck KGaA, Darmstadt</i>                |
| Kaliumdihydrogenphosphat                          | <i>Merck KGaA, Darmstadt</i>                |
| Kolchizin   | <i>Life Technologies GmbH, Darmstadt</i>    |
| L-Glutamin  | <i>Life Technologies GmbH, Darmstadt</i>    |
| Magnesiumchlorid                                  | <i>Merck KGaA, Darmstadt</i>                |
| Magnesiumsulfat                                   | <i>Merck KGaA, Darmstadt</i>                |
| Methanol  | <i>Carl Roth GmbH, Karlsruhe</i>            |
| Natriumacetat                                     | <i>Merck KGaA, Darmstadt</i>                |
| Natriumchlorid                                    | <i>Carl Roth GmbH, Karlsruhe</i>            |
| Natriumcitrat                                     | <i>Carl Roth GmbH, Karlsruhe</i>            |
| Natrium-Heparin                                   | <i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München</i>   |
| Natriumhydroxid                                   | <i>Merck KGaA, Darmstadt</i>                |
| POP-7™ Polymer                                    | <i>Applied Biosystems, Darmstadt</i>        |
| RPMI-Medium                                       | <i>Life Technologies GmbH, Darmstadt</i>    |
| Salzsäure   | <i>Fisher Scientific, Schwerte</i>          |
| Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)             | <i>MP Biomedicals, LLC, Eschwege</i>        |
| Trypton, Pepton aus Casein                        | <i>Carl Roth GmbH, Karlsruhe</i>            |
| Tween 20  | <i>Carl Roth GmbH, Karlsruhe</i>            |

|  |   |
|--|---|
| TBE-Puffer (1 M TRIS-Borat, 20 mM EDTA, ddH <sub>2</sub> O, pH 8,3)                  | <i>Carl Roth GmbH, Karlsruhe</i>  |
| TAE-Puffer (0,4 M TRIS, 0,2 M Essigsäure und 10 mM EDTA, ddH <sub>2</sub> O; pH 8,3) | <i>Carl Roth GmbH, Karlsruhe</i>  |
| Wasser bidest  | aus Bidestanlage Bi-Dest<br>2302, <i>Gesellschaft für Labortechnik mbH</i> ,<br>Burgwedel |
| Wasser für die Molekularbiologie   | <i>Carl Roth GmbH, Karlsruhe</i>  |
| Wasser für HPLC Chromanorm   | <i>VWR International GmbH</i> ,<br>Darmstadt  |
| X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid)                              | <i>Biomol Feinchemikalien GmbH</i> , Hamburg  |

### 3.1.6 Reaktionskits

|   |  |
|---|--|
| ABsolute™ SYBR® Green qPCR-Mix                          | <i>Thermo Scientific, Schwerte</i>             |
| ABI PRISM® BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit | <i>Applied Biosystems, Darmstadt</i>           |
| Invisorb® Fragment CleanUp Kit                          | <i>Stratec Molecular GmbH, Berlin</i>          |
| MSB® Spin PCRapace                                      | <i>Stratec Molecular GmbH, Berlin</i>          |
| MSB® HTS PCRapace                                       | <i>Stratec Molecular GmbH, Berlin</i>          |
| LongAmp™ Taq PCR Kit                                    | <i>NEB GmbH, Frankfurt am Main</i>             |
| NucleoSpin® Blood Kit                                   | <i>Macherey-Nagel GmbH &amp; Co. KG, Düren</i> |
| NucleoSpin® Tissue Kit                                  | <i>Macherey-Nagel GmbH &amp; Co. KG, Düren</i> |

|                            |   |
|----------------------------|---|
| Nick Translation Kit       | <i>Roche Diagnostics GmbH,<br/>Mannheim</i> |
| Qiagen Multiplex PCR Kit   | <i>Qiagen, Hilden</i>                       |
| Quick Plasmid Miniprep Kit | <i>GE Healthcare, Solingen</i>              |

### 3.1.7 Größenstandards zur Agarose-Gelelektrophorese

|                                   |   |
|-----------------------------------|---|
| GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus  | <i>Fermentas, (Thermo Scientific),<br/>Schwerte</i> |
| O'Range Ruler™ 50bp DNA Ladder    | <i>Fermentas, (Thermo Scientific),<br/>Schwerte</i> |
| Fast Ruler DNA Ladder, Low Range  | <i>Fermentas, (Thermo Scientific),<br/>Schwerte</i> |
| Fast Ruler DNA Ladder, High Range | <i>Fermentas, (Thermo Scientific),<br/>Schwerte</i> |
| GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder        | <i>Fermentas, (Thermo Scientific),<br/>Schwerte</i> |

### 3.1.8 Enzyme

|                                |   |
|--------------------------------|---|
| DNA Polymerase GoTaq® Flexi    | <i>Promega GmbH, Mannheim</i>                 |
| DNA Polymerase                 | <i>5-Prime GmbH, Hamburg</i>                  |
| Pepsin                         | <i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH,<br/>München</i> |
| Proteinase K                   | <i>Invitek, Berlin</i>                        |
| Taq DNA-Polymerase             | <i>5-Prime GmbH, Hamburg</i>                  |
| QIAGEN Multiplex PCR Mastermix | <i>Qiagen GmbH, Hilden</i>                    |
| T4 Ligase                      | <i>Promega GmbH, Mannheim</i>                 |

### 3.1.9 Oligonukleotide

|  |  |
|--|--|
| Oligonukleotide, NED-markiert<br>für Mikrosatellitenanalysen             | <i>Applied Biosystems, Darmstadt</i>       |
| Oligonukleotide, 6FAM, Hex, Atto-markiert<br>für Mikrosatellitenanalysen | <i>biomers.net GmbH, Ulm</i>               |
| Oligonukleotide, unmarkiert<br>für PCR, qPCR und Sequenzierung           | <i>biomers.net GmbH, Ulm</i>               |
| Oligonukleotide, unmarkiert<br>für PCR, qPCR und Sequenzierung           | <i>Microsynth AG, Balgach,<br/>Schweiz</i> |

### 3.1.10 Bakterien und Vektoren

|                                 |                               |
|---------------------------------|-------------------------------|
| E-coli DH 10 B                  | <i>Chori, Oakland, USA</i>    |
| E-coli kompetente Zellen JM 109 | <i>Promega GmbH, Mannheim</i> |
| BAC-Vektor                      | <i>Chori, Oakland, USA</i>    |
| pGem-T-easy Vektor              | <i>Promega GmbH, Mannheim</i> |

### 3.1.11 Lösungen

|              |   |
|--------------|---|
| LB-Medium    | 10 g Bacto <sup>®</sup> -tryptone + 5 g Bacto <sup>®</sup> -yeast extract + 5 g NaCl ad 1000 ml, pH 7,5   |
| 10x PBS      | 80 g NaCl + 2 g KCl + 14,2 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> + 2,5 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ad 1 L H <sub>2</sub> O, pH 7,4   |
| PBS-T-Lösung | PBS + 0,1% Tween 20   |
| PBT-Lösung   | PBS-T + 0,1% BSA  |
| SOC-Medium   | 2,0 g Bacto <sup>®</sup> -tryptone + 0,5 g Bacto <sup>®</sup> -yeast extract + 1 ml 1 M NaCl + 0,25 ml 1 M KCl + 1 ml Mg <sup>2+</sup> stock (1 M MgCl <sub>2</sub> • 6H <sub>2</sub> O, 1 M MgSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O), sterilfiltriert + 1 ml 2 M Glucose, sterilfiltriert, ad 100 ml Bideist, pH 7,0 |
| 20x SSC      | 175,3290 g NaCl + 88,230 g NaCitrat ad 1 L H <sub>2</sub> O, pH 7,0   |

|                             |   |
|-----------------------------|---|
| FISH-Hybridisierungslösung: | 5 ml Formamid + 1 ml 20x SSC + 1 g Dextran Sulfat, ad 7 ml ddH <sub>2</sub> O, pH 7,0 |
| FISH-Denaturierungslösung   | 70% Formamid + 30% 2x SSC   |
| FISH-Vorbereitungslösung    | 100 ml ddH <sub>2</sub> O + 10 mg Pepsin + 400 µl HCl 1N                              |
| FISH-Waschlösung            | 50% Formamid und 50% 2x SSC   |

### 3.1.12 Computerprogramme

#### BLAST

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

*National Center for  
Biotechnology Information,  
Bethesda, MD, USA*

ChromasPro Version 1.3 beta 1

*Technelysium Pty Ltd, Tewantin,  
Australia*

Genetic Analyzer Data Collection  
Software 3.0

*Applied Biosystems, Darmstadt*

Genetic Analyzer Gene Mapper<sup>®</sup>  
Software V4.0

*Applied Biosystems, Darmstadt*

MetaMorph Software

*Molecular Devices GmbH,  
Ismaning*

PASW Statistics 18

*IBM, New York, USA*

Primer3 (<http://primer3.sourceforge.net/>)

*Whitehead Institute for  
Biomedical Research,  
Cambridge, GB*

### 3.1.13 Referenzsequenzen

Zur Auswahl von Oligonukleotiden als PCR-Primer wurden öffentlich zugängliche genomische und codierende Sequenzen aus der Datenbank des

National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine verwendet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) (Tabelle 3).

Tabelle 3: Referenzsequenzen zur Analyse des ovinen *EDNRB*.

| <b>Gen</b>    | <b>Referenzsequenz</b>   | <b>Gen-Bank-Eintrag</b> |
|---------------|--|-------------------------|
| <i>EDNRB</i>  | Bos taurus breed Hereford chromosome 12, Btau_4.2, whole genome shotgun sequence   | NC_007310.4             |
| <i>EDNRB</i>  | Bos taurus breed Hereford chromosome 12, Btau_UMD_3.1 whole genome shotgun sequence  | AC_000169.1             |
| <i>EDNRB</i>  | Bos taurus endothelin receptor type B (EDNRB), mRNA  | NM_174309.2             |
| <i>EDNRB</i>  | Capra hircus endothelin receptor type B (EDNRB) gene, exons 2, 6, 7 and partial cds  | EU644500.1              |
| <i>EDNRB</i>  | Ovis aries endothelin B receptor (ETBR) mRNA, partial cds  | AF349439.1              |
| <i>EDNRB</i>  | OAR True Sheep Chromosomes ver.1.0 ( <a href="https://isgldata.agresearch.co.nz/">https://isgldata.agresearch.co.nz/</a> ) |                         |
| <i>SLAIN1</i> | Bos taurus UMD primary assembly 3.1  | AC_000169.1             |

### 3.1.14 Datenbanken für die Mikrosatellitenanalysen

- <http://www.marc.usda.gov/genome/genome.html>
- <http://rubens.its.unimelb.edu.au/~jillm/jill.htm>
- <http://www.thearkdb.org/arkdb/>

### **3.1.15 Laboratorien**

Die gentechnischen Arbeiten wurden unter Beachtung des § 7 des Gentechnikgesetzes vom 16.12.1993 in den gentechnischen Labors der Sicherheitsstufe 1 (S1) des Instituts für Tierzucht und Haustiergenetik der Justus-Liebig-Universität Gießen, Ludwigstr. 21B, durchgeführt (Reg. Bescheide Nr. A13/19/1/1374/90 sowie A13-25/1/1492/90).

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Histologisch-pathologische Untersuchung**

Die beiden weißgeborenen Lämmer (Lab. Nr. 2014-2008 und 3077-2008) wurden am 3. bzw. 1. Tag *p.m.* im Institut für Veterinär-Pathologie der JLU Gießen obduziert. Dabei wurden durch das Institut für Veterinär-Pathologie Proben aus Dünn- und Dickdarm der Tiere (d.h. Duodenum, Jejunum, Ileum, Cecum, Colon, Rectum) entnommen, in 10%iger Formalin-Lösung fixiert und in Paraffin eingebettet. Hiervon wurden analog Huisinga *et al.* (2008) und Hilbe *et al.* (2005) 4 µm-Schnitte angefertigt, die mit Haematoxylin und Eosin angefärbt wurden. Weitere Schnitte wurden für die immunohistochemische Anfärbung mit Synaptophysin verwendet (Klon SY38, *DakoCytomation*, Hamburg). Zudem wurde eine routinemäßige bakteriologische und virologische Untersuchung mit Proben von Leber, Milz, Niere, Lunge, Darm und intestinalen Lymphknoten durchgeführt.

### **3.2.2 Gewinnung von Vollblut und peripheren Leukozyten (Buffy coat) aus Vollblut**

Die Blutproben wurden aus der *Vena jugularis* in 9 ml EDTA-Monovetten entnommen. Davon wurden etwa 2 ml Vollblut in 2 ml Reagiergefäße abgefüllt und bei -20°C eingefroren. Anschließend wurde die verbliebene Menge Vollblut in den Monovetten zur Trennung der Erythrozyten von den Leukozyten bei 4°C und 3000 rpm 15 min zentrifugiert. Die Leukozytenschicht wurde abgenommen, in 2 ml Reagiergefäße abgefüllt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Für die zytogenetischen Analysen wurden von einer Halbschwester (Lab. Nr. 2491-2010) der Merkmalsträger sowie von deren Tochter (Lab. Nr. 2494-2010), Blutproben aus der *Vena jugularis* in 6 ml Na-Heparin-Vakutainer entnommen. Zudem wurden von einem zufällig ausgewählten Merinolandschafbock und einem Bullen der Rasse Deutsch-Holstein Blutproben in Na-Heparin-Vakutainern entnommen, die im Verlauf der weiteren zytogenetischen Untersuchungen als Kontrollproben dienten.

### **3.2.3 Molekulargenetische Methoden**

#### **3.2.3.1 Isolierung von DNA aus Blut**

##### **3.2.3.1.1 Isolierung von DNA aus peripheren Leukozyten (Buffy coat)**

Die eingefrorenen Proben peripherer Blutleukozyten aus 3.2.2 wurden bei Raumtemperatur aufgetaut. Die Isolierung genomischer DNA aus diesem

Material erfolgte mittels der modifizierten Hochsalzmethode (Montgomery und Sise 1990).

Nach dem Aussalzen mit gesättigter NaCl-Lösung wurde der Ansatz in einen Erlenmeyerkolben mit absolutem, filtriertem Ethanol (30 ml) dekantiert und die präzipitierte DNA, nach kurzem Schwenken des Kolbens, mittels einer Pipette in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Darin wurde die DNA anschließend zweimal in 70% Ethanol gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet und danach, abhängig von der visuell abgeschätzten Menge, in 100-1000 µl Tris-EDTA-Puffer für mindestens 24 h bei 4°C gelöst. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte die Lagerung der DNA bei -20°C.

### **3.2.3.1.2    *Isolierung von DNA aus Vollblut***

In Fällen, in denen keine DNA aus peripheren Blutleukozyten gewonnen werden konnte, wurde DNA aus dem eingefrorenen Vollblut (siehe 3.2.2.) isoliert. Dies erfolgte mittels eines kommerziellen Kits (NucleoSpin<sup>®</sup>Bood Kit, *Macherey Nagel*).

Zur DNA-Extraktion wurden 200 µl getautes Vollblut eingesetzt und nach Herstellerprotokoll verfahren, wobei jedoch die angegebene Inkubation der Probe von 15 min mit Proteinase K bei 70°C im Wasserbad auf 1 h verlängert wurde. Die Elution der DNA erfolgte im letzten Schritt mit 50 µl Elutionspuffer.

### **3.2.3.2 Isolierung von DNA aus Zungengewebe**

Die Isolierung von DNA aus Zungengewebe erfolgte mittels eines kommerziellen Kits (NucleoSpin<sup>®</sup>Tissue Kit, *Macherey Nagel*).

Hierzu wurde ein etwa 25 mg schweres Stück Zungengewebe an der Zungenspitze mittels Skalpell abgeschnitten und anschließend nach dem Standard-Herstellerprotokoll für Gewebeproben weiterverfahren, wobei die Inkubation mit Proteinase K über einen Zeitraum von 16 h vorgenommen wurde. Die abschließende Elution der DNA erfolgte in 100 µl Elutionspuffer.

### **3.2.3.3 Bestimmung der DNA-Qualität und -Quantität**

Die Konzentration und die Reinheit der extrahierten DNA wurden mit dem Nanodrop-Spektrophotometer der Firma Thermo Scientific überprüft. Hierzu wurde 1 µl DNA auf den Probenarm pipettiert. Zur Berechnung der DNA-Konzentration, wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Aus diesem Wert ermittelt die dazugehörige Software, auf Basis des Lambert-Beerschen-Gesetzes, die Konzentration der Probe in ng/µl.

Zur Ermittlung der Reinheit der DNA wurde das Verhältnis der Absorption bei 260/280 nm bzw. 260/230 nm gemessen.

### **3.2.3.4 Amplifizierung von DNA-Abschnitten mittels PCR**

#### **3.2.3.4.1 Amplifizierung codierender Bereiche des Kandidatengens *EDNRB***

Die Vervielfältigung der zu analysierenden Genbereiche erfolgte mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) (Saiki *et al.* 1985). Da in der Genbank für das Kandidatengen *EDNRB* noch keine vollständige ovine Sequenz veröffentlicht war, wurde die bovine Sequenz (Genbank NC\_007310.4) als Vorlage zur Auswahl der Primer herangezogen. Zunächst wurde für alle Fragmente ein Standard-PCR-Protokoll (Tabelle 4) mit *Promega GoTaq<sup>®</sup> Flexi* DNA-Polymerase (*Promega GmbH*, Mannheim) analog den Herstellerempfehlungen durchgeführt und anschließend optimale PCR-Bedingungen empirisch, mittels  $MgCl_2$  und Temperaturgradienten, ermittelt (Tabelle 5). Zur Kontrolle der Identität der Fragmente wurde zunächst eine elektrophoretische Auftrennung der Fragmente in einem 1,5% Agarosegel mit anschließender Ethidiumbromidfärbung vorgenommen (Sambrook *et al.* 1989). Bei anzunehmender spezifischer Amplifikation, d.h. bei Vorliegen einer einzelnen DNA-Bande in erwarteter Fragmentlänge, wurden entstandene PCR-Produkte aufgereinigt und in beiden Richtungen mit den zuvor verwendeten PCR-Primern sequenziert.

Tabelle 4: Reaktionsansatz und Standard-Testprotokoll für die Amplifikation oviner *EDNRB*-Fragmente.

| Reaktionsansatz Standard PCR            |                 | Thermocyclerprogramm     |        |
|---|-----------------|--------------------------|--------|
| Template DNA                            | 50-200 ng       | Initiale Denaturierung   | 90 sek |
| Reaktionspuffer                         | 1x konzentriert | 35 Zyklen:               |        |
| dNTPs (je Base)                         | 0,2 mM          | Denaturierung (95°C)     | 15 sek |
| MgCl <sub>2</sub>                       | 2 mM            | Annealing (siehe Tab. 5) | 30 sek |
| Je Primer                               | 0,67 µM         | Elongation (72°C)        | 60 sek |
| Polymerase<br>(Go Taq, <i>Promega</i> ) | 0,5 U           | Finale Elongation (72°C) | 5 min  |

Tabelle 5: Amplifikation codierender Bereiche sowie flankierender Intronbereiche des ovinen *EDNRB*.

| <i>EDNRB</i><br>Region* | Fragment<br>Länge | Annealing<br>Temp.(°C) | MgCl <sub>2</sub> | Primersequenz (f/r) 5'-3'                               |
|-------------------------|-------------------|------------------------|-------------------|---|
| I*-1                    | 694 bp            | 60,0                   | 1 mM              | ctgctgCGcttcaggatag<br>cctgcaaagactttcccatc             |
| 1-II-2-III-3            | 825 bp            | 56,0                   | 3 mM              | tgcagatgatttcagaggag<br>tgagaatcaggggaattcttg           |
| 3-IV-4                  | 366 bp            | 52,0                   | 2 mM              | gaagattattccttgatgagcatt<br>cagactaagaaaaaggaattatgctct |
| 4-V-5<br>VI-6           | – 1036 bp         | 52,0                   | 1 mM              | caaatgccactgacttttgt<br>caagggaaaattataaaacagttga       |
| 6-VII*                  | 784 bp            | 52,9                   | 2 mM              | tgagcaaggagggttgat<br>ctgtctgattctccctctga              |

Römische Zahlen = Exons, Arabische Zahlen = Introns; \* Teilweise amplifiziertes Exon

#### **3.2.3.4.2 Amplifizierung *EDNRB*-flankierender Bereiche auf OAR10**

Das Vorhandensein flankierender Sequenzen des *EDNRB* wurde bei den Merkmalsträgern und bei den phänotypisch normalen Kontrolltieren zunächst anhand 5 verschiedener Mikrosatelliten-Marker getestet, die proximal (VH58), distal (TGLA441) und medial (BMS 975, CSRD87 und MCM469A) verteilt auf dem ovinen Chromosom 10 kartiert sind (*Ovine Texel version 2.0 Genome Assembly*). Die entsprechenden Primersequenzen und PCR-Bedingungen sind im Anhang in Tabelle 1A dargestellt. Das *EDNRB*-Gen befindet sich im medialen Bereich des Chromosoms und ist im Bereich 51,69-51,73 Mb kartiert (*Ovine Texel version 2.0 Genome Assembly*). Die betreffenden DNA-Abschnitte in 3`- und 5`-Richtung des *EDNRB* wurden mittels PCR amplifiziert.

Die Untersuchung weiterer, dichter am *EDNRB* kartierter Bereiche erfolgte in 3`-Richtung ausgehend vom Gen *SLAIN1* (51,50-51,56 MB) und in 5`-Richtung ausgehend von einem nicht codierenden Bereich, der 85 kb von *EDNRB* entfernt kartiert ist (*Ovine Texel version 2.0 Genome Assembly*). Innerhalb dieser Regionen wurden kleinere Fragmente von 125-501 bp ausgewählt, die einerseits mit der DNA der phänotypisch gesunden Tiere und andererseits mit DNA der Merkmalsträger mittels PCR auf eine erfolgreiche Amplifikation hin getestet wurden. Die Primer wurden anhand der vorhandenen Schafssequenz OAR True Sheep Genome ver. 1.0 (<https://isgldata.agresearch.co.nz/>) ausgewählt. Für Stellen, an denen diese Sequenz Lücken aufwies, wurden passende Primer für aufeinanderfolgende Fragmente anhand der vorangegangenen Sequenz ausgewählt. Alle verwendeten Primersequenzen für DNA-Fragmente und Mikrosatelliten in 3`- und 5`-Richtung des *EDNRB* sind in

den Tabellen 6a und 6b aufgelistet. Zudem wird die Lokalisation der untersuchten Fragmente in Abbildung 11 dargestellt.

Um zu kontrollieren, ob das amplifizierte Fragment tatsächlich aus dem fraglichen Bereich stammte, wurde zur Identitätskontrolle für alle neu amplifizierten Fragmente eine Sequenzierung mit einem der beiden PCR-Primer, analog der unter 3.2.3.11 beschriebenen Vorgehensweise, durchgeführt.

Tabelle 6a: Verwendete Primersequenzen zur Amplifikation flankierender Bereiche in 5´-Richtung des *EDNRB*.

| Fragmente in 5´-Richtung des <i>EDNRB</i> |  |                    |         |  |
|---|--|--------------------|---------|--|
| Fragment Nr.                              | Primersequenz (f/r) 5´-3´                            | Fragmentgröße (bp) | AT (°C) | Distanz zwischen Fragment und <i>EDNRB</i> bei <i>Bos taurus</i> |
| 1   | gcgaagtctctcccttcaa<br>ttttaaagcacatttgaaataca       | 409                | 59      | 150 kb upstream ( <i>SLAIN1</i> )                                |
| 2   | tggccttagggtaagaatg<br>cagaactcatctggggagga          | 338                | 58      | 42.742-43.080 bp upstream  |
| 3   | tcaaacaggctttcctggt<br>ttcagcaaacagcaatactcc         | 402                | 60      | 28.655-29.057 bp upstream  |
| 4   | actgcaaagaatgagaaagca<br>ttggtctctatgaatccaataggt    | 495                | 55      | 20.104-20.599 bp upstream  |
| 5   | gatgactgaataaagcagcccta<br>cacacagagaatcagaaacagagaa | 501                | 55      | 18.925-19.426 bp upstream  |
| 6   | cctgaaatcaggggtcatgt<br>cgcaaagggtcagacacaac         | 410                | 58      | 18.322-18.732 bp upstream  |
| 7   | gattggtgggagaggtgcta<br>tggatgcactgaggcagata         | 426                | 60      | 17.220-17.646 bp upstream  |
| 8   | ggccatcttggtgacagttt<br>tgtggtgccacgttacagat         | 457                | 60      | 16.350-16.807 bp upstream  |
| 9   | tttgggtgctctttcacc<br>aaggatcacattgtccctga           | 404                | 60      | 13.129-13.533 bp upstream  |
| 10  | aaagctttgagctcctggtg<br>tatcctggggcttcagtttg         | 394                | 62      | 213-607 bp upstream  |

Tabelle 6b: Verwendete Primersequenzen zur Amplifikation flankierender Bereiche in 3`-Richtung des *EDNRB*.

| Fragmente in 3`-Richtung des <i>EDNRB</i> |  |                           |            |   |
|---|--|---------------------------|------------|---|
| Frag-<br>ment-Nr.                         | Primersequenz (f/r) 5'-3'                          | Fragment<br>Größe<br>(bp) | AT<br>(°C) | Distanz zwischen Fragment<br>und <i>EDNRB</i> bei <i>Bos taurus</i> |
| 11  | ggctggtgagccttacattc<br>tgaattcaggagctatgtgagaa    | 403                       | 61         | 3095-3498 bp downstream   |
| 12  | tgccctgatgtcctgtgtaa<br>tgcaaagagcaaacaatgc        | 465                       | 60         | 58512-58.977 bp downstream  |
| 13  | attgctagcttaattccttctttg<br>aaaaggcataatggagacaaga | 125                       | 60         | 59.862-59.987 bp downstream   |
| 13  | tccctccctcattgaactg<br>ttcagagaaacctggtgtgc        | 246                       | 60         | 61.505-61.997 bp downstream   |
| 15  | atagtgggggcaatggattt<br>tcaaagtcccatttctagaacattac | 408                       | 55         | 64.278-64.686 bp downstream   |
| 16  | tttctggtgcctcagtcaag<br>ctaccactcctaccaccca        | 407                       | 55         | 69.504-69.911 bp downstream   |
| 17  | cacaggcctgggtatcattc<br>taggtccctgagatggatcg       | 426                       | 57         | 83.908-84.334 bp downstream   |

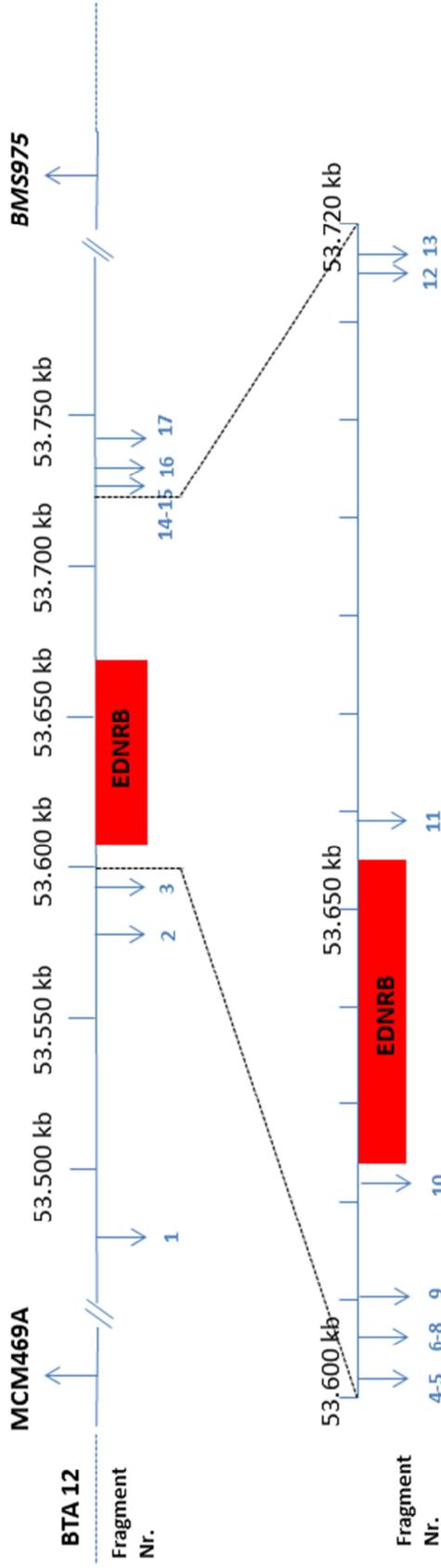


Abbildung 11: Lokalisation der amplifizierten Fragmente zur Untersuchung flankierender Bereiche des ovinen *EDNRB*. Die Primersequenzen der dargestellten Fragmentnummern sind den Tabellen 6a und 6b zu entnehmen. Die Positionangaben in der Abbildung beziehen sich auf die bovine Sequenz NC\_007310.4.

### **3.2.3.4.3 Mikrosatellitenanalyse zur Abstammungskontrolle**

Neun Mikrosatellitenmarker wurden zur Abstammungskontrolle innerhalb der Herde herangezogen, wobei 22 Tiere in die Untersuchung einbezogen wurden. Die chromosomale Lokalisation und die Allel-Größen dieser Marker sind Tabelle 7 zu entnehmen. Die Primersequenzen und die etablierten PCR-Bedingungen für die einzelnen Mikrosatellitenmarker sind in der Tabelle 2A im Anhang dargestellt. Teilweise konnten die PCR-Amplifikationen in Multiplex-Ansätzen durchgeführt werden (Anhangstabelle 2A). Die Durchführung der Fragmentlängenanalysen erfolgte mit einem automatischen Kapillarsequenzierer (Genetic Analyzer 3130, *Applied Biosystems*) nach Herstellervorgaben. Hierzu wurde jeweils der Rückwärtsprimer eines jeden Primerpaars mit einem der Fluoreszenzfarbstoffe VIC<sup>®</sup>, NED<sup>®</sup> oder 6-FAM markiert.

Bei dem Marker MAF 70 traten Stotterbanden auf. Daher wurde an das 5`Ende des Vorwärtsprimers ein „Pig-Tail“, bestehend aus den 7 Basen „GTTTCTT“, angehängt (Brownstein *et al.* 1996). Die anschließende Auswertung der Fragmentlängen wurde mit dem Programm Genetic Analyzer Gene Mapper<sup>®</sup> V4.0 (*Applied Biosystems*, Darmstadt) durchgeführt.

Tabelle 7: Mikrosatellitenmarker zur Abstammungskontrolle (Sheep Best Positions Linkage Map Vs. 5 (<http://rubens.its.unimelb.edu.au/~jillm/jill.htm>).

| Mikrosatellit    | Chr.  | Lokalisation<br>(Mb) | Allelzahl | Allelgrößen<br>(bp) | Markierung |
|------------------|-------|----------------------|-----------|---------------------|------------|
| <b>BM8125</b>    | OAR17 | 88,2                 | 12        | 110-130             | NED        |
| <b>OARFCB128</b> | OAR2  | 101,6                | 14        | 96-130              | 6-Fam      |
| <b>OARVH72</b>   | OAR28 | 50,2                 | 10        | 121-145             | 6-Fam      |
| <b>ILSTS11</b>   | OAR9  | 40,8                 | 24        | 256-294             | 6-Fam      |
| <b>ILSTS28</b>   | OAR3  | 28,4                 | 17        | 105-177             | VIC        |
| <b>INRA063</b>   | OAR14 | 68,3                 | 27        | 163-199             | 6-Fam      |
| <b>MAF33</b>     | OAR9  | 60,7                 | 15        | 121-141             | VIC        |
| <b>MAF 70</b>    | OAR4  | 66,9                 | 26        | 124-166             | 6 FAM      |
| <b>OARJMP58</b>  | OAR26 | 60,1                 | 9         | 133-159             | NED        |

### 3.2.3.5 Aufreinigung und Konzentrierung von PCR-Fragmenten

Die für die Sequenzierung vorgesehenen PCR-Produkte wurden nach der PCR-Reaktion je nach Anzahl der Proben entweder über Einzelsäulen (MSB<sup>®</sup> Spin PCR-Rapace, *Stratec Molecular GmbH*, Berlin) oder über ein 96er Plattenaufreinigungssystem (MSB<sup>®</sup> HTS PCRapace, *Stratec Molecular GmbH*, Berlin) nach Herstellerprotokoll aufgereinigt. Die DNA-Fragmente wurden mit 20 µl Elutionspuffer eluiert.

### **3.2.3.6 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegel**

Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegel (Vogelstein und Gillespie, 1979) wurde verwendet, wenn in einer PCR andere, unspezifische Nebenprodukte entstanden, die die Sequenzierung des Zielfragments stören konnten. Dabei wurde die gesamte Menge an vorhandenem PCR-Produkt (15-25 µl) auf einem 1,5% TAE-Agarose-Gel in TAE-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt (6 V/cm, 90 min). Das Gel wurde anschließend in Ethidiumbromid gefärbt und die gewünschte Bande mit Hilfe eines Skalpells aus dem Gel unter UV-Licht-Kontrolle ausgeschnitten. Die weitere Verarbeitung der Gelblöcke erfolgte mit dem Invisorb® Fragment CleanUp-Kit (*Strattec Molecular GmbH, Berlin*) nach Herstelleranleitung. Zur DNA-Elution wurden 20 µl Elutionspuffer eingesetzt.

### **3.2.3.7 Klonierung von PCR-Produkten**

Die Klonierung von PCR-Produkten wurde verwendet, wenn nach der elektrophoretischen Auftrennung der DNA-Fragmente störende Nebenprodukte oder eine nicht ausreichende Amplifikatmenge bzw. -konzentration festgestellt wurden. Die Schätzung der vorliegenden Konzentration erfolgte nach der elektrophoretischen Auftrennung anhand des Vergleichs mit dem Marker Fast Ruler Low Range oder Fast Ruler High Range (*Fermentas, Schwerte*).

Zur Klonierung wurde das pGEM®-T-Easy-Vektor-Kit (*Promega, Mannheim*) verwendet.

### *Ligation*

Das zur Klonierung vorgesehene PCR-Produkt wurde zunächst analog Punkt 3.2.3.5 einer Säulenaufreinigung unterzogen und anschließend mit dem pGEM<sup>®</sup>-T-Easy-Vektor (*Promega*, Mannheim) ligiert. Die erforderliche Menge an PCR-Produkt wurde nach Herstellerangaben anhand folgender Formel ermittelt:

$$\frac{ng \text{ des Vektor} \times kb \text{ des Inserts}}{kb \text{ des Vektors}} \times 3 = ng \text{ PCR – Produkt}$$

Hierbei beträgt das molare Verhältnis zwischen Vektor und Insert 1:3. Allerdings wurden maximal 3 µl des PCR-Produkts eingesetzt. Zur Erzeugung eines rekombinanten Vektorplasmids wurde das PCR-Produkt mit 5 µl des im Reaktionskit enthaltenen Rapid-Ligation-Buffer, mit 1 µl der T-Ligase und 1 µl des Vektors durchmischt, mit *Aqua bidest* auf 10 µl aufgefüllt und bei 4°C über Nacht inkubiert.

### *Transformation*

Zur Durchführung der Transformation wurden chemisch kompetente E-coli-Zellen vom Stamm JM109 (*Promega*, Mannheim) verwendet.

100 µl der Zellsuspension mit einer Konzentration von 7-10 KBE/µg wurden auf Eis aufgetaut und mit 4 µl des Ligationsprodukts vermischt. Die Zellen wurden für 20 min auf Eis inkubiert, anschließend im Wasserbad bei 42°C für 50 sek einem Hitzeschock ausgesetzt und danach 2 min auf Eis abgekühlt. Nach der Zugabe von 900 µl SOC-Medium wurde der Ansatz für 1,5 h im Schüttelinkubator bei 37°C inkubiert.

### *Kultivierung*

Zur Kultivierung des Transformationsansatzes wurden zunächst Agarplatten mit einem LB-Medium hergestellt. Hierzu wurde LB-Medium mit 11 g/L Agar-Agar versetzt und autoklaviert (124°C, 1,2 bar, 30 min). Die Lösung wurde auf 50°C abgekühlt und zur Herstellung eines Selektivmediums im Verhältnis 1:1000 mit Ampicillin (0,1%; 100mg Ampicillin-Natriumsalz, gelöst in 1 ml autoklaviertem Wasser für die Molekularbiologie) versetzt. Des Weiteren wurden je 100 ml LB-Medium 100 µl Isopropyl-Thio-β-Galactopyranosid (IPTG 0,5%; 23,8 mg IPTG, gelöst in 1 ml autoklaviertem Wasser für die Molekularbiologie) und 100 µl 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid (X-Gal 0,2%; 40 mg X-Gal, gelöst in 1 ml Dimethylformamid) zugegeben und je 25 ml unter sterilen Bedingungen in Petrischalen gegossen. Die Platten wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Von insgesamt 1 ml Reaktionsansatz wurden 100 µl abgenommen und auf die 1. Platte ausplattiert. Um die Konzentration des restlichen Ansatzes zu erhöhen, wurden die verbleibenden 900 µl aus dem Ansatz in 2 1,5 ml Reaktionsgefäße zu je 450 µl aufgeteilt und für 5 min bei 4200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 200 µl SOC Medium resuspendiert. Aus den beiden Ansätzen wurden je 100 µl auf eine weitere Platte aufgetragen. Die Platten wurden für 18 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

### *Auswahl und Identifizierung rekombinanter Klone*

Die Auswahl rekombinanter Kolonien wurde mit Hilfe der Blau-Weiß-Selektion durchgeführt (Ullmann *et al.* 1967). Zur Auswahl geeigneter Klone wurden die Agarplatten nach der Inkubation im Brutschrank zunächst noch etwa 1 h im

Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt, da dadurch erfahrungsgemäß eine Verstärkung der Blaufärbung nicht rekombinanter Klone erzielt wird.

Zur weiteren Charakterisierung wurden von den Platten 5 weiße Kolonien ausgewählt und mit einer 200 µl Pipettenspitze gepickt. Zur Gewinnung von Template-DNA für die Kolonie-PCR wurde diese Pipettenspitze zunächst kurz in ein 200 µl Reaktionsgefäß mit 30 µl bidestilliertem Wasser getaucht. Um Material für die Plasmidpräparation zu gewinnen, wurde die Pipettenspitze anschließend in ein Zentrifugenröhrchen mit 3 ml LB-Medium mit Ampicillin (3 µl Ampicillin 0,1%, ad 3 ml) überführt. Dieser Ansatz wurde über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator (200 U/min) inkubiert und am folgenden Tag zur Plasmidpräparation weiterverwendet.

### **3.2.3.8 Kolonie-PCR**

Anhand der Kolonie-PCR wurde die erfolgreiche Transformation des Inserts überprüft. Der für die Kolonie-PCR vorgesehene Ansatz aus 3.2.3.7 wurde zunächst für 10 min bei 95°C im Wasserbad lysiert und dann auf Eis abgekühlt. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 3000 rpm wurden aus jedem Reaktionsgefäß 10 µl Überstand für die Kolonie-PCR abgenommen. Der hierzu verwendete Reaktionsansatz sowie die PCR-Bedingungen sind Tabelle 8 zu entnehmen. Es wurden dabei die Primer und die Annealing-Temperatur verwendet, die auch zur Amplifikation des betreffenden klonierten PCR-Produkts benutzt wurden.

Tabelle 8: Reaktionsansatz und PCR-Bedingungen zur Durchführung der Kolonie-PCR.

| Reaktionsansatz                    |          | Thermocyclerprogramm     |        |
|------------------------------------|----------|--------------------------|--------|
| Template DNA                       | 10 µl    | Initiale Denaturierung   | 30 sek |
| NEB 5x LongAmp® Buffer             | 5 µl     | 30 Zyklen:               |        |
| dNTPs (je Base)                    | 0,2 mM   | Denaturierung (92°C)     | 20 sek |
| Je Primer                          | 0,4 mM   | Annealing                | 30 sek |
| NEB LongAmp® Taq<br>DNA Polymerase | 2,5 U    | Elongation (65°C)        | 3 min  |
| H <sub>2</sub> O                   | ad 25 µl | Finale Elongation (65°C) | 10 min |

### 3.2.3.9 Herstellung von Glycerolstocks

Die Lagerung rekombinanter Bakterienklone erfolgte als Glycerolstock. Hierzu wurden Flüssigkulturen über Nacht in LB-Medium unter Zusatz von Ampicillin (0,1%; 100 mg Ampicillin-Natriumsalz, gelöst in 1 ml autoklaviertem Wasser für die Molekularbiologie) im Verhältnis 1:1000 bei 37°C auf dem Schüttelinkubator kultiviert. Die Kultur wurde anschließend im Verhältnis 1:3 mit Glycerol (≥ 98%) durchmischt, in 1,5 ml Mikro-Schraubröhren (*Sarstedt AG & Co.*, Nümbrecht) abgefüllt und bei -70°C gelagert.

### 3.2.3.10 Präparation von Plasmid-DNA

Rekombinante Bakterienklone wurden über Nacht in LB-Medium unter Zusatz von Ampicillin (0,1%; 100 mg Ampicillin-Natriumsalz, gelöst in 1 ml

autoklaviertem Wasser für die Molekularbiologie) im Verhältnis 1:1000 bei 37°C auf dem Schüttelinkubator kultiviert. Die Kulturen wurden anschließend zur Gewinnung und Aufreinigung rekombinanter Plasmid-DNA einer Säulenpräparation mit einem kommerziellen Kit (Quick Plasmid Miniprep Kit, *GE Healthcare*) unterzogen, wobei nach Herstellerangaben verfahren wurde. Die auf diese Weise gewonnene Plasmid-DNA wurde zur Sequenzierung des Inserts verwendet.

### **3.2.3.11 Sequenzierung von DNA-Fragmenten**

PCR-Produkte wurden vor der Sequenzierung mittels der unter 3.2.3.5 beschriebenen Vorgehensweise aufgereinigt. DNA aus Plasmidpräparationen konnte dagegen direkt zur Sequenzierung verwendet werden.

Die DNA-Konzentration im PCR-Produkt wurde mit Hilfe des Markers Fast Ruler (*Fermentas*, Schwerte) nach elektrophoretischer Auftrennung des PCR-Produkts bestimmt. Alternativ erfolgte die Quantifizierung mit Hilfe des Nanodrop Spektralphotometers (*Thermo Scientific*, Schwerte). Die einzusetzende Menge an PCR-Produkt in der Sequenzierreaktion berechnet sich nach Vorgaben des Herstellers des Sequenzierkits *Applied Biosystems* (BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit Protocol, 2002) durch Division der Länge des zu sequenzierenden PCR-Produkts (in bp) mit dem Faktor 20.

Zur Direktsequenzierung von PCR-Produkten wurde einer der in der PCR-Reaktion verwendeten Primer eingesetzt, zur Sequenzierung rekombinanter Plasmide die Vektorprimer M13f (5'-GTTTTCCAGTCACGAC-3') und M13r

(5´-CAGGAAACAGCTATGAC-3´) von *Promega* (Mannheim). Mit jedem Primer konnte ein Bereich von etwa 500-800 bp sequenziert werden. Bei sehr langen Produkten (> 1.200 bp) war es daher erforderlich, die Sequenzierung mit mehreren Primern durchzuführen, um anschließend die Sequenz aus den einzelnen generierten Teilsequenzen zusammensetzen.

Das Prinzip der Sequenzanalysen beruhte auf dem Kettenabbruchverfahren nach Sanger *et al.* (1977) und wurde in Form des so genannten Cycle Sequencing mit dem BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Sequencing-Kit (*Applied Biosystems*, Darmstadt) nach modifizierter Herstellerempfehlung durchgeführt (Tabelle 9). Der im Herstellerprotokoll vorgegebene Reaktionsansatz wurde jeweils halbiert, so dass mit einem Ansatzvolumen von 10 µl gearbeitet wurde. Nur zur Sequenzierung besonders langer PCR-Produkte (> 2,5 kb) wurde der im Herstellerprotokoll empfohlene Ansatz (20 µl) verwendet.

Tabelle 9: Komponenten des Reaktionsansatzes und Cycyclerbedingungen für die Sequenzierreaktion.

| Reaktionsansatz                                     |          | Thermocyclerprogramm                      |
|---|----------|---|
| BigDye <sup>®</sup> Terminator v3.1 Reaction Mix    | 2 µl     | Initiale Denaturierung (96°C) 1 min       |
| BigDye <sup>®</sup> Terminator 5x Sequencing Buffer | 1 µl     | 25 Zyklen:<br>Denaturierung (96°C) 10 sek |
| je Primer   | 0,5 µM   |   |
| PCR-Produkt   | variabel | Annealing (55°C) 5 sek                    |
| H <sub>2</sub> O für die Molekularbiologie          | ad 10 µl | Elongation (60°C) 2 min                   |

Nach der Sequenzierreaktion wurde das entstandene Produkt im Cycler auf 4°C heruntergekühlt und anschließend in einem 2,5-fachen Volumen des Ansatzes an absolutem Ethanol und 1/10 des Ansatzvolumens an Natrium-Acetat gefällt. Nach 30 min Zentrifugation bei 14.000 rpm wurde der Überstand mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Daraufhin erfolgten 2 Waschschriffe. Hierbei wurden 150 µl 70% Ethanol auf das Pellet gegeben, erneut etwa 10 min bei 14.000 rpm zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Im Anschluss wurde das Probenpellet bei 55°C für 20 min getrocknet und bei -20°C eingefroren. Zur Sequenzierung wurde das Produkt zunächst mit 10 µl Hi-Di™ Formamid (*Applied Biosystems*, Darmstadt) resuspendiert und denaturiert. Die anschließende Sequenzierung erfolgte dann mit einem automatischen Kapillarsequenzierer (*Genetic Analyzer 3130*, *Applied Biosystems*) nach Herstellervorgaben. Nach der kapillarelektrophoretischen Auftrennung der entstandenen Fragmente wurden diese, mit Hilfe der Data Collection Software, (*Applied Biosystems*, Darmstadt) chromatographisch als Basensequenz dargestellt.

Die weitere Analyse der Sequenzdaten erfolgte mit den Programmen ChromasPro 1.3 beta 1 und dem Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).

### **3.2.3.12 Real-time-quantitative-PCR (qPCR)**

Für den Abschnitt aus dem *EDNRB*-Gen (Exon 4) sowie für den Abschnitt aus dem 150 kb upstream gelegenen Gen *SLAIN1* (Exon 3) wurde eine qPCR am Corbett Rotor Gene 3000 (*Corbett life Science*, Mortlake, Australien) durchgeführt. Die Länge der Fragmente betrug 147 bp (*EDNRB*) bzw. 151 bp

(*SLAIN1*). Mit Hilfe der Amplifikation des *SLAIN1*-Fragments wurde die relative Kopienzahl (CNV) des *EDNRB*-Fragments ermittelt. Für die qPCR wurde ein SYBR<sup>®</sup> GREEN-haltiger PCR-Mastermix (ABsolute<sup>™</sup> SYBR<sup>®</sup> Green qPCR-Mix, Thermo Scientific, Schwerte) verwendet. PCR-Bedingungen und Primersequenzen sind in Tabelle 10 und 11 dargestellt.

Tabelle 10: Reaktionsansatz und Cyclerprotokoll für die testweise Amplifikation der qPCR-Fragmente.

| Reaktionsansatz Test-PCR        |                 | Thermocyclerprogramm     |        |
|---------------------------------|-----------------|--------------------------|--------|
| Template DNA                    | 100 ng          | Initiale Denaturierung   | 90 sek |
| Reaktionspuffer                 | 1x konzentriert | 35 Zyklen:               |        |
| dNTPs (je Base)                 | 0,2 mM          | Denaturierung (95°C)     | 15 sek |
| MgCl <sub>2</sub>               | 2 mM            | Annealing (54°C)         | 30 sek |
| Je Primer                       | 0,4 µM          | Elongation (72°C)        | 40 sek |
| Polymerase<br>(Go Taq, Promega) | 0,5 U           | Finale Elongation (72°C) | 5 min  |

Tabelle 11: Primer für die Real-time-quantitative-PCR am Rotorgene.

| Gen           | Primerpaar               | Primersequenz (5'-3')     | Fragmentgröße |
|---------------|--------------------------|---------------------------|---------------|
| <i>EDNRB</i>  | BT <i>EDNRB</i> In3(F)   | gaagattattccttgatgagcattt | 147 bp        |
|               | BT <i>EDNRB</i> Ex4(R)   | cggcaggcagaaatagaaac      |               |
| <i>SLAIN1</i> | OAR <i>SLAIN1</i> Ex3(F) | gcgaagtctctccctcaa        | 151 bp        |
|               | OAR <i>SLAIN1</i> In3(R) | ttttaaagcacatttggaataca   |               |

Die beiden Produkte wurden zunächst über eine konventionelle PCR amplifiziert (Tabelle 10) und die Identität der entstandenen Produkte mittels

Sequenzierung, analog der unter 3.2.3.11 beschriebenen Vorgehensweise, überprüft.

Die qPCR wurde analog dem Herstellerprotokoll (ABSolute™ SYBR® Green qPCR Kit, *Thermo Scientific*, Schwerte) angesetzt, wobei 0,2 µM je Primer und 6,25 ng DNA je Ansatz verwendet wurden. Im Rotor-Gene wurde die DNA zunächst 15 min bei 95°C denaturiert, gefolgt von 40 Zyklen á 15 sek bei 95°C, 15 sek bei 54°C und 15 sek bei 72°C. Zur Erstellung einer Eichgerade wurde eine DNA-Probe seriell verdünnt (50%, 25%, 12,5%). DNA von diesen 3 Verdünnungen wurde in jeden qPCR-Lauf zusätzlich zu den zu analysierenden DNA-Proben als Eichgerade einbezogen.

Die Quantifizierung der Templatemenge der beiden Gene wurde mit Hilfe des Programms Rotor Gene Real Time Analysis Software 6.0 (*Corbett Research*, Mortlake, Australien) auf Basis einer linearen Regression durchgeführt. Die Spezifität der Reaktion wurde mittels Schmelzpunktanalyse überprüft. Jede Probe wurde dreifach getestet und ebenso wurden Kontrollproben ohne Template-DNA eingesetzt, um DNA-Kontaminationen der PCR-Reagenzien auszuschließen. Das Verhältnis der Templatemenge der beiden Gene zueinander wurde für alle eingesetzten Proben errechnet.

Die statistische Auswertung der relativen Kopienzahl des *EDNRB*-Fragments bei den analysierten Proben wurde mit dem Programm PASW Statistics 18 (*IBM*, New York, USA) durchgeführt. Um zu prüfen, ob hinsichtlich der Messwerte signifikante Unterschiede zwischen Gruppenmittelwerten bestanden, wurde ein zweiseitiger t-Test für unabhängige Stichproben bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% verwendet. Zur Überprüfung der

Varianzhomogenität wurde der Levene-Test angewandt, wobei ebenfalls ein Signifikanzniveau von 5% zugrunde gelegt wurde.

### 3.2.3.13 Duplex-PCR

Zur simultanen Amplifikation zweier Fragmente im Bereich des *EDNRB* wurde eine Duplex-PCR etabliert (Camberlain *et al.* 1988). Hierzu wurde ein Multiplex-PCR-Kit (*Qiagen*, Hilden) verwendet und nach Herstelleranleitung verfahren. Mit Hilfe des ersten Primerpaars wurde ein Fragment im Bereich des *EDNRB* amplifiziert, während ein zweites Primerpaar ein Fragment in einem flankierenden Bereich des Gens amplifizierte. Die Primersequenzen, der Reaktionsansatz und die verwendeten PCR-Bedingungen sind in Tabelle 12 und Tabelle 13 aufgeführt.

Die entstandenen Fragmente wurden anschließend elektrophoretisch in einem 1,5% Agarosegel aufgetrennt und mittels Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

Tabelle 12: Sequenzen und Lokalisation der in der Duplex-PCR verwendeten Primerpaare.

| Nr. | Lokalisation            | Fragmentlänge | Primersequenz (f/r) 5'-3'   |
|-----|-------------------------|---------------|-----------------------------|
| 1   | BT <i>EDNRB</i> In3     | 366 bp        | gaagattattccttgatgagcattt   |
|     | BT <i>EDNRB</i> Ex4     |               | cagactaagaaaaaggaattatgctct |
| 2   | 19,4 kb 5' <i>EDNRB</i> | 110 kb        | cacacagagaatcagaaacagagaa   |
|     | 60 kb 3' <i>EDNRB</i>   |               | attgctagcttaatttcctttcttg   |

Tabelle 13: Reaktionsansatz und Thermocyclerbedingungen für die Duplex-PCR.

| Reaktionsansatz                 |          | Thermocyclerprogramm                 |        |
|---------------------------------|----------|--------------------------------------|--------|
| Template DNA                    | 150 ng   | Initiale Denaturierung (95°C) 15 min |        |
| Qiagen Multiplex PCR Mastermix* | 1x       | 30 Zyklen:                           |        |
| Je Primer (1. Primerpaar)       | 0,5 µM   | Denaturierung (95°C)                 | 30 sek |
| Je Primer (2. Primerpaar)       | 0,16 µM  | Annealing (55°C)                     | 90 sek |
| H <sub>2</sub> O                | ad 15 µl | Elongation (72°C)                    | 90 sek |
|                                 |          | Finale Elongation (72°C)             | 10 min |

\*Qiagen Multiplex PCR Mastermix (Qiagen, Hilden) enthält Taq Polymerase, Nukleotide und Puffer.

### 3.2.4 Zytogenetische Methoden

#### 3.2.4.1 Herstellung von Lymphozytenzellkulturen und Metaphasenpräparaten

Blutproben für die Herstellung von ovinen und bovinen Lymphozytenzellkulturen wurden spätestens 4 h nach der Blutentnahme nach dem in Tabelle 14 beschriebenen Protokoll angesetzt.

Tabelle 14: Zusammensetzung der Lymphozytenzellkulturen (Iannuzzi und Berardino 2008).

| Komponenten               | Volumen   |
|---------------------------|-----------|
| RPMI 1640 Medium          | 7 ml      |
| Fötale Kälberserum        | 2 ml      |
| L-Glutamin 30 mg/ml       | 100 µl    |
| Concanavalin 1 mg/ml      | 150 µl    |
| Antibiotika, Antimykotika | 45 µl     |
| Natrium-Heparin           | 1 Tropfen |
| Vollblut                  | 1 ml      |

Der Ansatz der Kulturen erfolgte unter der Sterilwerkbank in sterilen 50 ml-Zellkulturflaschen. Diese wurden für 72 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Um neben konventionellen Chromosomenpräparationen auch R-gebänderte Präparate zu erhalten, wurde einem Teil der Kulturen 6 h vor Ablauf der 72-stündigen Inkubationszeit Bromdesoxyuridin (BrdU 15 µg/ml) und Hoechst 33258 (30 µl/ml) zugegeben. Allen Kulturen wurde 30 min vor Ende der Inkubationszeit 40 µl Kolchizin in einer Konzentration von 1 µg/ml zugefügt, anschließend wurden sie für weitere 30 min inkubiert.

Nach dem Ende der Inkubationszeit wurden die Kulturen in ein 15 ml Falcon Röhrchen überführt und 10 min bei 1700 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Pellets in 2 ml hypotoner 0,56% KCl-Lösung resuspendiert und anschließend mit 0,56% KCl-Lösung auf 12 ml aufgefüllt. Die Inkubationszeit betrug 20 min bei 37°C. Anschließend wurde 1 ml kalte Fixierlösung (Methanol-Essigsäure 3:1) zugegeben. Die Röhrchen wurden geschwenkt und zentrifugiert (1700 rpm, 10 min). Der Überstand wurde abermals abgesaugt, das entstandene Pellet in 1 ml Fixierlösung resuspendiert und zum Aufbrechen der Zellen kräftig mittels einer Pasteurpipette durchpipettiert. Im Anschluss wurde auf 12 ml mit Fixierlösung aufgefüllt, durchmischt und bei 4°C 20 min inkubiert.

Zum Waschen der Kultur wurde erneut bei 1700 rpm für 10 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen, wieder mit Fixierlösung aufgefüllt und durchmischt. Dieser Schritt wurde 3x wiederholt. Im letzten Schritt wurde der Überstand bis auf 1 ml abgesaugt, das Pellet resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

Zur Herstellung der Metaphasenchromosomenpräparate wurden 3-4 Tropfen dieser Zellsuspension aus einer Höhe von etwa 40 cm auf einen Objektträger aufgetropft und lichtmikroskopisch, bei 10-facher Vergrößerung, auf Reinheit und Konzentration untersucht (Iannuzzi und Berardino 2008).

Die Karyotypisierung wurde anhand der Standardideogramme der ISCNB für die R-gebänderten Präparate durchgeführt (Cribiu *et al.* 2001).

**3.2.4.2 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) auf Metaphasenchromosomen**

*Herstellung der Sonden*

Anhand des NCBI clone finders (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clone/>) wurde ein Bakterien-Klon ausgewählt, der einen Chromosomenabschnitt von *Bos taurus* aus dem für die vorliegende Untersuchung relevanten Bereich 12q22 enthält. Hierbei handelt es sich um den BAC-Klon CH240-51D6, der über das *Children`s Hospital Oakland Research Institute (CHORI, Oakland, USA)* bezogen wurde.

Der BAC-Klon wurde in E-coli-Bakterien des Stamms DH10B als LB-Flüssigkultur mit 12,5 µg/ml Chloramphenicol geliefert. Die Kultur wurde in LB/Chloramphenicol-Selektivmedium (12,5 µg/ml) kultiviert und anschließend zur Isolation der BAC-DNA eine alkalische Lyse, analog einem von *CHORI* empfohlenen Protokoll vorgenommen (<http://bacpac.chori.org/bacpacmini.htm>). Zur Identitätskontrolle wurde aus der so gewonnenen BAC-DNA ein 366 bp-Abschnitt aus Exon 4 des *EDNRB* amplifiziert. Die verwendeten Primer und PCR-Bedingungen sind unter Punkt 3.2.3.4.1 in Tabelle 5 beschrieben.

### *Markierung der Sonde*

Die BAC-DNA wurde mit Biotin-16dUTP oder mit Digoxigenin-11dUTP (beide *Roche Diagnostics GmbH*, Mannheim) mittels Nick-Translation markiert. Die Methode wurde von Rigby *et al.* (1977) entwickelt.

Hierzu wurde ein kommerzielles Nick-Translation-Kit (*Roche Diagnostics GmbH*, Mannheim) verwendet und nach Herstellerprotokoll verfahren. Für die Reaktion wurden etwa 0,5 µg BAC-DNA eingesetzt. Die Mengenermittlung erfolgte anhand des Nanodrop Spektralphotometers (*Thermo Scientific*, Schwerte). Die Digoxigenin-11dUTP-markierte DNA wurde im Anschluss für die FISH-Hybridisierung auf ungebänderten Metaphasenchromosomen eingesetzt, während die Biotin-16dUTP-markierte DNA zur Hybridisierung auf R-gebänderten Metaphasenchromosomen (RBPI-FISH) verwendet wurde.

### *Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung auf ungebänderten Metaphasenchromosomen*

Die FISH-Hybridisierung erfolgte nach einem in Pauciuolo *et al.* (2012) beschriebenen Verfahren. Hierzu wird die markierte BAC-DNA aus der Nick-Translation mit Kompetitor-DNA (10 µg Desoxyribonucleinsäure aus Lachssperma, *Life Technologies GmbH*, Darmstadt) und 10 µg Desoxyribonucleinsäure aus Kalb-Thymus (*Sigma-Aldrich Chemie GmbH*, München) versetzt, um repetitive Sequenzen zu blockieren und Fehlhybridisierungen zu minimieren. Der Ansatz wurde anschließend in 100% Ethanol präzipitiert, 30 min bei -20°C inkubiert und 30 min bei 4°C und 14.000

rpm zentrifugiert. Der Ethanol-Überstand wurde abgenommen und das Pellet etwa 20 min bei 37°C getrocknet.

Das Pellet wurde anschließend in 15 µl FISH-Hybridisierungslösung resuspendiert und für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Denaturierung der Sonde erfolgte für 10 min bei 75°C, gefolgt von 3 min Inkubation auf Eis. Anschließend wurde nochmals eine Stunde bei 37°C inkubiert, um die Anlagerung der Kompetitor-DNA zu ermöglichen.

Die Objektträger mit den Metaphasenpräparaten wurden zunächst für 10 min in einer FISH-Vorbereitungslösung inkubiert und danach in 3 Schritten, durch jeweils 2-minütiges Eintauchen in 70%, 80% und 96% Ethanol, dehydriert und getrocknet. Anschließend erfolgte die Denaturierung in Denaturierungslösung bei 75°C für 3,5 min. Die Präparate wurden dann erneut in 3 Schritten mit -20°C kaltem Ethanol (70%, 80% und 96%) dehydriert. Dann wurde die Sonden-DNA auf die Objektträger aufgetragen und mit 24x 24 mm Deckgläsern abgedeckt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 16 h. Die Präparate wurden in Waschlösung und in 2x SSC bei 42°C gewaschen und anschließend 5 min in PBS-T-Lösung bei RT inkubiert. Die Detektion der mit Digoxigenin-11dUTP markierten DNA erfolgte mit einem mit Rhodamin-konjugiertem Anti-Digoxigenin-Antikörper vom Schaf (*Roche Diagnostics GmbH* Mannheim). Von dem Antikörper wurde eine 0,4%ige Verdünnung in PBT-Lösung angefertigt und 70 µl auf den Objektträger aufgebracht. Die Objektträger wurden mit 24x 50 mm Deckgläsern abgedeckt und 1 h bei 37°C inkubiert. Nach Ende der Inkubation wurde erneut in PBS-T-Lösung gewaschen und eine Kontrastfärbung mit DAPI (0,24 mg/ml) (D9542, *Sigma-Aldrich Chemie GmbH*, München) in Einbettmedium (VECTASHIELD Mounting Medium, H1000, *Vector Laboratories*, CA, USA) vorgenommen.

*R-Banded-Propidium-Iodide(RBPI)-FISH*

Für die RBPI-FISH nach Iannuzzi und Berardino (2008) wurden die Objektträger mit den R-gebänderten Präparaten für 16-18 h bei 50°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Objektträger mit Hoechst 33258 (25 µg/ml) für 10 min angefärbt. Die Objektträger wurden mit 800 µl 2x SSC beschichtet, mit einem Deckglas abgedeckt und für 30 min mit einer 30 W UV-Lampe bestrahlt.

Die Vorbereitung der Sonde erfolgte wie zuvor beschrieben. Die Objektträger mit den Metaphasenpräparaten wurden jedoch direkt, bei 75°C durch 70%-iges Formamid in 2x SSC, für 3 min denaturiert. Die Präparate wurden dann erneut in drei Schritten mit -20°C kaltem Ethanol (70%, 80% und 96%) dehydriert. Anschließend wurde die Sonden-DNA auf die Objektträger aufgetragen und mit 24x 24 mm Deckgläsern abgedeckt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 72 h. Nach Ende der Inkubation wurden die Präparate mit Waschlösung (50% Formamid/50% 2x SSC), 2x SSC und 1x PBS-T gewaschen. Die Detektion der mit Biotin-16dUTP markierten DNA erfolgte mit dem grünen Fluoresceinisothiocyanat(FITC)-Avidin-Antikörper (*A-2011 Vector Laboratories, CA, USA*). Von dem Antikörper wurde eine 0,4%ige Verdünnung in PBT-Lösung angefertigt und 70 µl auf den Objektträger aufgebracht. Die Objektträger wurden mit 24x 50 mm Deckgläsern abgedeckt und 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde mit PBS-T gewaschen und für weitere 30 min mit einem Anti-Avidin-Antikörper (*BA-0300, Vector Laboratories, CA, USA*) inkubiert. Nach erneutem Waschen in PBS-T wurde im letzten Schritt nochmals der FITC-Avidin-Antikörper aufgetragen und abermals 30 min inkubiert und gewaschen.

Die Präparate wurden anschließend mit Propidiumjodidlösung (25 µg/ml) für 10 min angefärbt und mit *Aqua dest.* gewaschen. Abschließend wurde eine Lösung

aus Propidiumjodid (3 µg/ml) in Einbettmedium (VECTASHIELD Mounting Medium, H1000, *Vector Laboratories*, CA, USA) aufgetragen und mit einem Deckglas abgedeckt (Iannuzzi und Berardino 2008).

#### **3.2.4.3 Mikroskopische Untersuchung und Auswertung**

Die Hybridisierung der Sonde auf die Metaphasenpräparate wurde bei 100-facher Vergrößerung mit einem DMRA-Fluoreszenzmikroskop (*Leica*, Wetzlar, Germany) überprüft. Das Mikroskop war mit DAPI-, FITC- und Texas-red-spezifischen Filtern ausgerüstet, um die verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe detektieren zu können. Digitale Bilder wurden mit Hilfe der *Leica Q4000* Software (*Leica*, Wetzlar) aufgenommen. Von jedem Präparat wurden mindestens 30 Metaphasen in die Auswertung einbezogen und die FISH-Effizienz (Anteil Metaphasen mit Fluorezenzsignal/untersuchte Metaphasen) ermittelt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Histologisch-pathologische Untersuchungen

Beide im Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen untersuchten Lämmer wiesen einen ähnlichen Phänotyp auf. Das Fell des einen Lamms (Lab. Nr. 2914-2008) war vollständig weiß (Abb. 12B), während das andere Lamm (Lab. Nr. 3077-2008) schwarze Klauen sowie kleinere schwarz pigmentierte Bereiche an den Kronrändern und im Bereich des Schwanzes aufwies (Abb. 12C und 12D).



Abbildung 12: Kamerunschafe mit rassetypischem Phänotyp (A); hypopigmentierte Lämmer (B+C); pigmentierte Kronränder des zweiten Lamms (D).

Abbildung 12A zeigt den rassetypischen Phänotyp zweier adulter Kamerunschafe und eines Kamerunlamms. Typischerweise haben Kamerunschafe bereits als Lämmer braune Augen, während die Augen der beiden untersuchten weißen Lämmer eine hellblau gefärbte Iris aufwiesen (Abb. 13A).

Die pathologisch-anatomische Untersuchung ergab bei beiden hypopigmentierten Lämmern ein stark ausgeweitetes Abdomen (Abb. 13 B). Im Enddarm befand sich noch Mekonium. Die histopathologische Untersuchung von Proben aus Duodenum, Jejunum, Ileum, Cecum, Colon und Rectum ergab eine normale Anzahl und Verteilung sowohl intramuraler als auch submuköser Ganglienzellen. Die Ganglienzellen zeigten eine normale Morphologie und der immunohistologische Synaptophysinnachweis zeigte eine gleichmäßige, feingranuläre Reaktion. Die bakteriologische Untersuchung ergab einen stark positiven Nachweis von E-coli in Leber, Milz, Niere, Lunge und Darm (Tgb.-Nr. 959/08).



Abbildung 13: Augen mit hellblau gefärbter Iris (A) und dilatiertes Cecum (B) eines hypopigmentierten Lamms (Lab. Nr. 3077-2008).

## 4.2 Screening nach Mutationen im Kandidatengen *EDNRB*

Mit DNA, die aus Proben der beiden hypopigmentierten Lämmer isoliert wurde, war keine Amplifikation von Fragmenten des Kandidatengens *EDNRB* möglich. Mit den DNA-Proben der anderen Herdenmitglieder sowie mit der DNA von 5 weiteren, nicht verwandten Vergleichstieren, konnte der gesamte codierende Bereich des *EDNRB* in 5 Fragmenten, inklusive flankierender Intronbereiche, amplifiziert und sequenziert werden. Alle generierten Sequenzen für das ovine *EDNRB* wurden bei der Genbank (NCBI BankIT) eingereicht (Accession Nummer JQ937242).

In den *EDNRB*-Sequenzen der untersuchten Schafe wurden verschiedene Sequenzvarianten identifiziert, die teilweise mit entsprechenden Aminosäureaustauschen einhergehen. Im Exon 1 (Positionen 24, 65, 69 der Genbanksequenz JQ937242) wurden insgesamt 3 Varianten festgestellt, die auch alle mit entsprechenden Aminosäureaustauschen verbunden waren. Im Intron 1 (Position 637) wurde, ebenso wie im Exon 2 (Position 644), eine Variante festgestellt, die allerdings zu keinem Aminosäureaustausch führte, während im Exon 3, weitere Sequenzvarianten beobachtet wurden (Positionen 891, 975, 981, 1048), von denen eine (Position 1048) mit einem Aminosäureaustausch verbunden war. Weitere Sequenzvarianten fanden sich in den Bereichen von Intron 3 (Position 1460), Intron 5 (Position 2606), Intron 6 (Position 2998) und in der 3`untranslatierten Region (Position 3291).

### 4.3 Ermitteln von Copy Number Variations (CNV) mittels qPCR

Die Ergebnisse der Real-time-quantitativen-PCR mit DNA-Proben der beiden hypopigmentierten Lämmer (Lab. Nr. 2914-2008 und 3077-2008) sowie mit 3 Müttern (Lab. Nr. 2892-2008, 2893-2008, 2896-2008), einer Großmutter (Lab. Nr. 2895-2008) hypopigmentierter Lämmer und 12 weiteren, nicht mit der Herde verwandten Vergleichstieren (Lab. Nr. 4216-2011, 4217-2011, 4218-2011, 4219-2011, 4221-2011, 4222-2011, 4223-2011, 4224-2011, 4261-2011, 4262-2011, 4263-2011, 4264-11), sind in Abbildung 14 und Tabelle 15 dargestellt.

Es wird der Quotient aus der relativen *EDNRB*-Kopienzahl im Vergleich zum Kontrollgen *SLAIN1* gezeigt. Dieser Wert war bei den 12 mit den betroffenen Lämmern unverwandten Kontrolltieren (Gruppe 2) erwartungsgemäß nahezu = 1 (0,887), während er bei den Müttern und Großmüttern der betroffenen Lämmer (Gruppe 1) signifikant erniedrigt war (0,252). Wie zu erwarten, war der Quotient bei den betroffenen Lämmern (Gruppe 3) = 0, da hier keine Amplifikation des *EDNRB*-Fragments erfolgte.

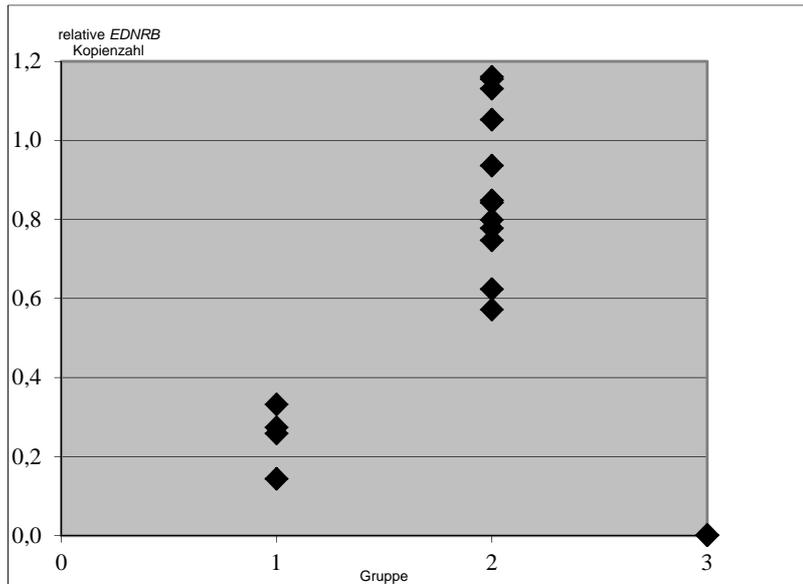


Abbildung 14: Quotient aus den relativen Kopienzahlen von *EDNRB* und *SLAIN1* bei hypopigmentierten Lämmern (Gruppe 3), nicht verwandten Vergleichstieren (Gruppe 2) und verwandten Tieren (Gruppe 1).

Der Vergleich der Mittelwerte wiederholter Messungen des Quotienten der relativen *EDNRB*-Kopienzahl durch einen t-Test lieferte höchst signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen 1-3 (Tabelle 15). Die Varianzhomogenität innerhalb der Gruppen konnte anhand des Levene-Tests bestätigt werden, wobei ein Signifikanzniveau von 5% zugrunde gelegt wurde. Signifikante Unterschiede zwischen Gruppenmittelwerten werden durch verschiedene Hochbuchstaben gekennzeichnet, wobei ebenfalls eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% zugrunde gelegt wurde. Die Ergebnisse sind in Form der Gruppenmittelwerte mit der zugehörigen Standardabweichung dargestellt (Tabelle 15).

Tabelle 15: Errechnetes Templatemengenverhältnis *EDNRB/SLAIN1* ( $p < 0.001$ ).

| Gruppe                        | 1                     | 2                     | 3     |
|-------------------------------|-----------------------|-----------------------|-------|
| <b>MW <i>EDNRB/SLAIN1</i></b> | 0,252 <sup>a***</sup> | 0,887 <sup>b***</sup> | 0,000 |
| <b>±</b>                      | 0,079                 | 0,202                 | ----- |

#### 4.4 Analyse der flankierenden Bereiche des *EDNRB* auf OAR10

Aufgrund der Tatsache, dass mit der DNA der beiden hypopigmentierten Lämmer keine Amplifikation von Fragmenten im Bereich des *EDNRB*-Gens erreicht werden konnte, wurden flankierende Bereiche des Gens auf dem ovinen Chromosom 10 untersucht. Die 5 hierzu ausgewählten Mikrosatellitenmarker auf OAR10 (OARVH58, MCM469A, CSRD87, BMS975 und TGLA441) ließen sich mit der DNA der beiden betroffenen Lämmer ebenso amplifizieren, wie mit DNA der unverwandten Kontrolltiere.

Die Untersuchung weiterer, dichter am *EDNRB*-Gen kartierter Bereiche, in 5`-Richtung ausgehend vom Gen *SLAIN1* (51,50-51,56 MB) und in 3`-Richtung ausgehend von einem 85 kb entfernten, nicht codierenden Bereich ergab, dass sich die weiter vom *EDNRB*-Gen entfernten Abschnitte bei den betroffenen Lämmern, genauso wie bei den Kontrolltieren amplifizieren ließen. Dagegen konnte mit Primerpaaren, die 18,7 kb in 5`-Richtung bis 58,9 kb in 3`-Richtung des Gens lokalisiert waren, ausschließlich bei den betroffenen Lämmern keine Amplifikation erreicht werden (Abb. 15). Die generierten Sequenzen wurden bei der Genbank eingereicht (Accession Nummer JQ937243 (*SLAIN1*); JQ959537

## Ergebnisse

---

(Sequenzabschnitte in 5`-Richtung des *EDNRB*); JQ959538

(Sequenzabschnitte in 3`-Richtung des *EDNRB*).

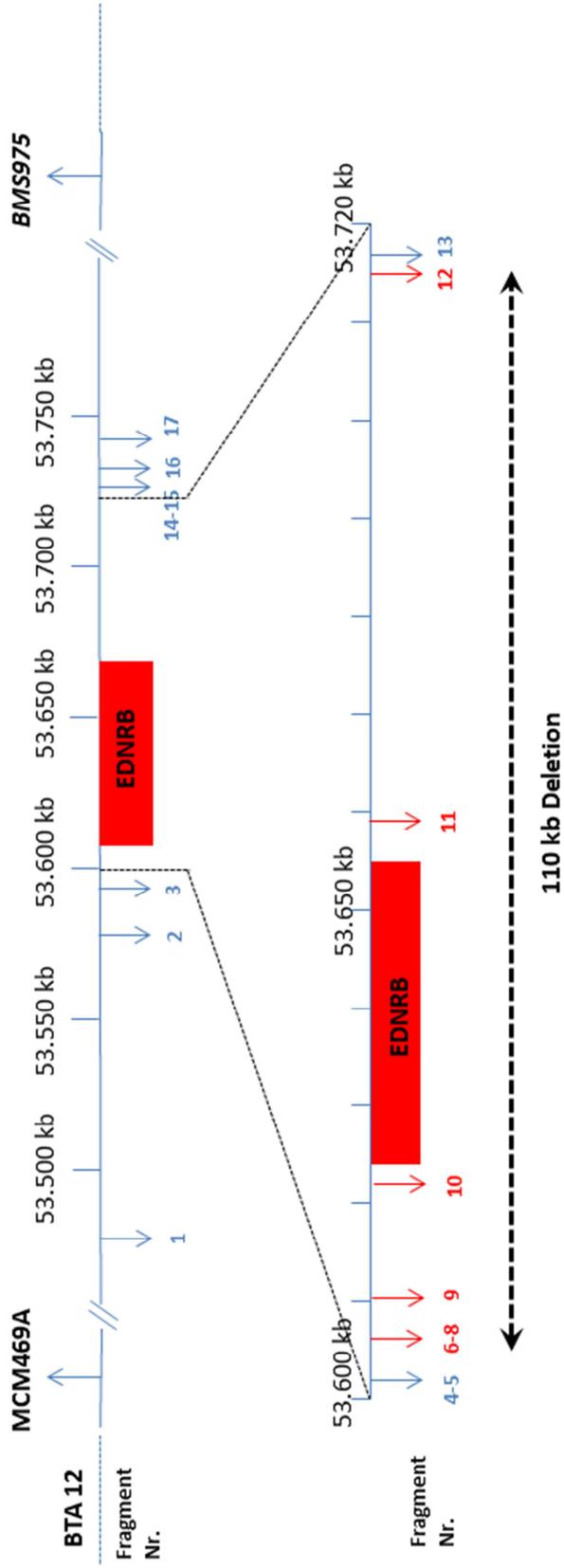


Abbildung 15: Lokalisation der amplifizierten Fragmente zur Untersuchung flankierender Bereiche des ovinen *EDNRB*. Die Primersequenzen der dargestellten Fragmentnummern sind den Tabellen 6a und 6b zu entnehmen. Die Positionsangaben in der Abbildung beziehen sich auf die bovine Sequenz NC\_007310.4. Rot dargestellt sind Fragmente, die ausschließlich bei den betroffenen Lämmern nicht amplifiziert werden konnten.

## 4.5 Duplex-PCR

Zur Entwicklung eines Gentests für das Vorliegen einer Deletion bei den betroffenen Lämmern sowie verwandten und nicht verwandten Vergleichstieren, wurde ein 19,4 kb upstream des Gens gelegener Vorwärtsprimer (3'-CACACAGAGAATCAGAAACAGAGAA-5'; Fragment Nr. 5 in Tabelle 6a und in Abb. 15) mit einem 60 kb downstream lokalisierten Rückwärtsprimer (3'-ATTGCTAGCTTAATTTCTTTCTTTG-5'; Fragment Nr. 13 in Tabelle 6b und in Abb. 15) kombiniert und in einer PCR-Reaktion eingesetzt. Dabei entstand ein 1,1 kb großes Fragment bei der Verwendung von DNA der beiden betroffenen Lämmer sowie deren Müttern und weiteren verwandten Tieren. Bei der Verwendung von DNA unverwandter Kontrolltiere entstand kein Amplifikat.

Die Sequenzierung des entstandenen 1,1 kb großen Fragments und der Vergleich dieser Sequenz mit den verfügbaren Abschnitten der ovinen Sequenz sowie mit der homologen Rindersequenz ergab das Vorliegen einer Deletion von etwa 110 kb, die von Position 53.604.050 bis zur Position 53.714.438 der bovinen Sequenz NC\_007310.4 reicht (Abb. 15 und 20).

Die etablierte Duplex-PCR wurde verwendet, um homozygot von der Deletion betroffene Tiere (*EDNRB* -/-) von heterozygoten Anlageträgern (*EDNRB* +/-) und von anlagefreien Tieren (*EDNRB* +/+) zu unterscheiden. Hierbei wurde neben den beiden beschriebenen Primern, die das 1,1 kb Fragment bei Anwesenheit der Deletion amplifizieren, ein weiteres Primerpaar zur Amplifikation eines 366 bp großen Fragments aus dem Exon 4 des *EDNRB* eingesetzt. Alle Tiere der betroffenen Herde (n = 27) wurden mit der Duplex-PCR genotypisiert. Bei den beiden hypopigmentierten Lämmern entstand

erwartungsgemäß nur das 1,1 kb Fragment. Innerhalb der Herde konnten 13 weitere (heterozygote) Trägertiere identifiziert werden, die nach der PCR sowohl das 1,1 kb-Fragment als auch das *EDNRB*-Fragment zeigten. Darunter waren auch die mit den betroffenen Lämmern verwandten Schafe, die bereits über die qPCR als Anlageträger identifiziert worden waren. Mit DNA-Proben dieser 13 Tiere entstanden in der Duplex-PCR beide Amplifikate (Abb. 16). Alle Mutterschafe, die ein betroffenes Lamm geboren hatten, waren Träger der Mutation.

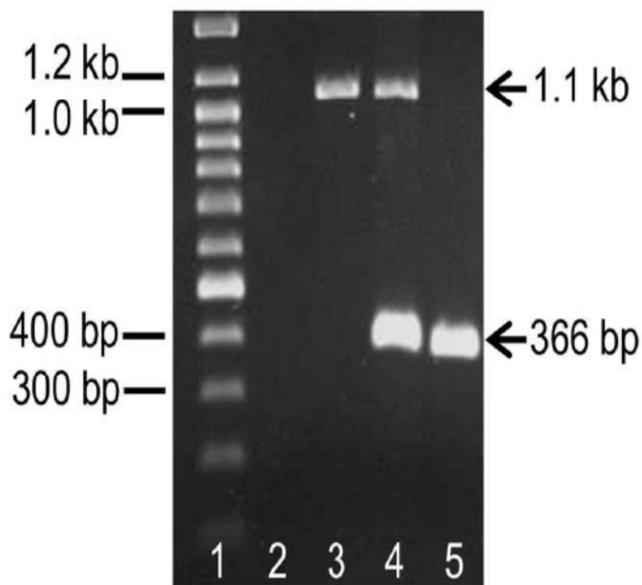


Abbildung 16: Agarose-Gelelektrophorese nach Duplex-PCR. Spur 1 = Marker; Spur 2 = Negativkontrolle; Spur 3 = Merkmalsträger (*EDNRB* -/-); Spur 4 = heterozygoter Anlageträger (*EDNRB* +/-); Spur 5 = anlagefreies Tier (*EDNRB* +/+).

Um das Vorkommen der Mutation in der Kamerunpopulation stichprobenartig zu untersuchen, wurden 127 weitere Kamerunschafe aus 7 verschiedenen

Kamerunherden getestet. Hierbei konnten keine weiteren Anlageträger identifiziert werden.

#### 4.6 Zytogenetische Untersuchungen

Die Karyotypisierung der 4 analysierten Tiere wurde anhand der RBA-gebänderten Präparate durchgeführt und ergab bei den beiden Kontrolltieren (Rind und Schaf) einen normalen Karyotyp, ohne sichtbare chromosomale Aberrationen. Die anderen 2 verwendeten Proben stammten von weiblichen Tieren, die mit den Merkmalsträgern eng verwandt waren (Lab. Nr. 2491-2010 und 2494-2010) und im Zuge der molekulargenetischen Untersuchungen als heterozygot für die Deletion getestet wurden. Auch diese beiden Tiere zeigten in der RBA-gebänderten Präparation einen augenscheinlich normalen Karyotyp (Abb. 17).

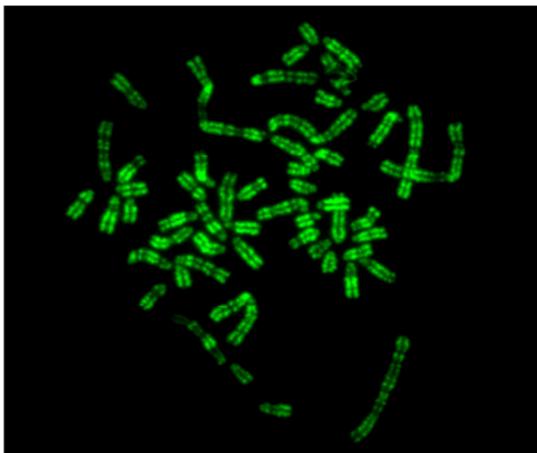


Abbildung 17: Metaphase-Chromosomen mit RBA-Bänderung eines Schafs mit heterozygoter *EDNRB*-Deletion.

Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung des BAC-Klons CH240-51D6 wurde zunächst am Probenmaterial der Kontrolltiere durchgeführt. Dabei zeigte sich auf den ungebänderten Präparaten der Tiere eine erfolgreiche Hybridisierung der Sonde in Form von 2 symmetrischen Punkten auf 2 homologen Chromosomen (Abb. 18b). Da es anhand dieser Präparate mit DAPI-Kontrastfärbung nicht möglich war, das in diesem Fall relevante ovine Chromosom 10 sicher zu identifizieren, wurde mit den RBA-gebänderten Präparaten zusätzlich eine RBPI-FISH durchgeführt. Dadurch konnte sichergestellt werden, dass das zuvor beobachtete Fluoreszenzsignal auf dem ovinen Chromosom 10 lokalisiert ist (Abb. 18a).

Die beobachtete FISH-Effizienz lag dabei bei durchschnittlich 91%. Die FISH-Effizienz ist definiert als die Anzahl an Metaphasen mit Hybridisierungssignal dividiert durch die insgesamt untersuchten Metaphasen. 30 Metaphasen wurden zur Ermittlung der FISH-Effizienz herangezogen.

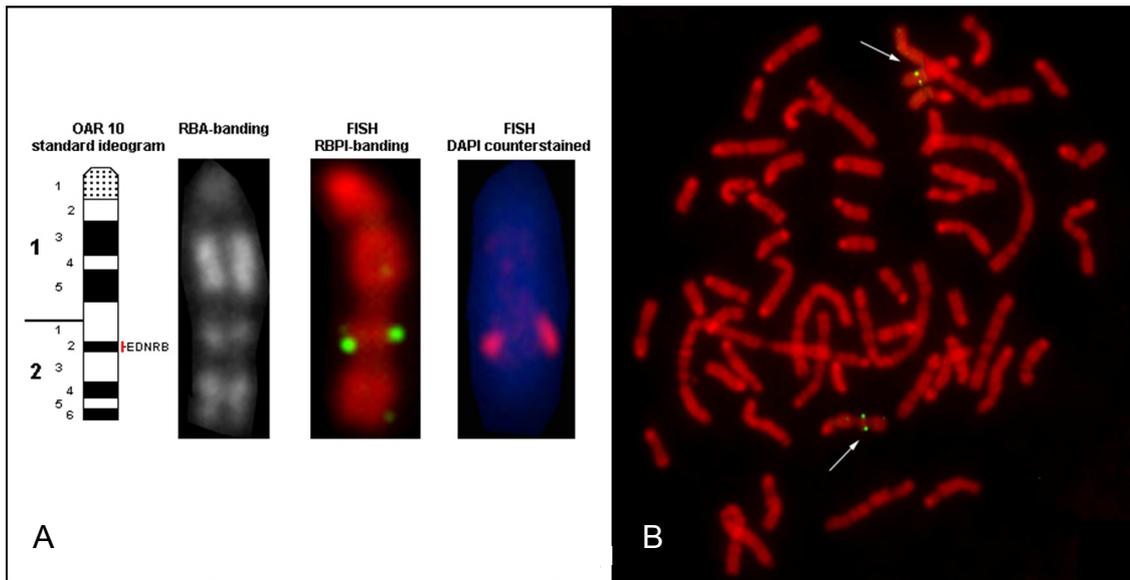


Abbildung 18: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung auf ovinen Metaphasenchromosomen mit spezifischem Fluoreszenzsignal auf OAR10q22. a) schematische Darstellung des OAR10, RBA-Banding, RBPI-FISH und konventionelle FISH mit DAPI-Kontrastfärbung; b) RBPI-FISH bei einem Kontrolltier.

An beiden in den molekularbiologischen Untersuchungen heterozygot getesteten Tieren (Lab. Nr. 2491-2010 und 2494-2010) wurden die gleichen Untersuchungen, d.h. konventionelle FISH mit DAPI-Kontrastfärbung und RBPI-FISH durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die verwendete Sonde nur auf einem der beiden homologen Chromosomen 10 im Bereich q22 hybridisierte, d.h. ein sichtbares Signal in Form von 2 symmetrischen Punkten erzeugte. Das Ausbleiben eines Fluoreszenzsignals auf einem der beiden homologen Chromosomen bestätigt das Fehlen der entsprechenden komplementären SONDENSEQUENZ auf dem Chromosom 10q22 und damit das Vorliegen der in den molekulargenetischen Untersuchungen festgestellten Deletion (Abb. 19).

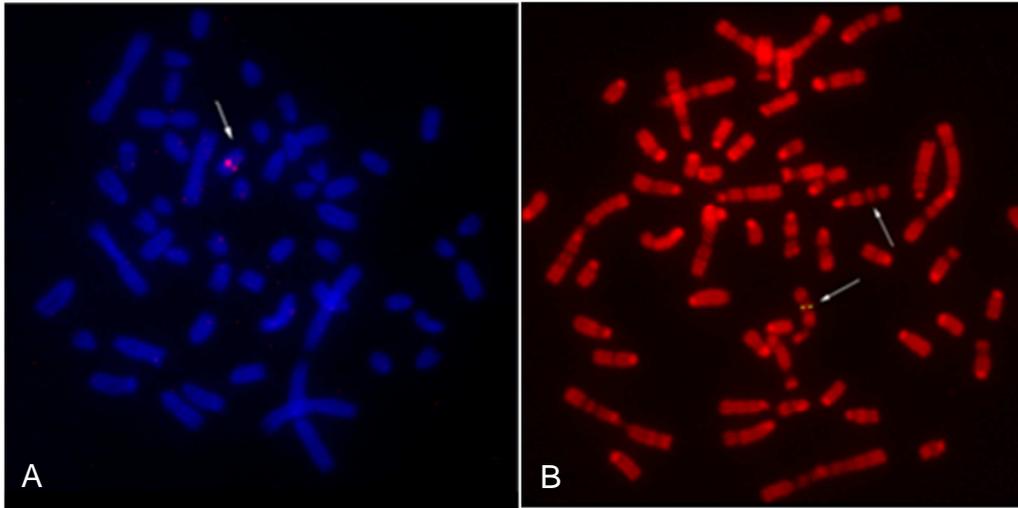


Abbildung 19: Heterozygotes Trägartier der *EDNRB*-Deletion bei konventioneller FISH mit DAPI-Kontrastfärbung (a) und RBPI-FISH (b).

Abbildung 20 liefert eine zusammenfassende schematische Darstellung der Ergebnisse der molekulargenetischen und zytogenetischen Untersuchungen.

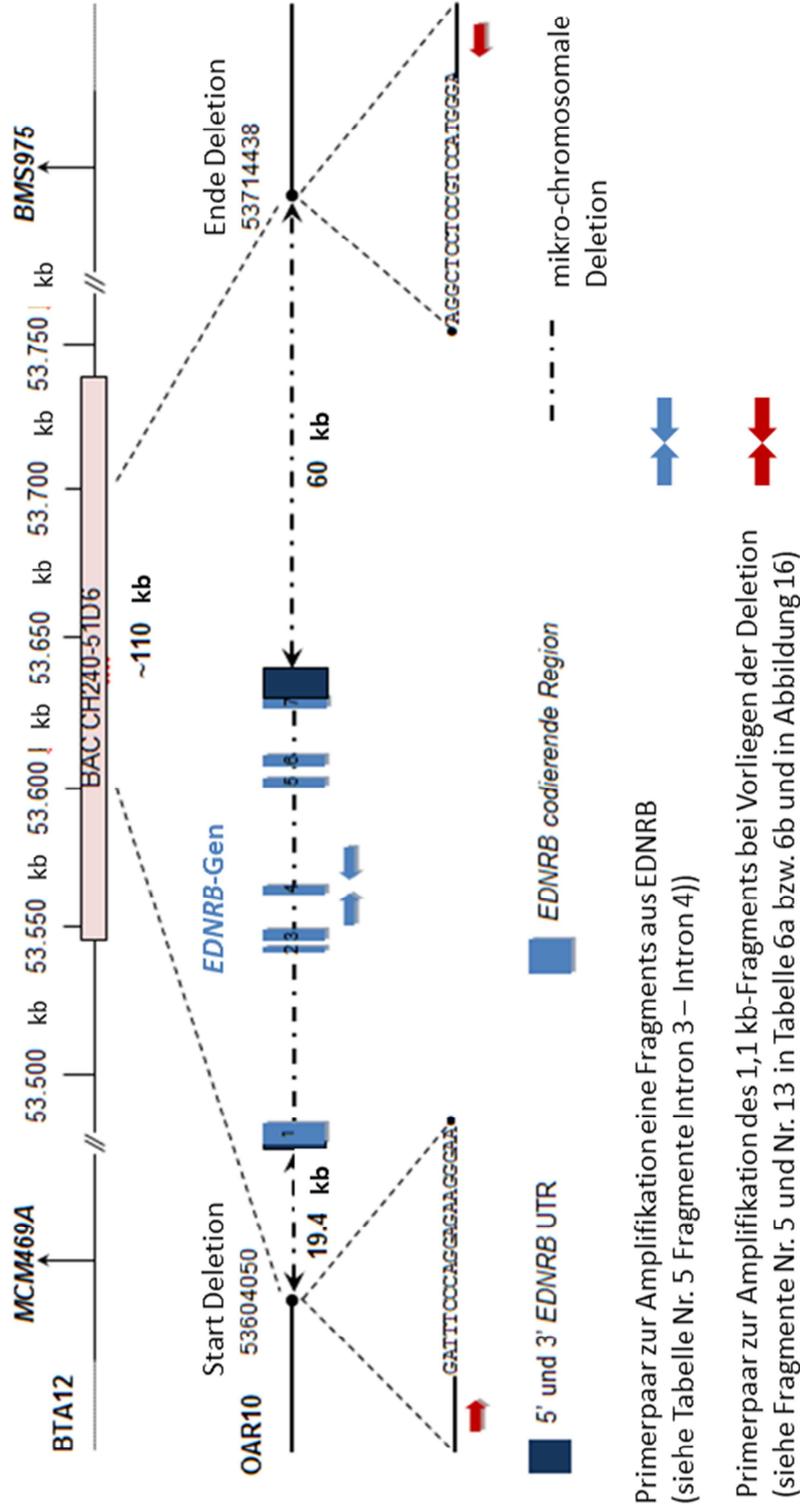


Abbildung 20: Schematische Darstellung der Deletion auf OAR10. Die Lokalisation der Deletion bezieht sich auf die bovine Referenzsequenz NC\_007310.

#### **4.7 Mikrosatellitenanalysen**

Zur Klärung der Verwandtschaftsverhältnisse und des Polymorphiegrades innerhalb der Herde wurde eine Abstammungsanalyse mit 9 ovinen Mikrosatellitenmarkern durchgeführt (Anhangstabelle 2A).

Teilweise zeigten die getesteten Mikrosatelliten innerhalb der Herde nur einen sehr geringen Polymorphiegrad (ILSTS028, MAF70, MAF33, OARVH72), d.h. 2 oder weniger Allele (Anhangstabelle 3A), wodurch in manchen Fällen keine eindeutige Zuordnung eines Lamms zu einem Muttertier möglich war. Insgesamt befanden sich unter den 22 in die Untersuchung einbezogenen Tieren 5 Mutterschafe, die aufgrund ihres Alters als Mütter der beiden hypopigmentierten Lämmer in Frage kamen. Dem ersten Lamm (Lab. Nr. 2914-2008) konnten 2 mögliche Muttertiere nach der Untersuchung zugeordnet werden. Bei diesen beiden Tieren handelte es sich um Mutter und Tochter, wobei die Tochter nach Aussage der Tierhalter das hypopigmentierte Lamm geboren hatte. Dem zweiten Lamm (Lab. Nr. 3077-2008) konnte ein Muttertier eindeutig zugeordnet werden, wobei dieses Ergebnis auch mit den Angaben der Halter übereinstimmte (Anhangstabelle 4A). Abbildung 21 liefert eine Übersicht über das Pedigree der hypopigmentierten Lämmer.

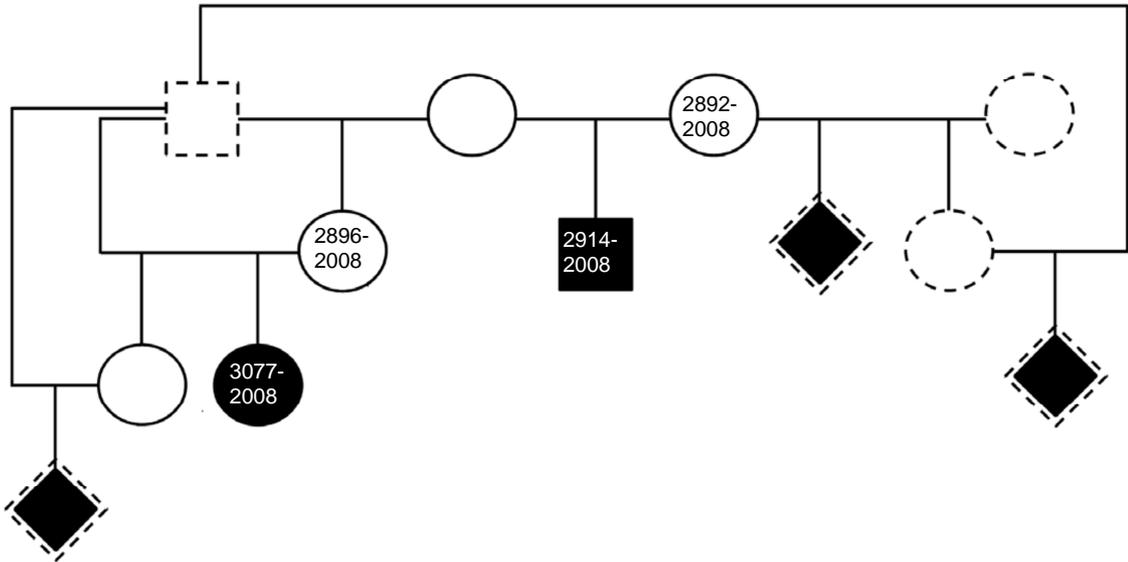


Abbildung 21: Pedigree der hypopigmentierten Lämmer (Quadrat = männliches Tier; Kreis = weibliches Tier; Raute = unbekanntes Geschlecht; weißes Symbol = phänotypisch normales Tier; schwarzes Symbol = Merkmalsträger; gestrichelte Linie = Tier nicht beprobt).

## 5 Diskussion

Mutationen im *EDNRB*-Gen wurden bereits bei verschiedenen anderen Spezies als Ursache für das Auftreten von Hypopigmentierungssyndromen beschrieben (Hosoda *et al.* 1994; Attié *et al.* 1995; Gariepy *et al.* 1996; Metallinos *et al.* 1998). Beim Schaf sind in der Literatur jedoch bislang keine Hinweise auf das Auftreten derartiger Syndrome vorhanden, obwohl inzwischen durch die Veröffentlichung der ovinen Referenzsequenz durch das International Sheep Genomics Consortium (ISGC) die molekulargenetische Charakterisierung und die Diagnostik auftretender Erbfehler beim Schaf erheblich vereinfacht wurde. 30 derartige erbliche Defekte wurden für das Schaf inzwischen beschrieben und molekulargenetisch charakterisiert (Lühken 2012).

Aufgrund der vorliegenden genetischen Befunde bei anderen Tierarten, wurde bereits zu Beginn der Arbeiten der Schwerpunkt der Untersuchungen auf das *EDNRB*-Gen gelegt, da die Vermutung nahelag, dass eine Mutation im *EDNRB* auch im Fall der dargestellten Schaffamilie die Ursache für den beschriebenen hypopigmentierten Phänotyp sein könnte.

Die Ergebnisse der am Kandidatengen *EDNRB* durchgeführten Analysen konnten belegen, dass bei den beiden betroffenen Lämmern eine Deletion in einer Größenordnung von 110 kb auf Chr. 10 in homozygoter Form vorliegt. Diese Deletion schließt das gesamte *EDNRB* mit ein und führt somit zum Fehlen von *EDNRB*-Protein bei den Merkmalsträgern. Aufgrund der Tatsache, dass die 5 in der Kamerunschafherde beobachteten hypopigmentierten Lämmer aus einer Anpaarung phänotypisch normaler und augenscheinlich gesunder

Elterntiere stammten, wurde zu Beginn der Untersuchungen ein rezessiver Erbgang vermutet, der im Nachhinein auch bestätigt werden konnte. Alle Muttertiere der hypopigmentierten Lämmer hatten einen normalen, für Kamerunschafe typischen Phänotyp, waren jedoch heterozygote Trägertiere (Anlageträger) der Mutation.

Die Lämmer stammten alle von demselben Bock ab, der jedoch zum Zeitpunkt der Probennahme nicht mehr in der Herde war und daher nicht untersucht werden konnte. Vor dem Hintergrund der Annahme, dass ein autosomal-rezessiver Erbgang vorliegt, müsste auch der Vater der Lämmer ein Anlageträger gewesen sein. Dies ist die Voraussetzung für das Auftreten homozygoter Nachkommen, die durch den beschriebenen hypopigmentierten Phänotyp charakterisiert sind.

Die betroffenen Lämmer zeigten innerhalb eines relativ kurzen Zeitraums, d.h. weniger Stunden *p.p.* bis zum Eintreten des Todes, eine verminderte Vitalität und Anzeichen intestinaler Obstruktion. Bei keinem der betroffenen Lämmer hatte der Tierhalter einen Mekoniumabgang beobachtet.

Aufgrund des vorliegenden Phänotyps, der stark an bereits beschriebene Hypopigmentierungssyndrome in anderen Spezies wie Pferd (Metallinos *et al.* 1998; Santschi *et al.* 1998) und Ratte (Gariepy *et al.* 1996) erinnerte, wurde bei der histologisch-pathologischen Untersuchung der Lämmer ein besonderes Augenmerk auf eine normale Morphologie des enterischen Nervensystems gelegt. Hierzu wurden Proben aus verschiedenen Abschnitten des Darms gewonnen und histologisch auf Fehlbildungen und Aplasie von Darmganglien untersucht. Das Vorliegen einer intestinalen Aganglionose konnte anhand der in diesen Untersuchungen verwendeten Stichprobe an histologischen Schnitten

nicht bestätigt werden, obgleich die betroffenen Lämmer, hinsichtlich des deutlich dilatierten Cecums und des verbliebenen Mekoniums im Enddarm, eine offensichtlich gestörte Darmmotilität aufwiesen. Da der Kadaver noch relativ frisch war, konnte bei dem zweiten untersuchten Lamm eine Colienterotoxämie als Todesursache festgestellt werden. Auch diese kann typischerweise durch die gestörte Darmmotilität hervorgerufen worden sein. Der Kadaver des ersten Lamms war weniger frisch, weshalb aufgrund der bereits fortgeschrittenen Zersetzungsprozesse keine sichere Aussage über die Todesursache getroffen werden konnte.

Möglicherweise könnte bei den Lämmern auch eine so genannte Ultra-Short-Segment-Aganglionose vorgelegen haben, zu deren genaueren Diagnose weitere spezielle Verfahren benötigt werden. Beim Menschen wurden diese Verfahren anhand einiger Fälle von Ultra-Short-Segment-Aganglionose bei HD-Patienten entwickelt (Meier-Ruge *et al.* 2004). In der Literatur finden sich zudem Berichte von Patienten, bei denen trotz massiver Störungen der Darmmotilität keine (Tüysüz *et al.* 2009) oder nur extrem kurze aganglionäre Darmabschnitte vorgefunden wurden (Singh *et al.* 2004). Unter der so genannten Ultrashort-HD versteht man ein etwa 1 bis 3 cm langes aganglionäres Segment im distalen Rektum, wobei diese Fälle etwa 14% der insgesamt diagnostizierten HD-Fälle beim Menschen ausmachen (Meier-Ruge 1985).

In einem solchen Fall ist es leicht möglich, einen derart kurzen aganglionären Darmabschnitt zu übersehen, zumal sich die Ultrashort-HD im histopathologischen Bild von der klassischen HD unterscheidet (Meier-Ruge *et al.* 2004). Zur zweifelsfreien Diagnose sind spezielle histologische Schnitttechniken sowie eine enzymhistochemische Messung der

Acetylcholinesterase-Aktivität erforderlich (Meier-Ruge 1985). Die meisten Patienten mit Ultrashort-Aganglionose zeigen aber nach der Geburt einen normalen Mekoniumabgang und entwickeln klinische Symptome erst nach ca. 6 Lebensmonaten bzw. im Zuge der Umstellung von Milch auf feste Nahrung (Meier-Ruge *et al.* 2004). Allerdings wurde auch hier von Fällen berichtet, bei denen, analog zu den beiden hypopigmentierten Lämmern, bereits wenige Stunden *p.p.* erste schwerwiegende Symptome auftraten (Singh *et al.* 2004).

Mutationen im *EDNRB* bzw. dessen Liganden *EDN3*, verursachen bei Mäusen vor allem kurze aganglionäre Segmente, die auf das distale Colon beschränkt sind. Mutationen in anderen assoziierten Genen verursachen dagegen vermehrt längere aganglionäre Abschnitte (Baynash *et al.* 1994; Hosoda *et al.* 1994). Dies legt die Vermutung nahe, dass der Einfluss von *EDNRB* in erster Linie in späteren Stadien der neuronalen Zellmigration bei der Kolonisation des distalen Colons benötigt wird (Leibl *et al.* 1999; Sidebotham *et al.* 2002). Vor dem Hintergrund, dass es sich auch in dem hier aufgetretenen Fall um eine *EDNRB*-Deletion handelt, erscheint das Vorliegen einer solchen Ultrashort-HD möglich.

Auch eine fehlerhafte Ausdifferenzierung enterischer Neuronen kann zu einem Funktionsverlust im entsprechenden Zielgewebe und damit zu einer gestörten Motorik der betroffenen Segmente im Darm führen. Es wird angenommen, dass *EDN3/EDNRB* die Entwicklung und Differenzierung enterischer Neuronen aus den entsprechenden pluripotenten Vorläuferzellen inhibieren, bis sie den gesamten Darm kolonialisieren haben und an ihrem Zielgewebe angekommen sind. Möglicherweise führt eine verfrühte Ausdifferenzierung der Zellen dazu, dass Zellmigration und -proliferation in einem Stadium eingestellt werden, in dem die Besiedlung des entsprechenden Gewebes noch nicht vollständig

erfolgt ist (Hearn *et al.* 1998; Wu *et al.* 1999). Die Morphologie der Ganglien in den untersuchten Darmabschnitten war bei den betroffenen Lämmern jedoch ohne histopathologischen Befund. Dennoch wäre es möglich, dass Veränderungen vorlagen, die sich mit den hier verwendeten histologischen Methoden nicht darstellen lassen.

Auf molekulargenetischer Ebene können Mutationen im *EDNRB* in verschiedenen Formen und Ausmaßen auftreten und sind bei unterschiedlichen Spezies beschrieben (Hosoda *et al.* 1994; Attié *et al.* 1995; Gariepy *et al.* 1996; Metallinos *et al.* 1998). Dabei können selbst kleinere Veränderungen der codierenden Sequenz des Gens schwerwiegende Auswirkungen haben und zu Merkmalsträgern führen. Beim Pferd führt eine Punktmutation von 2 Nukleotiden im *EDNRB*-Gen zum Auftreten des Overo-Lethal-White-Foal-Syndroms. Die Mutation befindet sich im Exon 1 an Position 353 und 354 der cDNA und führt zum Austausch einer Aminosäure (Ile118Lys) (Metallinos *et al.* 1998; Santschi *et al.* 1998). Dieser Bereich der cDNA codiert für die erste Transmembrandomäne des Proteins und ist im Vergleich mit anderen Säugetierspezies hoch konserviert. Der Aminosäureaustausch von der hydrophoben Aminosäure Isoleucin zum polaren Lysin führt zu einer Konformationsänderung des Proteins und damit zum totalen Verlust an funktionellem Rezeptorprotein, da die Verankerung des Rezeptors in der Zellmembran bzw. Signaltransduktion und Ligandenbindungsvermögen gestört sind (Puffenberger *et al.* 1994a; Chakravarti 1996).

Dies verursacht in homozygoter Form weitreichende aganglionäre Segmente im Darm, während heterozygote Tiere keine pathologischen Veränderungen zeigen. Aufgrund dieses Fehlens myenterischer und submuköser

Ganglienzellen in distalen Teilen des Dünndarms bis hin zum Dickdarm, leiden homozygote Fohlen unter schwerwiegenden intestinalen Obstipationen. Die Tiere verenden wenige Tage *p.p.* an Darmverschluss (McCabe *et al.* 1990).

Auch beim Menschen wurden verschiedene Punktmutationen im *EDNRB* beschrieben. In einer Mennoniten Population verursacht eine G > T Transversion im Exon 4 des Gens einen Aminosäureaustausch Cys > Trp in der fünften Transmembrandomäne des Rezeptorproteins (Puffenberger *et al.* 1994). Dies führt mit unterschiedlicher Penetranz in homozygoter Form bei 71% und in heterozygoter Form bei 21% der Patienten zum Auftreten des HD und geht teilweise mit assoziierten Symptomen, wie Taubheit und weißen Stirnhaaren, einher (Puffenberger *et al.* 1994). Attié *et al.* (1995) berichteten weiterhin über eine rezessive C > G missense Mutation in Exon 2 des Gens, welche zu einem Aminosäureaustausch Ala > Gly in der dritten Transmembrandomäne des Proteins führt. 2 homozygot betroffene Kinder litten unter HD sowie Taubheit und Pigmentstörungen.

Die vorliegenden Studien zeigen, dass selbst kleine Mutationen im *EDNRB* gravierende Störungen hervorrufen können, wobei neben den beschriebenen Einzelnukleotidpolymorphismen in der Literatur auch Berichte weitreichender Mutationen existieren. Bei der Ratte führt eine 301 bp Deletion, die das gesamte 3`-Ende des Exon 1 sowie die ersten 44 bp des Intron 1 einschließt, zum so genannten *s/-*Phänotyp, der in homozygoter Form durch eine vollständig weiße Fellfarbe sowie weitreichende aganglionäre Darmabschnitte charakterisiert ist. Die Mutation stellt einen Letalfaktor dar (Ceccherini *et al.* 1995; Gariépy *et al.* 1996). Analog zum vorliegenden Fall der hypopigmentierten Lämmer, existieren zudem sowohl für die Maus als auch für

den Menschen Berichte über eine vollständige Deletion des *EDNRB*, was bei der Maus in homozygoter Form einen Letalfaktor darstellt (Hosoda *et al.* 1994), beim Menschen jedoch durch variable Penetranz charakterisiert ist (Tüysüz *et al.* 2009).

Die verschiedenen Fälle zeigen, dass die phänotypischen Auswirkungen einer Mutation nicht zwingend von deren Ausmaß abhängig sind. Vielmehr kann bereits eine Punktmutation in bestimmten codierenden Bereichen ähnliche Auswirkungen haben, wie der beschriebene Totalverlust des Gens.

Daneben spielen aber auch die Spezies sowie der Genotyp innerhalb einer Spezies, eine entscheidende Rolle für die phänotypische Penetranz. Dies bedeutet, dass die Folgen einer bestimmten Mutation zwischen verschiedenen Rassen oder Populationen ganz unterschiedlich ausfallen können. Bei der Ratte ergab die Introgression des ursprünglich im Stamm AGH nachgewiesenen *s/-* Genotyps in 2 andere Rattenstämme, dass gravierende Unterschiede in der Schwere der phänotypischen Auswirkungen zwischen den einzelnen Stämmen bestanden (Dang *et al.* 2011). Während die Mutation im ursprünglichen Stamm bei 80% der Jungtiere bereits bis zum Absetzen letal war, zeigten Tiere, die zwar homozygote Träger der gleichen Mutation waren, aber genetisch aus einem anderen Rattenstamm hervorgingen, in 60% der Fälle auch nach dem Absetzen keinerlei Anzeichen von Obstipationen oder verminderter Vitalität (Dang *et al.* 2011). Um zu erfahren, inwiefern auch beim Schaf die Rasse des entsprechenden Trägartiers den Phänotyp beeinflusst, müssten Kreuzungsversuche zur Introgression des Defektallels in andere Rassen durchgeführt werden.

Beim Menschen tritt das WS bzw. der HD gehäuft in Mennoniten Familien auf, die durch Heirat innerhalb der Familie einen relativ einheitlichen genetischen Hintergrund aufweisen (Puffenberger *et al.* 1994b). Hier zeigt sich, dass Mutationen im *EDNRB* auch unter Familienmitgliedern unterschiedliche pleiotrope Effekte haben können. HD, Taubheit und Pigmentstörungen treten sowohl in Kombination als auch isoliert auf, wobei die Penetranz in heterozygoten geringer als in homozygoten Individuen ist, aber in beiden Fällen mit 21% bzw. 74% unvollständig bleibt (Puffenberger *et al.* 1994). Für das Auftreten von HD respektive des Megacolons, existiert zudem eine eindeutige geschlechtsabhängige Penetranz, wobei grundsätzlich mehr männliche als weibliche Nachkommen von der Krankheit betroffen zu sein scheinen (Badner *et al.* 1990). Die unvollständige Penetranz ist möglicherweise dadurch begründet, dass Varianten in weiteren prädispositionierenden Genen an der Entstehung eines bestimmten Krankheitsbilds beteiligt sind. Assoziationsanalysen von Sequenzvarianten der Kandidatengene *PAX3* und *RET* lieferten mit den beschriebenen *EDNRB*-Mutationen jedoch keine Zusammenhänge (Attié *et al.* 1995).

Im hier vorliegenden Fall, kann aufgrund des hohen Homozygotiegrades der Herde an den in den in den Mikrosatellitenanalysen untersuchten Genorten und der kaum vorhandenen Variabilität im Phänotyp der 5 betroffenen Lämmer, von einem monogenen Erbgang ausgegangen werden.

Zu Beginn der Untersuchungen war es nicht möglich, Anlageträger der Mutation von gesunden Tieren zu unterscheiden, da sich bei beiden Genotypen *EDNRB*-Fragmente amplifizieren ließen. Deshalb wurden mittels der qPCR CNV ermittelt und der Quotient an errechneter Templatmenge zwischen *EDNRB*

und dem Vergleichsgen *SLAIN1* bestimmt. Der Erwartungswert für die Ergebnisse lag in diesem Fall bei 1 für homozygot gesunde Tiere, da bei diesen für beide Gene eine Templatemenge im gleichen Verhältnis vorliegen sollte. Für die Muttertiere der Merkmalsträger und für weitere, mit den betroffenen Lämmern verwandte Herdenmitglieder, wurde Heterozygotie für die zu diesem Zeitpunkt vermutete *EDNRB*-Deletion angenommen, wodurch der Erwartungswert für den Quotienten bei 0,5 lag. Bei diesen Tieren sollte demnach das *SLAIN1*-Gen auf beiden Chromosomen und das *EDNRB*-Gen nur auf einem Chromosom vorhanden sein. Die Ergebnisse zeigten, dass die Methode einen relativ genauen Anhaltspunkt zur Identifikation von Anlageträgern liefert, ohne das genaue Ausmaß der vorliegenden Deletion auf Sequenzebene zu kennen.

Allerdings zeigte sich, dass die Ergebnisse der qPCR eine gewisse Variabilität aufwiesen, wodurch einzelne Tiere, trotz wiederholter Messungen, nicht zweifelsfrei einem Genotyp zugeordnet werden konnten. Daher wurde, nachdem die molekulargenetischen Untersuchungen der flankierenden Bereiche des Gens die genaue Lokalisation der vorliegenden Deletion aufgedeckt hatten, zusätzlich eine Duplex-PCR zur sicheren und einfachen Identifikation von Anlageträgern etabliert. Hierdurch war es letztlich möglich, alle Anlageträger der Herde zweifelsfrei zu identifizieren. Dabei zeigte sich, dass mit 13 positiv getesteten Tieren nahezu die Hälfte der Herdenmitglieder Träger des Gendefekts waren. Durch ein sehr hohes Maß an Inzucht wurde das Defektallel in der Herde stark verbreitet.

Vermutlich handelt es sich um eine Mutation, die spontan bei einem Tier aufgetreten ist, aber keine größere Verbreitung in andere Herden erfahren hat.

In einer Stichprobe von 127 Tieren in 7 verschiedenen Kamerunherden konnten jedenfalls keine weiteren Trägertiere identifiziert werden. In jeder der beprobten Herden befand sich neben den typischen einfarbigen auch eine gewisse Anzahl an gescheckten Kamerunschafen. Die untersuchten Herden boten somit auch die Möglichkeit, einen eventuell bestehenden Zusammenhang zwischen Scheckung und dem Auftreten von Pigmentierungssyndromen herzustellen, da auch beim Pferd (Metallinos *et al.* 1998; Santschi *et al.* 1998), bei Ratte und Maus (Ceccherini *et al.* 1995; Hosoda *et al.* 1994) sowie beim Kaninchen (Fontanesi *et al.* 2010) entsprechende Zusammenhänge nachgewiesen wurden. Unter den gescheckten Tieren befanden sich jedoch keine Träger der *EDNRB*-Mutation. Auch die tatsächlich heterozygot getesteten Tiere aus der betroffenen Herde wiesen keine oder nur kleinere gescheckte Areale auf. Zudem könnte das Auftreten von Scheckung bei diesen Schafen ebenso durch die weiter zurückliegende Einkreuzung eines weißen Bergschafs bedingt sein. Die identifizierte *ENDRB*-Mutation ist folglich, im Gegensatz zu *ENDRB*-Varianten in anderen Spezies, nicht mit dem Auftreten von Scheckung assoziiert und es existieren keine offensichtlichen phänotypischen Merkmale, die zur Identifizierung von Anlageträgern verwendet werden können. Des Weiteren sind in den in die Untersuchung einbezogenen Kamerunschaf-Zuchtherden, nach Anpaarung von gescheckten Tieren, keine Lämmer mit entsprechenden Störungen beobachtet worden.

Die zytogenetischen Untersuchungen konnten das Ergebnis der molekulargenetischen Analysen bestätigen. Demnach liegt bei den betroffenen Tieren eine chromosomale Mikrodeletion der Bande 10q22 vor, wodurch auf dem betroffenen Chromosom die komplementäre Sequenz für den als

Hybridisierungssonde verwendeten BAC-Klon fehlt. Das *EDNRB*-Gen wurde beim Menschen auf dem homologen Chromosom 13q22 kartiert (Arai *et al.* 1993) und es existieren umfangreiche Fallstudien, welche einen klaren Zusammenhang zwischen 13q22-Deletionen und dem Auftreten von HD bzw. dem WS aufzeigen (Lamont *et al.* 1989; Shanske *et al.* 2001; Tüysüz *et al.* 2009). Für die Nutztiere, speziell das Schaf, ist diese Arbeit der erste Bericht über eine chromosomale Mikrodeletion im Bereich von 10q22, die nachweislich zum Auftreten eines Hypopigmentierungssyndroms führt.

Der hier betroffene Bereich scheint relativ anfällig für derartige Mutationen zu sein und wurde in einer Studie von Nicodemo *et al.* (2008) als so genannter fragiler Bereich identifiziert. Fragile Bereiche sind erbliche Stellen im Chromosom, die in Folge bestimmter Stressfaktoren während der Replikation zu lückenhafter Replikation bzw. zu Strangbrüchen neigen. Diese werden *in vitro* durch spezifische Zellkulturbedingungen induziert. Sie sind ein häufiger Ausgangspunkt für das Entstehen von Mutationen, wie Translokationen und Deletionen (Nicodemo *et al.* 2008). Bis heute wurden beim Menschen über 120 solcher fragilen Stellen gefunden, die jedoch in der Häufigkeit ihres Auftretens variieren (Lukusa und Fryns 2008). Man unterscheidet zwischen häufigen und seltenen fragilen Bereichen, wobei erstere einen charakteristischen Teil des normalen Chromosoms darstellen und letztere nur in einer Frequenz von unter 5% in der Bevölkerung zu finden sind (Sutherland und Richards 1995). Ein bekanntes Beispiel für einen seltenen fragilen Bereich ist das so genannte Fragile-X-Syndrom, bei dem eine Mutation des *FMR1*(*fragile X mental retardation 1*)-Gens auf dem X-Chromosom zu kognitiven Behinderungen führt (Lubs 1969; Verkerk *et al.* 1991). Beim Wiederkäuer wurden solche fragilen

Bereiche bislang beim Rind (*Bos taurus*) und beim Wasserbüffel (*Bubalus bubalis*) untersucht (Rodriguez *et al.* 2002; Nicodemo *et al.* 2008). Hierbei wurden beim Rind 30 und beim Wasserbüffel 51 solcher fragilen Bereiche detektiert, wobei sich auch beim Wasserbüffel ein solcher Bereich in direkter Nachbarschaft des *EDNRB* befindet. Leider existieren beim Schaf bislang keine derartigen Untersuchungen. Es wäre aber prinzipiell möglich, dass auch im vorliegenden Fall ein fragiler Bereich zur Entstehung der gefundenen Deletion beigetragen hat. Die Detektion derartiger fragiler Bereiche beim Schaf könnte Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

## 6 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, auf molekular- und zytogenetischer Ebene, die Ursache für das Auftreten eines mit Hypopigmentierung assoziierten Letalfaktors in einer Kamerunschafherde aufzuklären. Die insgesamt 5 betroffenen Lämmer wurden fast weiß geboren, zeigten nach relativ kurzer Zeit Anzeichen intestinaler Obstruktion und starben wenig später. Zwei dieser Lämmer standen für eine Obduktion zur Verfügung. Diese ergab eine beträchtliche Dilatation des Cecums, außerdem befand sich noch Mekonium im Enddarm. Die histopathologische Untersuchung von Proben aus verschiedenen Darmabschnitten zeigte morphologisch normale Ganglienzellen in ausreichender Anzahl und Verteilung.

DNA-Proben von 2 Merkmalsträgern und von mit ihnen verwandten und nicht verwandten Tieren aus der betroffenen Herde, wurden molekulargenetisch auf Mutationen im Kandidatengen *EDNRB* untersucht. Die PCR-Amplifikation der codierenden Bereiche des Gens ergab zunächst, dass bei den beiden Merkmalsträgern offensichtlich entsprechende Bindungsstellen für die verwendeten Primer fehlten, während bei allen anderen Herdenmitgliedern alle codierenden Bereiche mittels PCR erfolgreich amplifiziert werden konnten. Weitere Analysen der flankierenden Sequenzbereiche des Gens ergaben, dass die Merkmalsträger homozygot für eine 110 kb große Deletion auf dem Chromosom 10 sind, die das gesamte *EDNRB*-Gen mit einschließt.

Für die vorliegende Mutation wurde weiterhin ein Gentest auf Basis einer Duplex-PCR entwickelt, der es erlaubt, anlagefreie Tiere von Anlagetägern

sicher zu differenzieren. Die Analyse aller Proben mit diesem Test ergab, dass alle Mutterschafe, die einen Merkmalsträger geboren hatten, heterozygot für die Deletion waren. Insgesamt war fast die Hälfte der Schafe aus der betroffenen Herde Anlageträger der Mutation. Mit dem Gentest wurden 127 weitere Kamerunschafe aus insgesamt 7 Herden auf das Vorhandensein der Mutation getestet. Dabei konnten keine weiteren Anlageträger der Mutation identifiziert werden, so dass man davon ausgehen kann, dass sich der Defekt auf die betroffene Familie beschränkt und nicht weiter in der Kamerunpopulation verbreitet wurde.

Auch auf zytogenetischer Ebene konnten die Ergebnisse der molekulargenetischen Untersuchungen mit Hilfe der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung bestätigt werden.

Mutationen im *EDNRB*-Gen sind bereits bei verschiedenen anderen Spezies im Zusammenhang mit dem Auftreten von Hypopigmentierungssyndromen beschrieben worden. In dieser Arbeit konnte ein derartiger genetischer Defekt zum ersten Mal bei einer Nutztierspezies, dem Schaf, beschrieben und sowohl molekulargenetisch als auch zytogenetisch aufgeklärt werden.

## 7 Summary

The aim of this study was to characterize from a molecular- and cytogenetic point of view the cause of the incidence of a hypopigmentation associated, lethal disease occurring in a flock of Cameroon sheep. Altogether 5 affected lambs were born showing a hypopigmented phenotype and signs of intestinal obstruction. The lambs died within a short time after birth. Two lambs were available for post mortem examination and showed a notable dilated cecum and remaining meconium. Histopathological examination of intestinal samples showed morphologically normal ganglion cells in appropriate number and distribution.

DNA samples of the 2 affected lambs, relatives, and unrelated control sheep were used to screen the candidate gene *EDNRB* for mutations. PCR amplification of the coding areas of the gene revealed that in the affected animals the complementary primer binding sites were missing. Despite of this, all tested *EDNRB* fragments were successfully amplified, using DNA samples of unaffected flock mates. Further analyses of the flanking sequences of the *EDNRB* showed that the affected lambs were homozygous carriers of a 110 bp deletion on chromosome 10, including the entire *EDNRB* gene.

A duplex PCR was established as a reliable test to recognize carriers of the mutation and to distinguish between heterozygous carriers and non-affected animals. The duplex PCR test elicited that the affected lambs were homozygous for the mutation, while all ewes that had born an affected lamb were heterozygous. Altogether, almost half of the animals in the affected flock were

heterozygous carriers of the mutation. Using the duplex PCR, 127 additional Cameroon sheep were tested in 7 different flocks. No additional carriers of the mutation were identified. Due to these findings, it seems obvious that the incidence of the mutation is restricted to a single affected family. Hence, it can be assumed that the mutation was not widespread in the Cameroon sheep population.

The results of the molecular genetic analyses were also confirmed from a cytogenetic point of view, using fluorescence in situ hybridization.

Mutations in *EDNRB* have been described in other species in context to the occurrence of hypopigmentation syndromes. This is the first described case of a hypopigmentation syndrome in sheep and in farm animals in general, which was clarified from a molecular genetic and cytogenetic point of view.

## 8 Literaturverzeichnis

- Arai, H.; Hori, S.; Aramori, I.; Ohkubo, H.; Nakanishi, S.** (1990): Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature* 348, 730–732.
- Arai, H.; Nakao, K.; Takaya, K.; Hosoda, K.; Ogawa, Y.; Nakanishi, S.; Imura, H.** (1993): The human endothelin-B receptor gene. Structural organization and chromosomal assignment. *Journal of Biological Chemistry* 268, 3463–3470.
- Attié, T.; Till, M.; Pelet, A.; Amiel, J.; Edery, P.; Boutrand, L.** (1995): Mutation of the endothelin-receptor B gene in Waardenburg-Hirschsprung disease. *Human Molecular Genetics* 4, 2407–2409.
- Bax, W. A.; Aghai, Z.; van Tricht, C. L.; Wassenaar, C.; Saxena, P. R.** (1994): Different endothelin receptors involved in endothelin-1- and sarafotoxin S6B-induced contractions of the human isolated coronary artery. *British Journal of Pharmacology* 113, 1471–1479.
- Baynash, A. G.; Hosoda, K.; Giaid, A.; Richardson, J. A.; Emoto, N.; Hammer, R. E.; Yanagisawa, M.** (1994): Interaction of endothelin-3 with endothelin-B receptor is essential for development of epidermal melanocytes and enteric neurons. *Cell* 79, 1277–1285.
- Bolande, R. P.** (1974): The neurocristopathies: A unifying concept of disease arising in neural crest maldevelopment. *Human Pathology* 5, 409–429.
- Brownstein, M. J.; Carpten, J. D.; Smith, J. R.** (1996): Modulation of non-templated nucleotide addition by Taq DNA polymerase: primer modifications that facilitate genotyping. *Biospectrum* 20, 1004-6, 1008-10.
- Bruder, E.; Meier-Ruge, W. A.** (2007): Hypoganglionose als Ursache chronischer Obstipation. *Der Pathologe* 28, 131–136.
- Calloni, G. W.; Glavieux-Pardanaud, C.; Le Douarin, N. M.; Dupin, E.** (2007): Sonic Hedgehog promotes the development of multipotent neural crest progenitors endowed with both mesenchymal and neural potentials. *Proceedings of the National Academy of Science* 104, 19879–19884.

- Calloni, G. W.; Le Douarin, N. M.; Dupin, E.** (2009): High frequency of cephalic neural crest cells shows coexistence of neurogenic, melanogenic, and osteogenic differentiation capacities. *Proceedings of the National Academy of Science* 106, 8947–8952.
- Ceccherini, I.; Zhang, A. L.; Matera, I.; Yang, G.; Devoto, M.; Romeo, G.; Cass, D. T.** (1995): Interstitial deletion of the Endothelin-B receptor gene in the spotting lethal (sl) rat. *Human Molecular Genetics* 4, 2089–2096.
- Chakravarti, A.** (1996): Endothelin receptor-mediated signaling in Hirschsprung Disease. *Human Molecular Genetics* 5, 303–307.
- Chamberlain, J. S.; Gibbs, R. A.; Rainer, J. E.; Nguyen, P. N.; Thomas, C.** (1988): Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Research* 16, 11141–11156.
- Church, D. M.; Goodstadt, L.; Hillier, L. W.; Zody, M. C.; Goldstein, S.; She, X.** (2009): Lineage-specific biology revealed by a finished genome assembly of the mouse. *PLoS Biology* 7, e1000112.
- Cohen, I. T.** (1982): Hirschsprung's disease in a kindred: a possible clue to the genetics of the disease. *Journal of Pediatric Surgery* 5, 632–634.
- Cribiu, E. P.; Di Bernardino, D.; Di Meo, G. P.; Eggen, A.; Gallagher, D. S.; Gustavsson, I.** (2001): International System for Chromosome Nomenclature of Domestic Bovids (ISCNDB 2000). *Cytogenetic and Genome Research* 92, 283–299.
- Dang, R.; Torigoe, D.; Suzuki, S.; Kikkawa, Y.; Moritoh, K.; Sasaki, N.; Agui, T.** (2011): Genetic Background Strongly Modifies the Severity of Symptoms of Hirschsprung Disease, but Not Hearing Loss in Rats Carrying Ednrb<sup>sl</sup> Mutations. *PLoS ONE* 6, e24086.
- Davenport, A. P.** (2002): International Union of Pharmacology. XXIX. Update on Endothelin Receptor Nomenclature. *Pharmacological Reviews* 54, 219–226.
- Dessinioti, C.; Stratigos, A. J.; Rigopoulos, D.; Katsambas, A. D.** (2009): A review of genetic disorders of hypopigmentation: lessons learned from the biology of melanocytes. *Experimental Dermatology* 18, 741–749.
- Di Meo, G. P.; Perucatti, A.; Floriot, S.; Hayes, H.; Schibler, L.; Rullo, R.** (2007): An advanced sheep (*Ovis aries*, 2n = 54) cytogenetic map and assignment of 88 new autosomal loci by fluorescence in situ hybridization and R-banding. *Animal Genetics* 38, 233–240.
- Dixon, R. A. F.; Kobilka, B. K.; Strader, D. J.; Benovic, J. L.; Dohlman, H. G.; Frielle, T.** (1986): Cloning of the gene and cDNA for mammalian [beta]-adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature* 321, 75–79.

- Dixon, R. A. F.; Sigal, I. S.; Candelore, M. R.** (1987): Structural features required for ligand binding to the B-adrenergic receptor. *The EMBO Journal* 6, 3269–3275.
- Ederý, P.; Attié, T.; Amiel, J.; Pelet, A.; Eng, C.; Hofstra, R. M.** (1996): Mutation of the endothelin-3 gene in the Waardenburg-Hirschsprung disease (Shah-Waardenburg syndrome). *Nature Genetics* 12, 442–444.
- Farhat, N.; Matouk, C. C.; Mamarbachi, A. M.; Marsden, P. A.; Allen, B. G.; Thorin, E.** (2008): Activation of ETB receptors regulates the abundance of ET-1 mRNA in vascular endothelial cells. *British Journal of Pharmacology* 153, 1420–1431.
- Fontanesi, L.; Vargiolu, M.; Scotti, E.; Mazzoni, M.; Clavenzani, P.; Giorgio, R.** (2010): Endothelin receptor B (EDNRB) is not the causative gene of the English spotting locus in the domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Animal Genetics* 41, 669–670.
- Gariépy, C. E.; Cass, D. T.; Yanagisawa, M.** (1996): Null mutation of endothelin receptor type B gene in spotting lethal rats causes aganglionic megacolon and white coat color. *Human Pathology* 93, 867–872.
- Geissler, E. N.; Russell, E. S.** (1983): Analysis of the hematopoietic effects of new dominant spotting (*W*) mutations of the mouse. I. Influence upon hematopoietic stem cells. *Experimental Hematology* 11, 452–460.
- Geissler, E. N.; Ryan, M. A.; Housman, D. E.** (1988): The dominant-white spotting (*W*) locus of the mouse encodes the c-kit proto-oncogene. *Cell* 55, 185–192.
- Gibbs, R. A.; Weinstock, G. M.; Metzker, M. L.; Muzny, D. M.; Sodergren, E. J.; Scherer, S.** (2004): Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature* 428, 493–521.
- Haynes, W. G.; Ferro, C. J.; O’Kane, K. P. J.; Somerville, D.; Lomax, C. C.; Webb, D. J.** (1996): Systemic Endothelin Receptor Blockade Decreases Peripheral Vascular Resistance and Blood Pressure in Humans. *Circulation* 93, 1860–1870.
- Heanue, T. A.; Pachnis, V.** (2007): Enteric nervous system development and Hirschsprung's disease: advances in genetic and stem cell studies. *Nature Reviews Neuroscience* 8, 466–479.
- Hearn, C. J.; Murphy, M.; Newgreen, D.** (1998): GDNF and ET-3 Differentially Modulate the Numbers of Avian Enteric Neural Crest Cells and Enteric Neurons in Vitro. *Developmental Biology* 197, 93–105.

- Herbarth, B.; Pingault, V.; Bondurand, N.; Kuhlbrodt, K.; Hermans-Borgmeyer, I.; Puliti, A.** (1998): Mutation of the Sry-related SOX10 gene in dominant megacolon, a mouse model for human Hirschsprung disease. *Proceedings of the National Academy of Science* 95, 5161–5165.
- Hickey, K. A.; Rubanyi, G.; Paul, R. J.; Highsmith, R. F.** (1985): Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 248, 550–556.
- Hilbe, M.; Guscelli, F.; Wunderlin, S.; Ehrensperger, F.** (2005): Synaptophysin: an Immunohistochemical Marker for Animal Dysautonomias. *Journal of Comparative Pathology* 132, 223–227.
- Hosoda, K.; Hammer, R. E.; Richardson, J. A.; Baynash, A. G.; Cheung, J. C.; Giaid, A.; Yanagisawa, M.** (1994): Targeted and natural (piebald-lethal) mutations of endothelin-B receptor gene produce megacolon associated with spotted coat color in mice. *Cell* 79, 1267–1276.
- Hoth, C. F.; Milunsky, A.; Lipsky, N.; Sheffer, R.; Clarren, S. K.; Baldwin C. T.** (1993): Mutations in the Paired Domain of the Human PAX3 Gene Mutations in the Paired Domain of the Human PAX3 Gene cause Klein-Waardenburg Syndrome (WS-III) as well as Waardenburg Syndrome Type I (WS-I). *American Journal of Human Genetics* 52, 455–462.
- Hughes, A.** (1994): A gene for Waardenburg syndrome type 2 maps close to the human homologue of the microphthalmia gene at chromosome 3p12-p14.1. *Nature Genetics* 7, 509–512.
- Huisinga, M.; Henrich, M.; Frese, K.; Burkhardt, E.; Kuchelmeister, K.; Schmidt, M.; Reinacher, M.** (2008): Extraventricular Neurocytoma of the Spinal Cord in a Dog. *Veterinary Pathology Online* 45, 63–66.
- Iannuzzi, L.; Berardino, D.** (2008): Tools of the trade: diagnostics and research in domestic animal cytogenetics. *Journal of Applied Genetics* 49, 357–366.
- Iannuzzi, L.; Di Meo, G. P.; Perucatti, A.; Schibler, L.; Incarnato, D.; Gallagher, D. S.** (2003): The river buffalo (*Bubalus bubalis*, 2n = 50) cytogenetic map: assignment of 64 loci by fluorescence in situ hybridization and R-banding. *Cytogenetic and Genome Research* 102, 65–75.
- Iino, S.; Horiguchi, S.; Horiguchi, K.; Nojyo, Y.** (2007): Interstitial cells of Cajal in the gastrointestinal musculature of W mutant mice. *Archives of Histology and Cytology* 70, 163–173.
- Ikadai, H.; Fujita, H.; Agemasu, Y.** (1979): Observation of congenital aganglionosis rat (Hirschsprung's disease rat) and its genetical analysis. *Congenital Anomalies* 19, 31–36.

- Iwashita, T.; Kruger, G. M.; Pardal, R.; Kiel, M. J.; Morrison, S. J.** (2003): Hirschsprung Disease Is Linked to Defects in Neural Crest Stem Cell Function. *Science* 301, 972–976.
- Ji, T. H.; Grossmann, M.; Ji, I.** (1998): G Protein-coupled Receptors. *Journal of Biological Chemistry* 273, 17299–17302.
- Kashef, J.; Köhler, A.; Wedlich, D.** (2007): Die Routenplaner der Neuralleistenzellen. *Biospectrum* 13, 242-245.
- Keen, J. A.; Hillier, C.; McGorum, B. C.; Nally, J. E.** (2008): Endothelin mediated contraction of equine laminar veins. *Equine veterinary journal* 40, 488–492.
- Khimji, A.; Rockey, D. C.** (2010): Endothelin—Biology and disease. *Cellular Signalling* 22, 1615–1625.
- Kisanuki, Y. Y.; Emoto, N.; Ohuchi, T.; Widyantoro, B.; Yagi, K.; Nakayama, K.** (2010): Low blood pressure in endothelial cell-specific endothelin 1 knockout mice. *Hypertension* 56, 121–128.
- Kozuka, M.; Ito, T.; Hirose, S.; Lodhi, K. M.; Hagiwara, H.** (1991): Purification and characterization of bovine lung endothelin receptor. *Journal of Biological Chemistry* 266, 16892–16896.
- Kunieda, T.** (1996): A Mutation in Endothelin-B Receptor Gene Causes Myenteric Aganglionosis and Coat Color Spotting in Rats. *DNA Research* 3, 101–105.
- Lahav, R.; Ziller, C.; Dupin, E.; Le Douarin, N. M.** (1996): Endothelin 3 promotes neural crest cell proliferation and mediates a vast increase in melanocyte number in culture. *Proceedings of the National Academy of Science* 93, 3892–3897.
- Lane, P. W.; Liu, H. M.** (1984): Association of megacolon with a new dominant spotting gene (dom) in the mouse. *Journal of Heredity* 75, 435–439.
- Le Douarin, N. M.; Teillet, M. A.** (1973): The migration of neural crest cells to the wall of the digestive tract in avian embryo. *Journal of Embryologie and Experimental Morphologie* 30, 31–48.
- Leibl, M. A.; Ota, T.; Woodward, M. N.; Kenny, S. E.; Lloyd, D. A.; Vaillant, C. R.; Edgar, D. H.** (1999): Expression of endothelin 3 by mesenchymal cells of embryonic mouse caecum. *Gut* 44, 246–252.
- Lin, J. Y.; Fisher, D. E.** (2007): Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature* 445, 843–850.
- Liu, R.; Pavan, W. J.; Choe, S.; Ceradini, D.; Martin, S. R.; Horuk, R.; MacDonald, M. E.; Stuhlmann, H.; Koup, R. A.; Landau, N. R.** (1996): Homozygous Defect in HIV-1 Coreceptor Accounts for Resistance of Some Multiply-Exposed Individuals to HIV-1 Infection. *Cell* 86, 367–377.

- Lubs, H. A.** (1969): A Marker X Chromosome. *American Journal of Human Genetics* 21, 231–244.
- Lühken, G. (2012)**: Genetic testing for phenotype-causing variants in sheep and goats. *Molecular and Cellular Probes* 7, 231–237.
- Lukusa, T.; Fryns, J. P.** (2008): Human chromosome fragility. *Biochimica et Biophysica Acta-Gene Regulatory Mechanisms* 1779, 3–16.
- Mackenzie, M. A.; Jordan, S. A.; Budd, P. S.; Jackson, I. J.** (1997): Activation of the Receptor Tyrosine Kinase Kit Is Required for the Proliferation of Melanoblasts in the Mouse Embryo. *Developmental Biology* 192, 99–107.
- Martucciello, G.; Luinetti, O.; Romano, P.; Magrini, U.** (2007): Molekularbiologie, Grundlagenforschung und Diagnose des Morbus Hirschsprung. *Der Pathologe* 28, 119–124.
- Masaki, T.** (1998): The discovery of endothelins. *Cardiovascular Research* 39, 530–533.
- Matsushima, Y.; Shinkai, Y.; Kobayashi, Y.; Sakamoto, M.; Kunieda, T.; Tachibana, M.** (2002): A mouse model of Waardenburg syndrome type 4 with a new spontaneous mutation of the endothelin-B receptor gene. *Mammalian Genome* 13, 30–35.
- McCabe, L.; Griffin, L.; Kinzer, A.; Chandler, M.; Beckwith, J.** (1990): Overo lethal white foal syndrome: equine model of aganglionic megacolon (Hirschsprung Disease). *American Journal of Medical Genetics* 36, 336–340.
- Mccallion, A. S.; Chakravarti, A.** (2001): EDNRB/EDN3 and Hirschsprung Disease Type II. *Pigment Cell Research* 14, 161–169.
- Meier-Ruge, W. A.** (1985): Der ultrakurze Morbus Hirschsprung Ein bioptisch zuverlässig objektivierbares Krankheitsbild. *European Journal of Pediatric Surgery* 40, 146–150.
- Meier-Ruge, W. A.; Bruder, E.; Holschneider, A. M.; Lochbühler, H.; Piket, G.; Posselt, H. G.; Tewes, G.** (2004): Diagnosis and Therapy of Ultrashort Hirschsprung's Disease. *European Journal of Pediatric Surgery* 14, 392–397.
- Meier-Ruge, W. A.; Lutterbeck, P. M.; Herzog, B.; Morger, R.** (1972): Acetylcholinesterase Activity in Suction Biopsies of the Rectum in the Diagnosis of Hirschsprung's Disease. *Journal of Pediatric Surgery* 7, 11–17.
- Metallinos, D. L.; Bowling, A. T.; Rine, J.** (1998): A missense mutation in the endothelin-B receptor gene is associated with Lethal White Foal Syndrome: an equine version of Hirschsprung Disease. *Mammalian Genome* 9, 426–431.

- Metallinos, D. L.; Oppenheimer, A. J.; Rinchik, E. M.; Russell, L. B.; Dietrich, W.; Tilghman, S. M.** (1994): Fine structure mapping and deletion analysis of the murine piebald locus. *Genetics* 136, 217–223.
- Montgomery, G. W.; Sise, J. A.** (1990): TitleExtraction of DNA from sheep white blood cells. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 33, 437–441.
- Nathans, J.; Hogness, D. S.** (1983): Isolation, sequence analysis, and intron-exon arrangement of the gene encoding bovine rhodopsin. *Cell* 34, 807–814.
- Nicodemo, D.; Coppola, G.; Pauciullo, A.; Cosenza, G.; Ramunno, L.; Ciotola, F.; Peretti, V.; Di Meo, G. P.; Iannuzzi, L.; Rubes, J.; Di Berardino, D.** (2008): Chromosomal expression and localization of aphidicolin-induced fragile sites in the standard karyotype of river buffalo (*Bubalus bubalis*). *Cytogenetic and Genome Research* 120, 178–182.
- Nicoloso, L.; Negrini, R.; Ajmone-Marsan, P.; Crepaldi, P.** (2012): On the way to functional agro biodiversity: coat colour gene variability in goats. *Animal* 6, 41–49.
- Ogawa, Y.; Nakao, K.; Arai, H.; Nakagawa, O.; Hosoda, K.; Suga, S.; Nakanishi, S.; Imura, H.** (1991): Molecular cloning of a non-isopeptide-selective human endothelin receptor. *Biochemical and biophysical research communications* 178, 248–255.
- Ogawa, Y.; Nakao, K.; Arai, H.; Nakagawa, O.; Hosoda, K.; Suga, S.; Nakanishi, S.; Imura, H.** (2006): A Deletion in the Endothelin-B Receptor Gene is Responsible for the Waardenburg Syndrome-Like Phenotypes of WS4 Mice. *Experimental Animals* 55, 491–495.
- Pauciullo, A.; Nicodemo, D.; Cosenza, G.; Peretti, V.; Di Meo, G. P.; Ramunno, L.; Iannuzzi, L.; Rubes, J.; Di Berardino, D.** (2012): Similar rates of chromosomal aberrant secondary oocytes in two indigenous cattle (*Bos taurus*) breeds as determined by dual-color FISH. *Theriogenology* 77, 675–683.
- Pingault, V.; Bondurand, N.; Kuhlbrodt, K.; Goerich, D. E.; Préhu, M.-O.; Puliti, A.** (1998): SOX10 mutations in patients with Waardenburg-Hirschsprung disease. *Nature Genetics* 18, 171–173.
- Pingault, V.; Ente, D.; Dastot-Le Moal, F.; Goossens, M.; Marlin, S.; Bondurand, N.** (2010): Review and update of mutations causing Waardenburg syndrome. *Human Mutation* 31, 391–406.

- Puffenberger, E.; Hosoda, K.; Washington, S.; Nakao, K.; deWit, D.; Yanagisawa, M.; Chakravarti, A.** (1994a): A missense mutation of the endothelin-B receptor gene in multigenic hirschsprung's disease. *Cell* 79, 1257–1266.
- Puffenberger, E.; Kauffman, E.; Bolk, S.; Matise, T.; Washington, S.; Angrist, M.; Weissenbach, J.; Garver, K. L.; Mascari, M.; Ladda, R.; Slaugenhaupt, S.; Chakravarti, A.** (1994b): Identity-by-descent and association mapping of a recessive gene for Hirschsprung disease on human chromosome 13q22. *Human Molecular Genetics* 3, 1217–1225.
- Read, A. P.; Newton, V. E.** (1997): Waardenburg syndrome. *Journal of Medical Genetics* 34, 656–665.
- Rigby, P. W. J.; Dieckmann, M.; Rhodes, C.; Berg, P.** (1977): Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *Journal of Molecular Biology* 113, 237–251.
- Ro, S.; Park, C.; Jin, J.; Zheng, H.; Blair, P. J.; Redelman, D.; Ward, S. M.; Yan, W.; Sanders, K. M.** (2010): A Model to Study the Phenotypic Changes of Interstitial Cells of Cajal in Gastrointestinal Diseases. *Gastroenterology* 138, 1068–1078.e2.
- Rodriguez, V.; Llambi, S.; Postiglioni, A.; Guevara, K.; Rincon, G.; Fernandez, G.; Mernies, B.; Arruga, M.** (2002): Localisation of aphidicolin-induced break points in Holstein-Friesian cattle (*Bos taurus*) using RBG-banding. *Genetics Selection Evolution* 34, 649–656.
- Saiki, R. K.; Scharf, S.; Faloona, F.; Mullis, K. B.** (1985): Enzymatic Amplification of Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. *Science* 230, 1350–1354.
- Saito, Y.; Mizuno, T.; Itakura, M.; Suzuki, Y.; Ito, T.; Hagiwara, H.; Hirose, S.** (1991): Primary structure of bovine endothelin ETB receptor and identification of signal peptidase and metal proteinase cleavage sites. *Journal of Biological Chemistry* 266, 23433–23437.
- Sakurai, T.; Yanagisawa, M.; Takuwat, Y.; Miyazakit, H.; Kimura, S.; Goto, K.; Masaki, T.** (1990): Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature* 348, 732–735.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T.** (1989): Molecular cloning- a laboratory manual. *Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York*.
- Sandhu, H.; Xu, C. B.; Edvinsson, L.** (2010): Upregulation of contractile endothelin type B receptors by lipid-soluble cigarette smoking particles in rat cerebral arteries via activation of MAPK. *Toxicology and applied pharmacology* 249, 25–32.

- Santschi, E.; Purdy, A.; Valberg, S.; Vrotsos, P.; Kaese, H.; Mickelson, J.** (1998): Endothelin receptor B polymorphism associated with lethal white foal syndrome in horses. *Mammalian Genome* 9, 306–309.
- Schemann, M.; Neunlist, M.** (2004): The human enteric nervous system. *Neurogastroenterology & Motility* 16, 55–59.
- Schläpfer, J.; Gallagher, D. S.; Burzlaff, J. D.; Davis, S. K.; Taylor, J. F.; Womack, J.** (1997): Physical mapping of the endothelin receptor type B to bovine chromosome 12. *Mammalian Genome* 8, 380–381.
- Schwartz, M.; Zlotorynski, E.; Kerem, B.** (2006): The molecular basis of common and rare fragile sites. *Cancer Letters* 232, 13–26.
- Shimada, K.; Takahashi, M.; Tanzawa, K.** (1994): Cloning and functional expression of endothelin-converting enzyme from rat endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry* 269, 18275–18278.
- Sidebotham, E. L.; Woodward, M. N.; Kenny, S. E.; Lloyd, D. A.; Vaillant, C. R.; Edgar, D. H.** (2002): Localization and endothelin-3 dependence of stem cells of the enteric nervous system in the embryonic colon. *Journal of Pediatric Surgery* 37, 145–150.
- Silvers, W. K.** (1979): *The Coat Colors of Mice. A Model for Mammalian Gene Action and Interaction*: Springer Verlag, New York.
- Singh, S. J.; Arbuckle, S.; Little, D.; Manglick, M. P.; Cass, D.** (2004): Mortality due to constipation and short-segment Hirschsprung's disease. *Pediatric Surgery International* 11–12, 889–891.
- Southard-Smith, E. M.; Kos, L.; Pavan, W. J.** (1998): SOX10 mutation disrupts neural crest development in Dom Hirschsprung mouse model. *Nature Genetics* 18, 60–64.
- Steel, K. P.; Barkway, C.** (1989): Another role for melanocytes: their importance for normal stria vascularis development in the mammalian inner ear. *Development* 107, 453–463.
- Sutherland, G. R.; Richards, Robert I.** (1995): The molecular basis of fragile sites in human chromosomes. *Current Opinion in Genetics & Development* 5, 323–327.
- Tachibana, M.; Hara, Y.; Vyas, D.; Hodgkinson, C.; Fex, J.; Grundfast, K.; Arnheiter, H.** (1992): Cochlear disorder associated with melanocyte anomaly in mice with a transgenic insertional mutation. *Molecular and Cellular Neuroscience* 3, 433–445.
- Tassabehji, M.; Newton, V. E.; Read, A. P.** (1994): Waardenburg syndrome type 2 caused by mutations in the human microphthalmia (MITF) gene. *Nature Genetics* 8, 251–255.

- Tassabehji, M.; Read, A. P.; Newton, V. E.; Harris, R.; Balling, R.; Gruss, P.; Strachan, T.** (1992): Waardenburg's syndrome patients have mutations in the human homologue of the PAX3- paired box gene. *Nature* 355, 635–636.
- Tsukahara, H.; Ende, H.; Magazine, H. I.; Bahou, W. F.; Goligorsky, M. S.** (1994): Molecular and functional characterization of the non-isopeptide-selective ETB receptor in endothelial cells. Receptor coupling to nitric oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry* 269, 21778–21785.
- Tüysüz, B.; Collin, A.; Arapoğlu, M.; Suyugül, N.** (2009): Clinical variability of Waardenburg–Shah syndrome in patients with proximal 13q deletion syndrome including the endothelin-B receptor locus. *American Journal of Human Genetics* 149, 2290–2295.
- Ullmann, A.; Jacob, F.; Monod, J.** (1967): Characterization by in vitro complementation of a peptide corresponding to an operator-proximal segment of the  $\beta$ -galactosidase structural gene of *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* 24, 339–343.
- Verheij, J. B. G. M.; Kunze, J.; Osinga, J.; van Essen, A. J.; Hofstra, R. M.** (2002): ABCD syndrome is caused by a homozygous mutation in the EDNRB gene. *American Journal of Human Genetics* 108, 223–225.
- Verkerk, A. J. M. H.; Pieretti, M.; Sutcliffe, J. S.; Fu, Y.-H.; Kuhl, D. P. A.; Pizzuti, A.; Reiner, O.; Richards, S.; Victoria, M. F.; Zhang, F.; Eussen, B. E.; van Ommen, G.-J. B.; Blonden, L. A. J.; Riggins, G. J.; Chastain, J. L.; Kunst, C. B.; Galjaard, H.; Thomas Caskey, C.; Nelson, D. L.; Oostra, B. A.; Warren, S. T.** (1991): Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell* 65, 905–914.
- Vogelstein, B.; Gillespie, D.** (1979): Preparative and analytical purification of DNA from Agarose. *Proceedings of the National Academy of Science* 76, 615–619.
- Ward, S. M.; Sanders, K. M.** (2006): Involvement of intramuscular interstitial cells of Cajal in neuroeffector transmission in the gastrointestinal tract. *The Journal of Physiology* 576, 675–682.
- Wilson, J. L.; Taylor, L.; Polgar, P.** (2012): Endothelin-1 activation of ETB receptors leads to a reduced cellular proliferative rate and an increased cellular footprint. *Experimental Cell Research* 318, 1125–1133.
- Wu, J. J.; Chen, J. X.; Rothman, T. P.; Gershon, M. D.** (1999): Inhibition of in vitro enteric neuronal development by endothelin-3: mediation by endothelin B receptors. *Development* 126, 1161–1173.

- Xu, D.; Emoto, N.; Giaid, A.; Slaughter, C.; Kaw, S.; deWit, D.; Yanagisawa, M.** (1994): ECE-1: A membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1. *Cell* 78, 473–485.
- Yada, Y.; Higuchi, K.; Imokawa, G.** (1991): Effects of endothelins on signal transduction and proliferation in human melanocytes. *Journal of Biological Chemistry* 266, 18352–18357.
- Yamada, T** (2006): Reduced Expression of the Endothelin Receptor Type B Gene in Piebald Mice Caused by Insertion of a Retroposon-like Element in Intron 1. *Journal of Biological Chemistry* 281, 10799–10807.
- Yan, G. C.; Croaker, D.; Zhang, A. L.; Manglick, P.; Cartmill, T.; Cass, D.** (1998): A Dinucleotide Mutation in the Endothelin-B Receptor Gene Is Associated with Lethal White Foal Syndrome (LWFS); A Horse Variant of Hirschsprung Disease (HSCR). *Human Molecular Genetics* 7, 1047–1052.
- Yanagisawa, M.; Kurihara, H.; Kimura, S.; Tomobe, Y.; Kobayashi, M.; Mitsui, Y.; Yazaki, Y.; Goto, K.; Masaki, T.** (1988): A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332, 411–415.
- Zhang, X.-N.; Zhou, M.-N.; Qiu, Y.-Q.; Ding, S.-P.; Qi, M.; Li, J.-C** (2007): Genetic Analysis of RET, EDNRB, and EDN3 Genes and Three SNPs in MCS + 9.7 in Chinese Patients with Isolated Hirschsprung Disease. *Biochemical Genetics* 45, 523–527.
- Zimin, A.; Delcher, A.; Florea, L.; Kelley, D.; Schatz, M.; Puiu, D.; Hanrahan, F.; Pertea, G.; Van Tassell, C. P.; Sonstegard, T. S.; Marcais, G.; Roberts, M.; Subramanian, P.; Yorke, J.; Salzberg, S.** (2009): A whole-genome assembly of the domestic cow, *Bos taurus*. *Genome Biology* 10, R42.

## 9 Anhang

Tabelle 1A: Verwendete Mikrosatellitenmarker für die Analyse flankierender Bereiche des *EDNRB*.

|                | Primersequenz (5`-3`)   | AT<br>°C | Primer<br>menge | Polymerase   | Mg <sup>2+</sup><br>Konz.                               |
|----------------|---|----------|-----------------|--|---|
| <b>OARVH58</b> | cagatctcctgcagccaagggac (F)<br>attaaagaaaaagaaagttaaatcagaacc (R)   | 56°C     | 0,13mM          | Qiagen<br>Multiplex<br>PCR<br>Mastermix <sup>1</sup> | Puffer<br>enthält<br>bis zu<br>3 mM<br>Mg <sup>2+</sup> |
| <b>TGLA441</b> | cacaactggtaaaatggcagtggcag (F)<br>ggccaagtcatctgaattataatatacag (R) |          |                 |  |   |
| <b>BMS975</b>  | tggagctaaatcaatgcctg (F)<br>cccaatggccaattaagtacc (R)               |          |                 |  |   |
| <b>CSR87</b>   | acaaagggcatgactgagcaacta (F)<br>ggagaggattcaagtcatcagta (R)         | 58°C     | 0,66 mM         | 5-Prime®<br>DNA-<br>Polymerase                       | Puffer<br>enthält<br>bis zu<br>2 mM<br>Mg <sup>2+</sup> |
| <b>MCM469A</b> | gtcatgtctgggaattgaagatga (F)<br>agttaacctgacgatgctctcca (R)         |          |                 |  |   |

Tabelle 2A: PCR-Bedingungen für die Fragmentlängenanalysen

| Multiplex 1 | Primersequenz   | AT<br>°C | Primer<br>menge | Polymerase                              | Mg <sup>2+</sup><br>Konz.                               |
|-------------|---|----------|-----------------|---|---|
| OARVH72     | ctctagaggatctggaatgcaaagctc (F)<br>ggcctctcaaggggcaagagcagg (R) | 52°C     | 0,08 mM         | Qiagen<br>Multiplex<br>PCR<br>Mastermix | Puffer<br>enthält<br>bis zu<br>3 mM<br>Mg <sup>2+</sup> |
| ILSTS011    | gcttgctacatggaaagtgc (F)<br>ctaaatgcagagccctacc (R)             |          | 0,17 mM         |   |   |
| BM8125      | ctctatctgtggaaaaggtggg (F)<br>gggggttagactcaacatacag (R)        |          | 0,17 mM         |   |   |
| OARJMP58    | gaagtcattgaggggtcgctaacc (F)<br>ctcatgttcacaggactttctctg (R)    |          | 0,13 mM         |   |   |

<sup>1</sup> Die Amplifikation der Mikrosatellitenmarker OARVH58, TGLA441 und BMS975 wurde in einem Multiplex-Ansatz durchgeführt.

Tabelle 2A: Fortsetzung

| <b>Multiplex 2</b> |   |      |            |   |   |
|--------------------|---|------|------------|---|---|
| OARFCB<br>128      | cagctgagcaactaagacatacatgcg (F)<br>attaaagcatcttctttatttctcgc (R) | 54°C | 0,1<br>mM  | Qiagen<br>Multiplex<br>PCR<br>Mastermix | Puffer<br>enthält<br>bis zu 3<br>mM<br>Mg <sup>2+</sup> |
| INRA063            | atttgacaagctaaatcaacc (F)<br>aaaccacagaaatgcttgaag (R)            |      | 0,5<br>mM  |   |   |
| <b>Einzelne MS</b> |   |      |            |   |   |
| MAF33              | gatcttggttcaatctattccaattc (F)<br>gatcatctgagtgtgagtataacag (R)   | 53°C | 0,33<br>mM | 5-Prime <sup>®</sup><br>DNA             | Puffer<br>enthält<br>bis zu<br>2 mM<br>Mg <sup>2+</sup> |
| MAF70pig           | gcaggactctacggggccttgc (F)<br>cacggagtcaaaagagtcagacc (R)         | 57°C |            |   |   |
| ILSTS028           | tccagatttgtaccagacc (F)<br>gtcatgtacatcttggagc (R)                | 52°C |            |   |   |

Tabelle 3A: Allelgrößen der Mikrosatellitenmarker in der Kamerunschafherde (n = 22).

| Sample Name | BM8125  |         | INRA63  |         | OarFCB128 |         | ILSTS028 |         | MAF 70  |         | MAF33   |         | OarVH72 |         | ILSTS11 |         | OarJMP58 |         |
|-------------|---------|---------|---------|---------|-----------|---------|----------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|----------|---------|
|             | Allel 1 | Allel 2 | Allel 1 | Allel 2 | Allel 1   | Allel 2 | Allel 1  | Allel 2 | Allel 1 | Allel 2 | Allel 1 | Allel 2 | Allel 1 | Allel 2 | Allel 1 | Allel 2 | Allel 1  | Allel 2 |
| 2008_2892   | 120     | 120     | 174     | 177     | 120       | 132     | 153      | 167     | 154     | 168     |         |         | 125     | 125     | 274     | 282     | 157      | 163     |
| 2008_2893   | 120     | 120     | 177     | 185     | 120       | 132     | 153      | 153     | 154     | 154     | 120     | 132     | 125     | 125     | 274     | 282     | 147      | 163     |
| 2008_2894   | 118     | 120     | 174     | 177     | 120       | 132     | 155      | 155     | 156     | 156     | 120     | 132     | 125     | 125     | 282     | 282     | 147      | 163     |
| 2008_2895   | 118     | 120     | 174     | 189     | 120       | 132     | 153      | 153     | 154     | 154     | 120     | 132     | 125     | 125     | 282     | 282     | 147      | 157     |
| 2008_2896   | 118     | 118     | 177     | 185     | 120       | 132     | 155      | 155     | 156     | 156     | 120     | 132     | 125     | 125     | 268     | 282     | 153      | 163     |
| 2008_2897   | 118     | 120     | 185     | 189     | 120       | 132     | 153      | 153     | 154     | 154     | 120     | 132     | 125     | 125     | 268     | 282     | 147      | 163     |
| 2008_2898   | 120     | 124     | 177     | 189     | 132       | 136     | 153      | 153     | 154     | 154     | 132     | 136     | 125     | 125     | 274     | 282     | 163      | 165     |
| 2008_2899   | 120     | 126     | 177     | 177     | 120       | 136     | 153      | 153     | 154     | 154     | 120     | 136     | 125     | 125     | 282     | 282     | 153      | 163     |
| 2008_2900   | 118     | 118     | 174     | 185     | 120       | 132     | 155      | 155     | 156     | 156     | 120     | 132     | 125     | 125     | 282     | 282     | 147      | 153     |
| 2008_2901   | 118     | 120     | 174     | 174     | 132       | 136     | 153      | 153     | 154     | 154     | 132     | 136     | 125     | 125     | 282     | 282     | 153      | 157     |
| 2008_2902   | 120     | 124     | 181     | 189     | 120       | 120     |          |         |         |         | 120     | 120     | 125     | 129     | 282     | 282     | 147      | 157     |
| 2008_2903   | 118     | 120     | 177     | 189     | 120       | 132     | 155      | 155     | 156     | 156     | 120     | 132     | 125     | 125     | 282     | 282     | 147      | 163     |
| 2008_2904   | 120     | 120     | 177     | 177     | 120       | 120     | 155      | 155     | 156     | 156     | 120     | 120     | 125     | 125     | 282     | 282     | 163      | 163     |
| 2008_2905   | 118     | 118     | 174     | 185     | 120       | 132     | 153      | 153     | 154     | 154     | 120     | 132     | 125     | 125     | 268     | 282     | 147      | 163     |
| 2008_2906   | 120     | 120     | 174     | 185     | 120       | 132     | 155      | 155     | 156     | 156     | 120     | 132     | 125     | 125     | 274     | 282     | 157      | 163     |
| 2008_2907   | 118     | 126     | 177     | 185     | 132       | 136     | 153      | 153     | 154     | 154     | 132     | 136     | 125     | 125     | 268     | 282     | 153      | 163     |
| 2008_2908   | 118     | 120     | 174     | 177     | 120       | 132     | 153      | 153     | 154     | 154     | 120     | 132     | 125     | 125     | 268     | 282     | 147      | 153     |
| 2008_2909   | 120     | 120     | 177     | 185     | 120       | 136     | 153      | 153     | 154     | 154     | 120     | 136     | 125     | 125     | 274     | 282     | 157      | 163     |
| 2008_2910   | 118     | 120     | 177     | 185     | 132       | 136     | 155      | 155     | 156     | 156     | 132     | 136     | 125     | 125     | 282     | 282     | 147      | 153     |
| 2008_2911   | 118     | 124     | 177     | 189     | 120       | 120     | 155      | 155     | 156     | 156     | 120     | 120     | 125     | 125     | 268     | 282     | 153      | 165     |
| 2008_2914   | 120     | 120     | 177     | 185     | 132       | 136     | 153      | 153     | 154     | 154     | 132     | 136     | 125     | 125     | 274     | 282     | 163      | 163     |
| 2008_3077   | 118     | 120     | 177     | 177     | 132       | 132     | 153      | 153     | 154     | 154     | 132     | 132     | 125     | 125     | 268     | 268     | 163      | 163     |

## Anhang

Tabelle 4A: Ergebnisse der Mikrosatellitenanalyse zur Abstammungskontrolle der Lämmer (1 = Mutterschaft möglich; 0 = Mutterschaft nicht möglich).

| <b>Lamm Nr. 1 (2914-08)</b> |            |        |        |        |          |        |        |      |          |           |
|-----------------------------|------------|--------|--------|--------|----------|--------|--------|------|----------|-----------|
| Mutter                      | Name       | BM8125 | Inra63 | FCB128 | ILSTS 28 | MAF 70 | MAF 33 | VH72 | ILSTS 11 | OAR JMP58 |
| 2892                        | Judi       | 1      | 1      | 1      | 1        | 1      | ?      | 1    | 1        | 1         |
| 2893                        | Jule       | 1      | 1      | 1      | 1        | 1      | 1      | 1    | 1        | 1         |
| 2894                        | Prinzessin | 1      | 1      | 1      | 0        | 0      | 1      | 1    | 1        | 1         |
| 2895                        | Olga       | 1      | 0      | 1      | 1        | 1      | 1      | 1    | 1        | 0         |
| 2896                        | Stine      | 0      | 1      | 1      | 1        | 1      | 1      | 1    | 1        | 1         |

| <b>Lamm Nr. 2 (3077-08)</b> |            |        |        |        |          |        |        |      |          |           |
|-----------------------------|------------|--------|--------|--------|----------|--------|--------|------|----------|-----------|
| Mutter                      | Name       | BM8125 | Inra63 | FCB128 | ILSTS 28 | MAF 70 | MAF 33 | VH72 | ILSTS 11 | OAR JMP58 |
| 2892                        | Judi       | 1      | 1      | 1      | 1        | 1      | ?      | 1    | 0        | 1         |
| 2893                        | Jule       | 1      | 1      | 1      | 1        | 1      | 1      | 1    | 0        | 1         |
| 2894                        | Prinzessin | 1      | 1      | 1      | 0        | 0      | 1      | 1    | 0        | 1         |
| 2895                        | Olga       | 1      | 0      | 1      | 1        | 1      | 1      | 1    | 0        | 0         |
| 2896                        | Stine      | 1      | 1      | 1      | 1        | 1      | 1      | 1    | 1        | 1         |

```

1  tgggatccaa gcagaagaga gggrattccc gccagccggg gccactcagc cacttctggg
61  gaccrgagrg atgatggaga ccccgactga gacctcctgg cccgggaggt ccaacgccag
121 egagccgcga tcgtccgcaa caccgcaagt tcctagaggg ggaaggatgg tgggaatccc
181 accgcgacc ccacccccgt gcgatggacc catagagatc aaggagactt tcaagtacat
241 caacacggtg gtgtcctgcc tagtgttcgt gctgggcatc atcggaact ccacgctgct
301 gagaatcatt tacaagaaca agtgcattgc aaacgggtcca aatatcttga tagccagcct
361 ggctctcgga gacctgctgc acattatcat a [gap]
492          ttgcagatg attttcagag gagtgcattg gaaaaagaac tggaaattgt
541 tattttactc cacaagctca ttcacctccg ctaagtaata aatacagttc aagagcacc
601 tgtgaacatc tcctaacag agctttgtgt ctctcratg cagytgctcg ccaaggactg
661 gccctttggg gttgagatgt gtaagctggt gcctttcatt cagaaggcct ccgtgggcat
721 cactgtgctg agtctatgtg ctctgagtat tgacaggtaa gagcatgtat ctaagcaaca
781 tatatoctga caaaaatcct agtgggtgct acgttactta gaaagtaaac tgtaattcaa
841 taaaaaccag gctctgccag cttggcaatt gattctgttt tgttcttcag rtatcgagct
901 gttgcttctt ggagtcggat taaaggaatc ggggttccaa aatggacagc agtagaaatt

```

Abbildung 1A: Fortsetzung nächste Seite

## Anhang

---

961 gttttaattt gggtrgtctc ygtggttctg gctgtccctg aggcmggtggg ttttgatata  
1021 attacgagtg atcacatagg aaataatstg agaactctgct tgctccatcc cactcagaaa  
1081 acagcattta tgcaggtaaa ttttactttt ctttcccttt tctgctcttg cctcataaat  
1141 gtttagctat tttcccccaa tctcctcttc ttgggaaatt attgatttat gactgtcctt  
1201 ggcataaatt aaaagtgtag gtcccaggac ctcagggtta acagcaggac taatgaccca  
1261 tgctgcaaga agctaggtca ttacttctcc agaattcctg [gap]  
1401 tgaagattat tccttgatga gcatttttaa atatttgata  
1441 tgtaagagtt tcttacagar gaatattaac tataacatcc tttcttcccc ttagttttac  
1501 aagacagcta aagactgggtg gctatttagt ttctatttct gcctgccatt ggccatcact  
1561 gcattgtttt ataccctgat gacttgtgaa atgttgagaa agaagagtgg tatgcaaatt  
1621 gctttaaatg atcacttaaa acaggtaagg aaatagaaat atttgctgac tcatgattac  
1681 aattccaatt atgaatatga aaattattgt agtgacaata aactgaaagt atcatctact  
1741 agagcataat tcctttttct tagtctg [gap]  
1868 gta aacattatta aacattttgt ttggaaagag agaatgctgt gattataatg  
1921 agccatccgt tacagagtct gattgtgggt ttatttcaga gacgggaagt ggccaaaaca  
1981 gtattttgcc tggctcttgt ctttgcctct gtgtggcttc ctcttcatct tagcaggatt  
2041 ttgaaactca ctctttatga tcagcatgat ccccgtagat gtgaattttt gaggtaagta  
2101 atagttgtgt aaataaatgc cattcagaag tttttccatt gattcctttc attggcagga  
2161 agagagagta ccatttttct aatcctcagg gagcaattta agatgcccc cagcttttct  
2221 ttaactttt acttctattt ccaacggaga agtaagggga gctttggaga gactgagaa  
2281 tggagagcca gggctgtcca agtgagtgaa tgacatgatt gaaaatatca gatctggttc  
2341 tccattgcac tttgtaaadc ctttgttttt tagacagcct gggcacttac aaaatatatt  
2401 ttatttttaag gcagagaatt gagcatggga gtgggaataa ggattaagga tatgacaggg  
2461 acagagaata agacaaagag agagacagaa gcaaagagaa agagagagag acagagagag  
2521 atcaaaatca gcaaagacta atgataaagt aaaaataatt gtaaatgggt agttttttaa  
2581 tttataaagt acaaaagtct gtaaraatt tgtgctcata gcacataaat aaatctttgt  
2641 attattttcg cagctttttg ttggtattag actacattgg catcaacatg gcctocctga  
2701 attcctgtat taaccaata gctctgtatt tggtagcaa aagattcaaa aactgcttta  
2761 aggtaagaga gtattctaaa atcaaaaacc cttttaatct ggtatcaaat ataaccctta  
2821 caaactatta atatttctaa ccagagagat ctagtcaact gttttataat tttcccttga  
2981 [gap] gggttgtgat agtgaaytt

Abbildung 1A: Fortsetzung nächste Seite

3001 gatgtaaact tataacaaag ttactttggt ttgggcagtc atgtttatgc tgctggtgcc  
3061 aatcatttga agaaaagcag tccttggagg aaaagcagtc gtgcttaaag ttcaaagcta  
3121 acgatcacgg atatgacaac ttccgttcca gtaataaata cagctcatct tgaagaagg  
3181 aatattcatt ttctttattt tggacagaaa tcattcaaac aaagaggtgt ctgccaaagt  
3241 gaaacaaaac aacgtgtgtg tttgcacaaa acaatgtaca aatctaagag ygattathtt  
3301 cttcacactc aagagttcca catgacatth gacgagctat ttccagcatg agaagacaag  
3361 cagtgagaat taagaaagcc tcgttgtgaa agcacttaat tctttacagt tagcacttca  
3421 ctatgttata gctcttcaga acttctggtc tattcatgca ccacttacat ttaacttgag  
3481 ttcactcaga attcctgtga aagatgttta tttttgtaa ttaagatgca tctgatgtaa  
3541 aggaaaaaag tgtcactgca aacagaatt tttagatgaa atttaaatta ctcaatttaa  
3601 aaatthttaa atctttcaaa gtttcacacc tttagtggga ctatatttgg aaacaacaca  
3661 tgaaaatagt tcggctagtg tatttttgac attagagaca t

Abbildung 1A: Sequenz der codierenden Bereiche sowie der flankierenden Intronbereiche des ovinen *EDNRB* (Genbank Accession Nummer JQ937242) nach Sequenzierung im Rahmen der Arbeit.

## Anhang

---

1 tcagaactca tctggggagg aaatTTTTaa tttccttcac ttttttgatt gttacttagg  
61 tttatggaac ctgtaggaca aattcaaagg tttctggaga tgtggkcaat aacagaatta  
121 catttattaa gtcttcatgc agtactcttg tcatttttgt gtctgtcttc tttccatatt  
181 taactgtttt cttcttctga tataagcttt attactttgt caactccaaa actataaagt  
241 tctcaggcat ttcttaattt cctcartaaa tgattaattt aatgaaaca tgaaaagagt  
301 ccttttaacc taatgctcat tcttaccctt aaggcca [gap]  
438 ttc agcaaaacag caatactccc taaactaatg tattcatata  
481 attagtataa aataaaaata atcgagtttg ttaggaaaag agtttttata atttgaaaa  
541 caaatatttc cttaaatagc aatgtttttg agtacacctc aattctccat ttccttttct  
601 cactgacatc agttaacagg aaaaaaacac taatggtttt ctttttacct gcatgtaga  
661 ttctggatga acatggatc tactaagatt ggatacatca ttaattcctc atattacaat  
721 gtcaattgag cttcatttgc tgtaaacatt actgaaaaca attcacattt cacccttatt  
781 aattgggtgca acatgatcta agcaaagaaa aggagaaaata ccaggaaaag cctgtttgaa  
941 [gap] tttggctctc tatgaatcca  
961 atagggtactt agctgtaaat aggaagattt ttctgaatgt aactacatac cttcttaatg  
1021 agaaaacaaa cattaatata taatgtattt ccattgggta ctatagtgtg aacttttagtt  
1081 tacatttgat ttgaagcaat ctatttityta ttagcatgtc aattatgaat gtctgttaca  
1141 cacccatata gatatgcata tgagtatacg tattataaat atttatatat ggctatgtac  
1201 aagaaaccta ctttacaaaa atgaatttct tttctttgaa tctaaatctg aatcacttct  
1261 attttataaa caattgtcta tgacagtgtt tctgcaatgt tagtacattt cttaaacatt  
1321 ccctccatgt gacagctgtt ttgcttctca tatctatgga ttgagaccac acataatgaa  
1537 [gap] ygtg acttctgcac atttctgttg  
1561 ataacacaga tcaacacatc aaccttggca cagtgtcaaa aaggacygca cacagatcta  
1621 ataccgtgag gaagagatca tgggtggacca ttttgggtgac tagctgtcat agtaactaac  
1681 tstgctgsua agwaaaatat attytatatw aaacacatac atctaaaacc caaaaatgag  
1741 agtcttctrt aagttttcta tacttggttac aaccccaatg taaatattat aaataatttg  
1801 ttatctactg ttttaagttt ttcttttttt acatataatgg atgtatgtgc atgctgtcct  
1861 gcacwctgtg atctmtwatt cataaaaaat [gap]  
1991 tgatgggtggg gatgatgact tgggtgatgat ggtgatgggtg gtggtaacac  
2041 ctgggtgggtg tgggtgatggg ggtagtcatg atgggtgggtg ttatgacttg gtgggtgttag  
2101 tgatgggtggg gtgatgaagt ggtgatggta attatggcag cagcagtatt aaaaatagag  
2161 acttattgga tgcactgagg cagataagca aacagaaaaa ctcaatacag tgtaataagt  
2221 gctgtgataa gaaagccctt agaagaacta atctactgca gcttttaggaa atcttctctca  
2281 taaaatattt attagcaaag acaggaagga tgtaggggta gccagggtcat ctgagtcagc

Abbildung 2A: Fortsetzung nächste Seite

## Anhang

---

2341 tatcattaat tgaaaaacta atatctgttt ccagtcctcc tacttattaa ttagtacaca  
2401 caaattcatt cttcagtccc attgacagaa ataagcatct ccttccc [gap]  
2548 caa aagtagctta ctgagtatac ttcttacata  
2581 aagacatttt aaaacttact aaataaacaa ggcatttaac ctatgcagct ctaacttgta  
2641 agtgataaaa atagactgtc catataacta attctcatgc ttttcagttt tctkayyttt  
2701 caagtgggtca taaaggcaa [gap]  
2820 a  
2821 ggatcacatt gttccctgac ttgatcttct cttgatttcc gagaagctgt attatgtctg  
2881 gaaatccaag gggaaagggc cattttttta atctcaggca aagccatttt catttatatg  
2941 tttcagatgg aataacttaa atatgtgttt ttagagctac ttttcagccg aacacactgt  
3001 tgatgcctcc agtggtaaac tttttcggga aaaaacattc tttttggaaa caaatctcct  
3061 taaaatatct tgtactctag ctaattttat accaaaaaac actgtcatga aaacaatata  
3121 taaaatattt ggtaacaata ccagcacaga accaccctgt ggtaagcaaa agggttgaaa  
3181 cattcctcag aatatttctg ggtggtgaaa gaggaccacc aaaa [gap]  
3325 rggagg gcttgagcgt ttgaagtcac tcggagggga  
3361 tagaaacttc cgagttaatg cagatagaga ctcttccaat cagaccaagt ggagatgtcm  
3421 gggagatttt cttaatcagc cggggcagtc ctgggggtgtg tatggggggt gggagcgggtg  
3481 ccgaaggaga cagaccacag gcagccggga agggaggggt ctgggagtc agacacgcgg  
3541 catccggggt tgctggggag tcaaatgcag agactggcga tgcct

Abbildung 2A: Sequenzabschnitte in 5' Richtung des ovinen *EDNRB* (Genbank Accession Nummer JQ959537) nach Sequenzierung im Rahmen der Arbeit.

## Anhang

---

1 tgaattcagg agctatgtga gaagtacaag aaagcaaac tcaggcagaa tcctctctaa  
61 ggattcaaca aaaagccttc cttctcttga actatattag ttatggagtc acaataataa  
121 taatgccac atgattcatg atagtaaag taggcaaac aaatataatt taggttcttg  
181 gaagaaaacc aaaagatgtg gcagcactaa gatggaaatg tccagaaatc caaacagtgc  
241 agaggccaaa ctcatgaaga ataatgtatc tggctggact gactcacttt cagtcattag  
301 tcagccacag aagtgacaac attaaataat caacgaaccg aatgtgtata cccaaatcag  
361 aaaatccac tgaacacttc cagaatgtaa ggctcaccag cc [gap]  
503 ttttttcc ctttttcatt cattcaagta ttaataagt  
541 tatctaacta cagtaacaag tacatctgga ataacagtt taagaaactt gcacaactga  
601 ttcttgctag cygacagttc agctgggtggg aacagaagtg ttgggtatac cagagagaag  
661 ctgtgcacyg cgtgaatgct taacatgcc a tgagcaatgg taagcctggt tacagaggta  
721 gcagagtggc [gap]  
831 gagtttatcc  
841 ctgatatgca aggttggctt aaaatctgaa agtcattttg tgtaatattt catattaata  
901 tagtaaagga caaaatcata tgctcttctc aatagacaac agtagcattt gaaaaagtcc  
961 aattactatt cataataaaa aaatTTTTta actcttagca aataaaaagc aaatagaaac  
1021 aatattcctc aacctgaaaa acagcatctg caaaaagccc agagctatca ccaaaactac  
1081 ttgtagaaga taaatgctgt gcctaattt ggaaacaaga caaaaatgcg taatataact  
1141 caggtctact caatactgta ctggatttaa accacaataa acaaatgaag aaaaaataa  
1201 aggtatatat atcagcagta aagaatctgt ytgacagtga ggaagccact gaagatacag  
1261 gtttgatccc tgagttggga at [gap]  
1383 ttcacaa gcatgagaat caaaaagaat aaaatattta ggaataaatc taattttaaa  
1441 ctgtaggtgt tgtacactaa actacaaaat attactgaga aaatttaag aggtttaaat  
1501 aaaaagatat tttatgggtca taaactgatt taatattggt aaaatttata attctatgcc  
1561 aaatttatct gtagattaat gtaattttga tcaaaaacag caggaatttt ttataaattg  
1621 ataatttgat actaaaatat atatggcaac aaaagaactc aaaataatca aaacaatttt  
1681 gaaaaaaaa gttggagaaa attggaattt gccaatcca gagaaacctg gtgtgctaca  
1741 gttcatgggg tcacaaagat ttggacatga cttaactact gaacagcaac aaaaaatttc  
1801 aaatcttgct acaaagctaa ggttttacia ggtgaggttt atcaacctag ggatggacat  
1861 gccaatcaat ggaacagatc tgaactttca gaaataaatc cttctagtta tggatcaatg  
1921 gctttcaata aagatgcaa cacagttcaa tgaggggaagg gatagtggtt tcaacaaatc  
1981 ctgctgagac aataagacac acatatgtaa aaacaagaaa aagaaaaaag catttagatc  
2041 cttactacac accatacaca aaaattaact caaa [gap]  
2175 caaagt cccatttcta gaacattaca tatgcaactgt ctcccaatta

Abbildung 3A: Fortsetzung nächste Seite

## Anhang

---

```
2221 aatagccagc ctgattacct cgtttgcatt acttagatta atgaattagg agaattctct
2281 aaattttctt atattcttaa taatacaagg ttaccaacac cttatataac tgtaataaat
2341 tgcgatgggt ggactattca tgacctcaaa aatggcagtt tcataagggt cagtctggag
2401 ataaaataaa tgaataaatc aataaaccaa taaataaata aatttgtccc aaaaagtat
2461 ttatggtatt tttctgggat cttcagaaac ttaaaaaaaaa acataagtta tattarattt
2521 aactagtttt tcatacaatg gctgcaaatg gttcaatcta ttcaaatcca ttgccccccc
2581 tata [gap]
2685 taccca ctctaccca
2701 ccatgacagt ctctgcaaat tgtaagtaac agtaaagaaa ttgcagaagt tgatgagatt
2761 tggcataaaa attaaactca cacaaaaaca gcaaggccac tgacctggaa ggggcctttc
2821 ttctgtgtgt actcttctc cacatgttgc ttatagaaga yggatttctt ttggatcaca
2881 gaatcctggg gcaaccaaga aaaagagatt cttttgtttt tgttcaaat agctcaggta
2941 aaccagcccc aggctgcaaa cctccaagtc ataaataatt gctgcatgt gcagtgaat
3001 gctattacct gggcggaca ctaatgtcag aacaagaggg agaccagctt ctgcaaaagt
3061 gtgatgatat acttgactga ggcaccagaa aa
```

Abbildung 3A: Sequenzabschnitte in 3'-Richtung des ovinen *EDNRB* (Genbank Accession Nummer JQ959538) nach Sequenzierung im Rahmen der Arbeit.

```
1 taatactccc agcttctcta aaacctcaaa taaagcaata ctaacacctg aaagaacagg
61 taatatttca acttcttgat tagctgctta ctttgtgaat cggtcaccaa acacagctta
121 aaaaataatc cacctttcat tgaagagctt gagggtaatt ttgtcacaat ggggagtttg
181 ctgtacacct acattgggta cgaaaaaggg tagcattaat ttatacttta gtatcattaa
241 tctgctcttc attgtgtata gcaggcagct ttcctcctt atcaaatgta tatattacat
301 atatgtattt ccaaatgtgc ttttaaaa
```

Abbildung 4A: *SLAIN1* Exon 3 (*Ovis aries*) (Genbank Accession Nummer JQ937243) Die Sequenzierung des Abschnitts erfolgte im Rahmen der Arbeit.

### **Danksagung:**

Mein besonderer und herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. G. Erhardt für die Überlassung des interessanten Dissertationsthemas, die kritische und konstruktive Durchsicht des Manuskripts und die Betreuung während der gesamten Zeit.

Frau Prof. Dr. Gesine Lühken danke ich für die hervorragende Mitbetreuung des Projekts, die gute Einarbeitung in die Tiefen der Molekulargenetik und die vielen fachlichen Tipps und Anregungen. Außerdem danke ich ihr herzlich für die Durchsicht des Manuskripts.

Herrn Dr. Alfredo Pauciuolo danke ich für die Einführung in die zytogenetischen Methoden und die Mitbetreuung des zytogenetischen Teils der Arbeit. In diesem Zusammenhang möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. R. Gerstberger und seinen Mitarbeitern für die Möglichkeit der Nutzung und die Unterstützung bei der Bedienung des Fluoreszenzmikroskops bedanken.

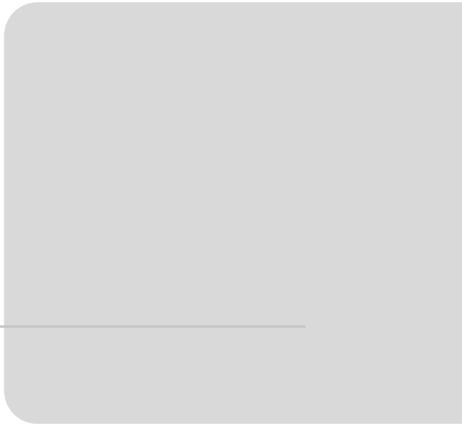
Des Weiteren bedanke ich mich bei allen Kolleginnen und Kollegen am Institut für Tierzucht und Haustiergenetik für die gute Zusammenarbeit, stetige Hilfsbereitschaft und die schöne Zeit am Institut sowie bei den Kollegen am Oberen Hardthof für die gute Betreuung der Kamerunschafe.

Allen beteiligten Kamerunschafzüchtern danke ich herzlich für das zur Verfügung stellen des Probenmaterials.

Abschließend möchte ich mich auch bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die mich während der ganzen Zeit unterstützt haben.

**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 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.



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

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

ISBN: 978-3-8359-6309-2



9 783835 963092

