



Molekulargenetische Charakterisierung von
Genen und Chromosomenabschnitten im
Zusammenhang mit Verhalten bei Kälbern
der Rassen Dt. Angus und Dt. Fleckvieh

Kristina Glenske

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen



Bibliografische Informationen der Deutschen Bibliothek

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

1. Auflage 2010

© 2010 by Verlag: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH,
Gießen
Printed in Germany

ISBN 978-3-941703-72-8

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

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

Betreuer: Prof. Dr. G. Erhardt

Molekulargenetische Charakterisierung von Genen und
Chromosomenabschnitten im Zusammenhang mit Verhalten
bei Kälbern der Rassen Dt. Angus und Dt. Fleckvieh

INAUGURAL-DISSERTATION

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

Eingereicht von
Kristina Glenske

Tierärztin aus Weilburg

Gießen, 2010

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

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Gutachter:

Prof. Dr. G. Erhardt

PD Dr. H. Willems

Tag der Disputation: 30. März 2010

MEINER FAMILIE

Diese Arbeit wurde zum Teil im Rahmen des Sonderforschungsbereiches 299
„Landnutzungskonzepte für periphere Regionen“, Teilprojekt C1.2,
der Deutschen Forschungsgemeinschaft angefertigt.

Inhaltsverzeichnis.....	I
Verzeichnis der Abbildungen.....	V
Verzeichnis der Tabellen.....	VIII
Verzeichnis der Abkürzungen.....	XI
1 EINLEITUNG	1
2 LITERATURÜBERSICHT.....	3
2.1 Temperament und Umgänglichkeit bei Rindern.....	3
2.2 Molekulargenetische Charakterisierung von Phänotypen.....	4
2.2.1 Analyse von Mikrosatelliten	4
2.2.2 Genetische Kartierung mittels Mikrosatelliten	5
2.2.3 QTL-Studien.....	6
2.2.4 Analyse von Kandidatengenen.....	6
2.2.5 Praktischer Nutzen der molekularen Gendiagnostik	7
2.3 QTL-Studien für Verhaltensmerkmale bei <i>Bos taurus</i> und anderen Tierarten.....	8
2.4 Kandidatengene für Verhalten bei Rindern	9
2.4.1 Cholecystokininrezeptor B.....	10
2.4.1.1 Physiologische und pharmakologische Bedeutung des Cholecystokininrezeptors B.....	10
2.4.1.2 Genstruktur des Cholecystokininrezeptors B: <i>CCKBR</i>	11
2.4.1.3 Polymorphismen im humanen <i>CCKBR</i> -Gen und Assoziationen	11
2.4.1.4 Cholecystokininrezeptor B bei Tieren.....	12
2.4.1.5 <i>CCKBR</i> -knockout-Tiere	14
2.4.2 Dopaminrezeptor D4.....	14
2.4.2.1 Medizinische Nutzung des DRD4.....	14
2.4.2.2 Genstruktur des Dopaminrezeptors D4: <i>DRD4</i>	15
2.4.2.3 DRD4 und Schizophrenie.....	15
2.4.2.4 Polymorphismen im humanen <i>DRD4</i> -Gen und Assoziationen.....	16
2.4.2.5 <i>DRD4</i> bei Tieren	17
2.4.2.6 <i>DRD4</i> -knockout-Tiere.....	19
2.4.3 Monoaminoxidase A	20
2.4.3.1 Physiologische Funktion der Monoaminoxidasen	20
2.4.3.2 Medizinische Nutzung der Monoaminoxidasen.....	20
2.4.3.3 Genstruktur der Monoaminoxidase A: <i>MAOA</i>	21
2.4.3.4 Polymorphismen im humanen <i>MAOA</i> -Gen und Assoziationen	21
2.4.3.5 <i>MAOA</i> bei Tieren	23
2.4.3.6 <i>MAOA</i> -knockout-Tiere.....	24
2.4.4 Serotonintransporter.....	25
2.4.4.1 Physiologische Funktion des Serotonintransporters	25
2.4.4.2 Medizinische Beeinflussung des SERT	25
2.4.4.3 Das Gen des Serotonintransporter: <i>SERT</i>	26
2.4.4.4 Polymorphismen im humanen <i>SERT</i> -Gen und Assoziationen	26
2.4.4.5 <i>SERT</i> bei Tieren	28
2.4.4.6 <i>SERT</i> -knockout-Tiere.....	28

3	MATERIAL UND METHODEN	30
3.1	Material.....	30
3.1.1	Tiere	30
3.1.2	Probenmaterial	30
3.1.3	Verhaltensdaten	32
3.1.3.1	Anbindetest.....	32
3.1.3.2	Wiegetest.....	32
3.1.3.3	Separier- und Rückhaltetest	33
3.1.4	Geräte	34
3.1.5	Verbrauchsmaterialien	36
3.1.6	Chemikalien und Reaktionskits.....	37
3.1.7	Größenstandards.....	40
3.1.7.1	Größenstandards für die Polyacrylamidgelelektrophorese mit dem halbautomatischen Sequenziersystem ALF <i>express</i>	40
3.1.7.2	Größenstandards für die Polyacrylamidgelelektrophorese mit dem ABI PRISM® 377 DNA Sequencer	40
3.1.7.3	Größenstandards zur Agarosegelelektrophorese	41
3.1.8	Bakterienstamm und Vektor.....	41
3.1.9	Enzyme.....	41
3.1.10	Oligonukleotide.....	41
3.1.11	Computerprogramme	41
3.1.12	Gentechnische Arbeiten	42
3.2	Methoden.....	42
3.2.1	Blutentnahme und Aufbereitung der Blutproben	42
3.2.2	DNA-Extraktion	43
3.2.3	Etablierung der Polymerasekettenreaktion zur Amplifizierung von Genabschnitten	43
3.2.3.1	Auswahl der Primer.....	43
3.2.3.2	Etablierung der PCR mit Taq-Polymerase.....	43
3.2.3.3	Etablierung der Multiplex-PCR zur Amplifizierung von Mikrosatelliten	44
3.2.4	Amplifikation bestimmter Abschnitte der Kandidatengene	44
3.2.4.1	<i>CCKBR</i>	45
3.2.4.2	<i>DRD4</i>	45
3.2.4.3	<i>MAOA</i>	45
3.2.4.4	<i>SERT</i>	46
3.2.5	Amplifikation der Mikrosatelliten auf BTA1 und BTA29.....	49
3.2.6	Aufreinigung der PCR-Produkte	52
3.2.7	Agarosegelelektrophorese	52
3.2.8	Klonierung.....	52
3.2.8.1	Ligation	52
3.2.8.2	Transformation	53
3.2.8.3	Anzüchtung von Einzelkolonien	53
3.2.8.4	Auswahl geeigneter Kolonien	53
3.2.8.5	Kolonie-PCR.....	54
3.2.8.6	Isolation von Plasmid-DNA	54
3.2.8.7	Glycerolstocks zur Aufbewahrung.....	54
3.2.9	Sequenzierung mit dem halbautomatischen Sequenziersystem ABI PRISM® 377 DNA Sequencer.....	55
3.2.9.1	Durchführung der Sequenzierreaktion	55
3.2.9.2	Sequenzierreaktion der Plasmid-DNA	55

3.2.9.3	Sequenzanalyse mit dem ABI PRISM® 377 DNA Sequencer	56
3.2.10	Nachweismethoden der Polymorphismen	56
3.2.10.1	PCR-RFLP	56
3.2.10.2	Tetra-Primer ARMS-PCR	57
3.2.11	Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese	59
3.2.11.1	Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese mit dem halbautomatischen Sequenziersystem ALF <i>express</i>	59
3.2.11.2	Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese mit dem ABI PRISM® 377 DNA Sequencer	59
3.2.11.3	Fragmentanalyse	59
3.2.12	Genetisch-statistische Methoden	60
3.2.12.1	Hardy-Weinberg-Gleichgewicht	60
3.2.12.2	Chi ² -Test	60
3.2.12.3	Varianzanalyse	60
3.2.12.3.1	Varianzanalysen der Kandidatengene <i>CCKBR</i> , <i>DRD4</i> und <i>SERT</i>	61
3.2.12.3.2	Varianzanalyse des Kandidatengens <i>MAOA</i>	61
3.2.12.3.3	Varianzanalysen der Mikrosatelliten auf BTA1	62
3.2.12.4	Kartierung des <i>DRD4</i> -Gens auf BTA29	62
3.2.12.5	QTL-Analysen für Temperament auf BTA1 und BTA29	63
4	ERGEBNISSE	64
4.1	Molekulargenetische Ergebnisse	64
4.1.1	Sequenzen und DNA-Varianten der Kandidatengene	64
4.1.1.1	Cholecystikininrezeptor B - Gen	64
4.1.1.2	Dopaminrezeptor D4 - Gen	64
4.1.1.3	Monoaminoxidase A - Gen	65
4.1.1.4	Serotonintransporter - Gen	66
4.1.2	Darstellung von DNA-Varianten der Kandidatengene mittels der verschiedenen Nachweismethoden	68
4.1.2.1	PCR-RFLP-Analysen	68
4.1.2.1.1	<i>CCKBR</i> (Intron 3)	68
4.1.2.1.2	<i>DRD4</i> (Intron 1)	69
4.1.2.1.3	<i>MAOA</i> (Exon XV)	70
4.1.2.2	Tetra-Primer ARMS-PCR	71
4.1.2.2.1	<i>CCKBR</i> (3'UTR)	71
4.1.2.2.2	<i>SERT</i> (Intron 13)	72
4.1.3	Mikrosatellitenanalyse mit dem ALF <i>express</i>	74
4.1.4	Mikrosatellitenanalyse mit dem ABI PRISM® 377 DNA Sequencer	74
4.2	Genetisch-statistische Ergebnisse	75
4.2.1	Signifikanzniveaus der untersuchten Einflussfaktoren des Grundmodells der Varianzanalysen und der QTL-Analysen	75
4.2.2	Allel- und Genotypfrequenzen des Nukleotidaustausches im <i>CCKBR</i> (Intron 3) ...	76
4.2.3	Einfluss des Nukleotidaustausches im <i>CCKBR</i> (Intron 3) auf Verhaltensscores mittels Chi ² -Test	77
4.2.4	Einfluss des Nukleotidaustausches im <i>CCKBR</i> (Intron 3) auf Verhaltensscores mittels Varianzanalyse	78
4.2.5	Allel- und Genotypfrequenzen des Nukleotidaustausches im <i>CCKBR</i> (3'UTR)	79
4.2.6	Einfluss des Nukleotidaustausches im <i>CCKBR</i> (3'UTR) auf Verhaltensscores mittels Chi ² -Test	80

4.2.7	Einfluss des Nukleotidaustausches im <i>CCKBR</i> (3'UTR) auf Verhaltensscores mittels Varianzanalyse	80
4.2.8	Allel- und Genotypfrequenzen des Nukleotidaustausches im <i>DRD4</i> (Intron 1)	81
4.2.9	Einfluss des Nukleotidaustausches im <i>DRD4</i> auf Verhaltensscores mittels χ^2 -Test	82
4.2.10	Einfluss des Nukleotidaustausches im <i>DRD4</i> auf Verhaltensscores mittels Varianzanalyse	83
4.2.11	Allel- und Genotypfrequenzen des Nukleotidaustausches im <i>MAOA</i> (Exon XV)	83
4.2.12	Einfluss des Nukleotidaustausches im <i>MAOA</i> auf Verhaltensscores mittels χ^2 -Test	84
4.2.13	Einfluss des Nukleotidaustausches im <i>MAOA</i> auf Verhaltensscores mittels Varianzanalyse	85
4.2.14	Allel- und Genotypfrequenzen des Nukleotidaustausches im <i>SERT</i> (Intron 13)	86
4.2.15	Einfluss des Nukleotidaustausches im <i>SERT</i> auf Verhaltensscores mittels χ^2 -Test	87
4.2.16	Einfluss des Nukleotidaustausches im <i>SERT</i> auf Verhaltensscores mittels Varianzanalyse	88
4.2.17	Analyse der Mikrosatelliten auf BTA1	88
4.2.17.1	Varianzanalyse des Einflusses der Allele der Mikrosatelliten auf BTA1 auf die Verhaltensscores	90
4.2.18	Analyse der Mikrosatelliten auf BTA29	91
4.2.19	Kartierung des <i>DRD4</i> -Gens auf BTA29	93
4.2.20	QTL-Analysen für Verhaltensscores auf BTA1 und BTA29	96
5	DISKUSSION	99
6	ZUSAMMENFASSUNG	121
7	SUMMARY	122
8	LITERATURVERZEICHNIS	123
9	ANHANG	143

Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Funktionsweise der Tetra-Primer ARMS-PCR modifiziert nach Ye <i>et al.</i> (2001) am Beispiel eines G/A-Nukleotidaustausches.	58
Abbildung 2: Vergleich der eigenen Sequenz des amplifizierten <i>DRD4</i> -Fragmentes mit Sequenzen aus der Genbank für <i>Bos taurus</i> (BT, AY263349), <i>Homo sapiens</i> (HS, L12397) und <i>Equus caballus</i> (EC, EF561289) unter Angabe der Position der jeweiligen Gesamtsequenz und Hervorhebung des identifizierten SNP (G/T) durch graue Unterlegung. Identische Nukleotide zwischen den Sequenzen sind durch senkrechte Striche, Unterschiede durch Punkte und fehlende Nukleotide durch waagrechte Striche gekennzeichnet.	65
Abbildung 3: Ausschnitt aus der hier amplifizierten Nukleotidsequenz von <i>MAOA</i> , Intron 14 und Exon XV mit entsprechender Aminosäuresequenz; der Nukleotidaustausch (C/T) an Position 26 des Exons XV und der daraus resultierende Aminosäureaustausch sind grau unterlegt.	66
Abbildung 4: Sequenz des 198bp-Fragmentes aus <i>CCKBR</i> (Intron 3) mit Primersequenzen in Kleinbuchstaben, grau unterlegtem Nukleotidaustausch (Y=C/T) an Position 67, Markierung der Schnittstellen von <i>Bse</i> NI an den Positionen 67 und 144 durch ↓ und der Erkennungssequenz durch Unterstrich sowie der Transkriptionsfaktorenbindestelle für MZF1 in kursiver Schrift.	68
Abbildung 5: Genotypisierung des C/T-Austausches im <i>CCKBR</i> (Intron 3) durch PCR-RFLP-Analyse nach Inkubation mit <i>Bse</i> NI und Auftrennung im Agarosegel.	69
Abbildung 6: Sequenz des 113bp-Fragmentes aus <i>DRD4</i> (Intron 1) mit Primersequenzen in Kleinbuchstaben, grau unterlegtem Nukleotidaustausch (K=G/T) an Position 21 und Markierung der Schnittstelle von <i>Alw</i> 261 durch ↓ sowie der Erkennungssequenz durch Unterstrich.	69
Abbildung 7: Genotypisierung des G/T-Austausches im <i>DRD4</i> (Intron 1) durch PCR-RFLP-Analyse nach Inkubation mit <i>Alw</i> 261 und Auftrennung im Agarosegel.	70
Abbildung 8: Sequenz des 429bp-Fragmentes aus <i>MAOA</i> (Intron 14 und Exon XV) mit Primersequenzen in Kleinbuchstaben, grau unterlegtem Nukleotidaustausch (Y=C/T) an Position 224 und Markierung der Schnittstellen von <i>Mn</i> II durch ↓ sowie der Erkennungssequenz durch Unterstrich.	70
Abbildung 9: Genotypisierung des Nukleotidaustausches im <i>MAOA</i> , Exon XV durch PCR-RFLP-Analyse nach Inkubation mit <i>Mn</i> II und Auftrennung im Agarosegel.	71
Abbildung 10: Sequenz des Kontrollfragmentes der äußeren Primer aus <i>CCKBR</i> (3'UTR) mit grau unterlegtem Nukleotidaustausch (Y=C/T) an Position 147 und Darstellung der Primerbindungsstellen in Kleinbuchstaben, wobei die der äußeren Primer kursiv und die der inneren Primer in fett dargestellt sind. Der Primer CCKBR_3'UTR_In_F bindet von Position 120 bis 147 und der Primer CCKBR_3'UTR_In_R von Position 147 bis 174.	72
Abbildung 11: Genotypisierung des C/T-Austausches im <i>CCKBR</i> (3'UTR) durch Tetra-Primer ARMS-PCR mit Auftrennung der allelspezifischen PCR-Produkte und Kontrollfragment der äußeren Primer (266 bp) im Agarosegel.	72
Abbildung 12: Sequenz des Kontrollfragmentes der äußeren Primer aus <i>SERT</i> (Intron 13) mit grau unterlegtem Nukleotidaustausch (R=A/G) an Position 207 und Darstellung der Primerbindungsstellen in Kleinbuchstaben, wobei die der äußeren Primer kursiv und die der inneren Primer in fett dargestellt sind. Der Primer BT_SERTP_IN_F bindet von Position 181 bis 207 und der Primer BT_SERTP_IN_R von Position 207 bis 232.	73
Abbildung 13: Genotypisierung des G/A-Austausches im <i>SERT</i> (Intron 13) durch Tetra-Primer ARMS-PCR mit Auftrennung der allelspezifischen PCR-Produkte und Kontrollfragment der äußeren Primer (375bp) im Agarosegel.	73

- Abbildung 14:** Darstellung von Mikrosatellitenallelen am ALFexpress der Mikrosatelliten *BMS1928* und *DIK634* bei sechs verschiedenen Tieren (Reihe 11 bis 16) mit externem Größenmarker in Reihe 10, dessen Allele durch blaue Kreise gekennzeichnet sind. Die Allele der Mikrosatelliten sind mit roten Quadraten gekennzeichnet und die entsprechenden Größen der Peaks in Basenpaaren manuell eingefügt. Die mit grünen Kreisen markierten Peaks in den Reihen 11 bis 16 stellen die internen Größenmarker (124/202/266) dar. 74
- Abbildung 15:** Darstellung von Mikrosatellitenallelen am ABI PRISM[®] 377 DNA Sequencer von *OarHH22* und *BMS1857* bei vier Tieren (Tier 1-4). Unterhalb jedes Allelpeaks befindet sich ein oberes Kästchen mit Angabe der definierten Allelgröße und ein unteres mit der effektiv gemessenen Größe. 75
- Abbildung 16:** Gegenüberstellung der Allelfrequenzen des Nukleotidaustausches im *CCKBR* im Intron 3 bezüglich der Extremwerte der vergebenen Verhaltensscores (1 = ruhig und 5 = extrem nervös/aufgeregt) für die Kälber der Rassen Dt. Angus und Dt. Fleckvieh unter Angabe der Signifikanzen und der Anzahl (n) Kälber der jeweiligen Klassen. 78
- Abbildung 17:** Gegenüberstellung der Allelfrequenzen des Nukleotidaustausches im *CCKBR* in der 3'UTR bezüglich der Extremwerte der vergebenen Verhaltensscores (1 = ruhig und 5 = extrem nervös/aufgeregt) für die Kälber der Rassen Dt. Angus und Dt. Fleckvieh unter Angabe der Signifikanzen und der Anzahl (n) Kälber der jeweiligen Klassen. 80
- Abbildung 18:** Gegenüberstellung der Allelfrequenzen des Nukleotidaustausches im *DRD4* bezüglich der Extremwerte der vergebenen Verhaltensscores (1 = ruhig und 5 = extrem nervös/aufgeregt) für die Kälber der Rassen Dt. Angus und Dt. Fleckvieh unter Angabe der Signifikanzen und der Anzahl (n) Kälber der jeweiligen Klassen. 82
- Abbildung 19:** Gegenüberstellung der Allelfrequenzen des Nukleotidaustausches im *MAOA* bezüglich der Extremwerte der vergebenen Verhaltensscores (1 = ruhig und 5 = extrem nervös/aufgeregt) für die Kälber der Rassen Dt. Angus und Dt. Fleckvieh unter Angabe der Signifikanzen und der Anzahl (n) Kälber der jeweiligen Klassen. 85
- Abbildung 20:** Gegenüberstellung der Allelfrequenzen des Nukleotidaustausches im *SERT* bezüglich der Extremwerte der vergebenen Verhaltensscores (1 = ruhig und 5 = extrem nervös/aufgeregt) für die Kälber der Rassen Dt. Angus und Dt. Fleckvieh unter Angabe der Signifikanzen und der Anzahl (n) Kälber der jeweiligen Klassen. 87
- Abbildung 21:** Kartierung von *DRD4* mittels zehn Mikrosatellitenmarkern auf BTA29 (29-1 – 29-10) in beiden Rassen getrennt und über beide Rassen hinweg. Die Lokalisationsangaben sind in centiMorgan (cM) auf der jeweils linken Seite angegeben, davon ausgehend, dass *BMS1857* der proximalste Marker bei 0 cM ist und die Markernamen sind auf der jeweils rechten Seite angeschrieben. 94
- Abbildung 22:** Kartierung von *DRD4* mittels 14 Mikrosatellitenmarkern auf BTA29 (29-1 – 29-14) mit einer detaillierteren Auftrennung des distalen Abschnittes in beiden Rassen getrennt. Die Lokalisationsangaben sind in centiMorgan (cM) auf der jeweils linken Seite angegeben, davon ausgehend, dass *BMS1857* der proximalste Marker bei 0 cM ist und die Markernamen sind auf der jeweils rechten Seite angeschrieben. 95
- Abbildung 23:** Graphische Darstellung der Ergebnisse der QTL-Analyse der Mikrosatelliten auf BTA1 mit relativen Lokalisationsangaben auf der X-Achse und Angabe des erreichten F-Wertes auf der Y-Achse für jeden Mikrosatelliten und die Verhaltensscores MIN2AT, SCEINWT, SCWGWT und SCAT sowie Kennzeichnung des 5%-Signifikanzniveaus für die Rasse Dt. Angus. 97
- Abbildung 24:** Graphische Darstellung der Ergebnisse der QTL-Analyse der Mikrosatelliten auf BTA1 mit relativen Lokalisationsangaben auf der X-Achse und Angabe des erreichten F-Wertes auf der Y-Achse für jeden Mikrosatelliten und die Verhaltensscores MIN2AT, SCEINWT, SCWGWT und SCAT sowie Kennzeichnung des 5%-Signifikanzniveaus für die Rasse Dt. Fleckvieh. 97

Abbildung 25: Graphische Darstellung der Ergebnisse der QTL-Analyse der Mikrosatelliten 29-1 bis 29-10 auf BTA29 mit relativen Lokalisationsangaben der eigenen Karte (Abbildung 21) auf der X-Achse und Angabe des erreichten F-Wertes auf der Y-Achse für jeden Mikrosatelliten und die Verhaltensscores MIN2AT, SCEINWT, SCWGWT und SCAST sowie Kennzeichnung des 5%-Signifikanzniveaus für die Rasse Dt. Angus.	98
Abbildung 26: Graphische Darstellung der Ergebnisse der QTL-Analyse der Mikrosatelliten auf BTA29 mit relativen Lokalisationsangaben der eigenen Karte (Abbildung 21) auf der X-Achse und Angabe des erreichten F-Wertes auf der Y-Achse für jeden Mikrosatelliten und die Verhaltensscores MIN2AT, SCEINWT, SCWGWT und SCAST sowie Kennzeichnung des 5%-Signifikanzniveaus für die Rasse Dt. Fleckvieh.	98
Abbildung 27: Ausschnitt der vergleichenden Kartierung HSA11, Block I (in 10 ⁶ bp) mit der Lokalisation des humanen <i>DRD4</i> und distaler Abschnitt von BTA29 (in cR ₅₀₀₀) nach Larkin <i>et al.</i> (2003).	114
Abbildung 28: Ausschnitt des distalen Abschnittes der vergleichenden Karten von BTA29 aus Ajmone Marsan <i>et al.</i> (2008).	115
Abbildung 29: Schematische Darstellung des proximalen Abschnittes von BTA1 mit den Positionen des QTL von Gutiérrez-Gil <i>et al.</i> (2008) und des Polled Locus nach Schmutz <i>et al.</i> (1995) und Drögemüller <i>et al.</i> (2005) sowie Darstellung des proximalsten in dieser Arbeit untersuchten Mikrosatelliten <i>BMS1928</i> und des QTL von Schmutz <i>et al.</i> (1995), aufgrunddessen diese Untersuchung durchgeführt wurde.	117
Abbildung 30: Schematische Darstellung der telomerischen Abschnitte von BTA29 mit den Positionen der QTL von Hiendleder <i>et al.</i> (2003) und Gutiérrez-Gil <i>et al.</i> (2008) sowie der genetisch kartierten Lokalisation des <i>DRD4</i> und den in dieser Arbeit detektierten putativen QTL beider Rassen und Bereich des Anstiegs des F-Wertes bei FV.	120

Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1: Aufstellung der Halbgeschwisterfamilien nach Rassen getrennt, mit Nachkommenzahlen je Jahr und nach Geschlechtern getrennt.	31
Tabelle 2: Bewertung der Kälber der Jahrgänge 1998 – 2001 für den Score MIN2AT.	32
Tabelle 3: Bewertung der Kälber der Jahrgänge 1998 – 2001 für den Score SCEINWT.	33
Tabelle 4: Bewertung der Kälber der Jahrgänge 1998 – 2001 für den Score SCWGW.	33
Tabelle 5: Bewertung der Kälber der Jahrgänge 1998 – 2001 für den Score SCAS.	34
Tabelle 6: Größen der verwendeten externen und internen Marker zur Größenbestimmung am ALFexpress in Basenpaaren.	40
Tabelle 7: Die zur Analyse der Kandidatengene verwendeten Primer mit Sequenzen, den Größen und Genbereichen der amplifizierten Produkte sowie der Einsatz der Primer.	47
Tabelle 8: PCR-Bedingungen mit <i>Taq</i> -Polymerase der Kandidatengene <i>CCKBR</i> , <i>DRD4</i> , <i>MAOA</i> und <i>SERT</i> mit je 0,2 mM je Base Didesoxynucleotidtriphosphaten und Angabe der vom Testprotokoll (siehe 3.2.3.2) abweichenden Zyklendauern, Annealingtemperatur und Elongationszeit.	48
Tabelle 9: Alle analysierten Mikrosatelliten mit Angabe ihrer Lokalisation auf dem jeweiligen Chromosom sowie den Literaturangaben zu Allelgrößen und Anzahl der Allele nach MARC USDA (http://www.marc.usda.gov/genome/htmls).	49
Tabelle 10: Bedingungen für die PCR-Reaktionen mit <i>Taq</i> -Polymerase der Mikrosatelliten <i>BMS574</i> , <i>BMS1928</i> , <i>DIK634</i> und <i>BMS1787</i> nach dem angepassten Testprotokoll (siehe 3.2.3.2) mit 30 Zyklen zu je 30 Sekunden und den geänderten Bedingungen.	50
Tabelle 11: Zusammenstellung der Mikrosatelliten der Multiplex (MP) PCR-Reaktionen für BTA1 und BTA29 mit Angabe der Abweichungen des Standardprotokolls (siehe 3.2.3.3) bei Primerkonzentrationen, Annealingtemperaturen und Dauer der einzelnen Abschnitte der Zyklen sowie der abschließenden Elongation.	50
Tabelle 12: Primer mit Sequenzen und Farbstoff zur Analyse der Mikrosatelliten auf BTA1 und BTA29.	51
Tabelle 13: Ansätze zur restriktionsenzymatischen Spaltung der PCR-Produkte mit Nukleotidaustauschen der Kandidatengene <i>CCKBR</i> , <i>DRD4</i> und <i>MAOA</i> sowie die Inkubationstemperaturen.	57
Tabelle 14: Zur elektrophoretischen Auftrennung der Fragmente der PCR-RFLP-Analysen verwendete Agarosegellkonzentrationen und Laufbedingungen.	57
Tabelle 15: Genbereiche und identifizierte Nukleotidaustausche, Lokalisationsbezeichnungen in Genbanksequenzen und Besonderheiten.	67
Tabelle 16: Signifikanzniveaus der untersuchten Einflussfaktoren des für die Varianzanalysen und QTL-Analysen verwendeten Grundmodells getrennt nach Rassen und den vier verschiedenen Scores.	76
Tabelle 17: Allel- und Genotypfrequenzen des Nukleotidaustausches in <i>CCKBR</i> (Intron 3) der Kälber beider Rassen sowie das Testergebnis über das Vorliegen des Hardy-Weinberg-Gleichgewichtes.	77
Tabelle 18: LSQ-Mittelwerte und Standardfehler (in Klammern) der Verhaltensscores für den Effekt des Genotyps im <i>CCKBR</i> (Intron 3) bei den Rassen Dt. Angus und Dt. Fleckvieh.	79
Tabelle 19: Signifikanzniveau des Einflusses des Genotyps im <i>CCKBR</i> (Intron 3) auf die Verhaltensscores unter Berücksichtigung der unter 4.2.1 Einflussfaktoren.	79
Tabelle 20: Allel- und Genotypfrequenzen des Nukleotidaustausches in <i>CCKBR</i> (3'UTR) der Kälber beider Rassen.	79
Tabelle 21: LSQ-Mittelwerte und Standardfehler (in Klammern) der Verhaltensscores für den Effekt des Genotyps im <i>CCKBR</i> (3'UTR) bei den Rassen Dt. Angus und Dt. Fleckvieh.	81

Tabelle 22: Signifikanzniveau des Einflusses des Genotyps im <i>CCKBR</i> (3'UTR) auf die Verhaltensscores unter Berücksichtigung der unter 4.2.1 genannten Einflussfaktoren. ..	81
Tabelle 23: Allel- und Genotypfrequenzen des Nukleotidaustausches in <i>DRD4</i> (Intron 1) der Kälber beider Rassen sowie das Testergebnis über das Vorliegen des Hardy-Weinberg-Gleichgewichtes.	82
Tabelle 24: LSQ-Mittelwerte und Standardfehler (in Klammern) der Verhaltensscores für den Effekt des Genotyps im <i>DRD4</i> (Intron 1) bei den Rassen Dt. Angus und Dt. Fleckvieh.	83
Tabelle 25: Signifikanzniveau des Einflusses des Genotyps im <i>DRD4</i> (Intron 1) auf die Verhaltensscores unter Berücksichtigung der unter 4.2.1 genannten Einflussfaktoren. ..	83
Tabelle 26: Allel- und Genotypfrequenzen des Nukleotidaustausches in <i>MAOA</i> (Exon XV) bei Dt. Angus und Dt. Fleckvieh nach Geschlechtern getrennt.	84
Tabelle 27: Signifikanzniveau des Einflusses des Genotyps im <i>MAOA</i> (Exon XV) auf die Verhaltensscores unter Berücksichtigung der in 4.2.1 genannten Einflussfaktoren.	86
Tabelle 28: LSQ-Mittelwerte und Standardfehler (in Klammern) der Verhaltensscores für den Effekt des Genotyps im <i>MAOA</i> bei den bei den Rassen Dt. Angus und Dt. Fleckvieh nach Geschlechtern getrennt.	86
Tabelle 29: Allel- und Genotypfrequenzen des Nukleotidaustausches im <i>SERT</i> (Intron 13) beider Rassen.	87
Tabelle 30: LSQ-Mittelwerte und Standardfehler (in Klammern) der Verhaltensscores für den Effekt des Genotyps im <i>SERT</i> (Intron 13) bei den Rassen Dt. Angus und Dt. Fleckvieh.	88
Tabelle 31: Signifikanzniveau des Einflusses des Genotyps im <i>SERT</i> auf die Verhaltensscores unter Berücksichtigung der in 4.2.1 genannten Einflussfaktoren.	88
Tabelle 32: Prozentuale Häufigkeiten der Mikrosatellitenallele von <i>BMS1928</i> , <i>DIK634</i> , <i>BMS574</i> , <i>BMS4020</i> und <i>DIK4957</i> auf BTA1 für die beiden Rassen und die jeweiligen Standardallele.	89
Tabelle 33: Signifikanzniveau der in der Varianzanalyse gegen das Standardallel untersuchten Substitutionseffekte der Allele mit >5% prozentualer Häufigkeit der Mikrosatelliten auf BTA1.	90
Tabelle 34: Allelsubstitutionseffekte mit Standardfehlern der Allele nahe der Signifikanzgrenze mit dem entsprechenden Merkmal und der Rasse.	91
Tabelle 35: Prozentuale Häufigkeiten der Mikrosatellitenallele von BTA29 innerhalb der beiden Rassen mit prozentualer Angabe der erfolgreichen Typisierungen für jeden Mikrosatellit über beide Rassen hinweg.	92
Tabelle 36: Anteil der informativen Meiosen der Mikrosatelliten auf BTA29 bei beiden Rassen und der Polymorphic Information Content (PIC) der einzelnen Marker.	93
Tabelle 37: In der χ^2 -Analyse berücksichtigte Tierzahlen der jeweiligen Extremwerte der Scores.	103
Tabelle 38: Vergleich der p-Werte der in einer der beiden Analysen (χ^2 -Test und Varianzanalyse) signifikanten Assoziation für die Polymorphismen der Kandidatengene <i>CCKBR</i> , <i>DRD4</i> und <i>SERT</i> mit den entsprechenden Merkmalen in den jeweiligen Rassen.	104
Tabelle 39: Allelfrequenzen des Nukleotidaustausches im <i>CCKBR</i> (Intron 3) der Kälber im Vergleich mit den Allelfrequenzen innerhalb der Rasse.	109
Tabelle 40: Allelfrequenzen des Nukleotidaustausches im <i>CCKBR</i> (3'UTR) der Kälber im Vergleich mit den Allelfrequenzen innerhalb der Rasse.	109
Tabelle 41: Allelfrequenzen des Nukleotidaustausches im <i>DRD4</i> (Intron 1) der Kälber im Vergleich mit den Allelfrequenzen innerhalb der Rasse.	109
Tabelle 42: Alle analysierten Mikrosatelliten mit Literaturangaben zu Allelgröße (in bp) und Allelanzahl (n) nach MARC USDA (http://www.marc.usda.gov/genome/htmls) im	

Vergleich mit den eigenen Ergebnissen je Rasse und Gesamtallelanzahl (Gesamt n) über beide Rassen hinweg	112
--	-----

Tabellen im Anhang

Tabelle 1A: Häufigkeit der Größen (1 bis 5) der Vollgeschwistergruppen für die Bullen mit Gesamtzahl Nachkommen und Dauer des Einsatzes des Bullens.	143
Tabelle 2A: Auflistung der zur Bestimmung der Allelfrequenzen der Polymorphismen innerhalb der Rassen verwendeten Mütter.	144
Tabelle 3A: Typisierungsergebnisse der eingesetzten Bullen für die Nukleotidaustausche der Kandidatengene <i>CCKBR</i> , <i>DRD4</i> , <i>MAOA</i> und <i>SERT</i>	145
Tabelle 4A: Typisierungsergebnisse der eingesetzten Bullen für die Mikrosatelliten auf BTA1 (1-1 – 1-5) mit Anzahl der heterozygoten Marker je Bulle.....	145
Tabelle 5A: Typisierungsergebnisse der eingesetzten Bullen für die ersten zehn Mikrosatelliten auf BTA29 (29-1 – 29-10) mit Anzahl der heterozygoten Marker je Bulle.....	146
Tabelle 6A: Typisierungsergebnisse der eingesetzten Bullen für die weiteren vier Mikrosatelliten auf BTA29 (29-11 – 29-14) mit Anzahl der heterozygoten Marker je Bulle.....	147
Tabelle 7A: Typisierungsergebnisse der Mikrosatelliten der Referenzprobe „Giessen2000“ (= Dablau25) aus dem EU-Projekt RESGEN CT98-118.....	147

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μl	Mikroliter
5HT	Serotonin
5HTT	Serotonintransporte
5HTTLPR	Serotonintransportergene-linked-polymorphic-region
6-FAM	Fluoreszenzfarbstoff für Oligonukleotide
A,a	Adenin
ADH	Aufmerksamkeits-Defizit-Syndrom mit Hyperaktivität
<i>Alw26I</i>	Restriktionsenzym <i>Alw26I</i>
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
bp	Basenpaare
<i>BseNI</i>	Restriktionsenzym <i>BseNI</i>
BT	<i>Bos taurus</i>
BTA	<i>Bos taurus</i> Autosom
bzw.	beziehungsweise
C,c	Cytosin
ca.	circa
CCK	Cholecystokinin
CCKAR	Cholecystokininrezeptor A
CCKBR	Cholecystokininrezeptor B
cDNA	Complementary DNA
cM	centiMorgan
Cy5	Fluoreszenzfarbstoff für Oligonukleotide
Cys	Cystein
DA	Deutsch Angus
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
DRD4	Dopaminrezeptor D4
Dt. / dt.	Deutsch / deutsch
EC	<i>Equus caballus</i>
<i>et al.</i>	<i>et alia</i>
exkl.	exklusive
FAD	Flavin-Adenin-Dinucleotid
for.	Forward Primer
FV	Dt. Fleckvieh
G,g	Guanin
HF	Holstein Friesian
HS	<i>Homo sapiens</i>
HWG	Hardy-Weinberg-Gleichgewicht
K	Nukleotidaustausch von Guanin und Thymin
kb	Kilobasenpaare
kDa	kiloDalton
Leu	Leucin
M	Molar
mA	milliampere
MAOA	Monoaminoxidase A
MAOB	Monoaminoxidase B

mg	Milligramm
Mg ²⁺	Magnesium
min	Minute
MIN2AT	Score des Anbindetestes
ml	Milliliter
mM	millimolar
<i>Mn</i> /I	Restriktionsenzym <i>Mn</i> /I
mRNA	Messenger RNA
n	Anzahl
n.s.	nicht signifikant
NED	Fluoreszenzfarbstoff für Oligonukleotide
NEO-PI-R	Fragebogen zur Messung des Fünf-Faktoren-Modells der Persönlichkeit
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
PD	Panic Disorders
pH	pH-Wert
PIC	Polymorphic Information Content
pmol	Picomol
Pos.	Position
Pro	Prolin
QTL	Quantitative Trait Locus
R	Nukleotidaustausch von Adenin und Guanin
rev.	Reverse Primer
RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	rounds per minute
RT-PCR	Real Time-PCR
s	Sekunde
SCAST	Score des Separier- und Rückhaltetestes
SCEINWT	Score beim Betreten der Waage
SCWGW	Score während des Wiegens
SERT	Serotonintransporter
SLC6A4	Serotonintransporte
SNP	Single Nucleotid Polymorphism (Einzelnukleotidaustausch)
SSR	Simple Sequence Repeat
SSRI	Selective Serotonin Reuptake Inhibitor
T,t	Thymin
TM	Transmembranäre Domäne
TPQ	Tridimensional Personality Questionnaire
U	Unit
UTR	Untranslated Region
V	Volt
VNTR	Variable Number of Tandem Repeats
w/v	Gewichtsprozent
x	-fach
Y	Nukleotidaustausch von Cytosin und Thymin

1 Einleitung

Die Bedeutung der Molekulargenetik in der Tierzucht nimmt immer mehr zu. Für das Rind konnten Gentests zum Nachweis von Erbkrankheiten wie zum Beispiel Bovine Leukozytenadhäsionsdefizienz (BLAD, direkter Nachweis (Kehrli *et al.* 1992; Shuster *et al.* 1992)) oder Weaver (Bovine Progressive Degenerative Myeloencephalopathie, indirekter Nachweis (Georges *et al.* 1993a; Hoeschele und Meinert 1990)) entwickelt werden, mit deren Hilfe Tiere mit entsprechendem Defektallel identifiziert werden können. Auch im Rahmen der markergestützten Selektion greifen molekulargenetische Methoden in die Rinderzucht ein, um die Selektion der Tiere, besonders der Bulleneltern, nicht nur auf phänotypischer Ebene durchzuführen und dadurch den Zuchtfortschritt zu erhöhen.

Neben den zurzeit in Deutschland in der Tierzucht gängigen molekulargenetischen Anwendungen im Bereich der Gesundheit/Erbkrankheiten der Rinder können auch die potentiell möglichen Leistungen der Tiere auf molekulargenetischer Ebene dargestellt werden. Hier sei als Beispiel das für die Diacylglycerol-O-acyltransferase (DGAT1) kodierende Gen mit einer Lysin-Alanin-Substitution (K232A) genannt, wobei das Lysin-Allel mit höherem Milchfettgehalt assoziiert ist (Kaupe *et al.* 2004; Thaller *et al.* 2003; Winter *et al.* 2002). Auch die genetischen Varianten der Kaseine (Kappa-Kaseine) in der Milch, durch die sich verschiedene Proteinmengen (Ng-Kwai-Hang *et al.* 1984) und unterschiedliche Käseereitauglichkeit ergeben, werden untersucht (Landeskuratorium der Erzeugerringe für tierische Veredelung in Bayern e.V. 2006). Neben den molekulargenetischen Tests für Gesundheit und Leistung gibt es auch Gentests zum Beispiel für die Fellfarbe, wie den Rotfaktor bei schwarzbunten Dt. Holstein Bullen (Klungland *et al.* 1995, GeneControl GmbH, Grub, www.genecontrol.de).

Ein aufgrund des Wandels in der Landwirtschaft neben der Gesundheit und Leistung der Tiere immer wichtiger werdender Aspekt ist das Verhalten der Tiere gegenüber dem Menschen. Dies ist besonders im Bereich der Rinder zu sehen, da es hier immer häufiger eine Umstrukturierung von Milchviehhaltung zu Mutterkuhhaltung gibt. Der Anteil der Ammen- und Mutterkuhhaltung am Gesamtrinderbestand in Deutschland lag 1984 noch bei 0,5% und ist dann kontinuierlich bis 2007 auf 5,2% gestiegen (Statistisches Bundesamt 2007; seit 2008 keine separate Erfassung der Mutterkühe mehr). Durch den geringeren Mensch-Tier-Kontakt bei dieser im Vergleich zur Milchkuhhaltung oft extensiveren Haltungsform ist das instinktive Verhalten der Tiere dem Menschen gegenüber von entscheidender Bedeutung für die beiderseitige Sicherheit. Auch aus Sicht des Tierschutzes hat das Verhalten der Tiere einen hohen Stellenwert, da unruhiges Verhalten auch immer ein größeres Verletzungsrisiko birgt.

Für Verhalten gibt es verschiedene Definitionen (Mathiak 2002; Urban 2007) und die Einschätzung tierischen Verhaltens ist oft von subjektiven Eindrücken geprägt, was die objektive Erfassung dieses komplexen und multifaktoriellen Merkmals erschwert (Andersson und Georges 2004).

Die hier vorliegende Arbeit befasst sich mit den verschiedenen molekulargenetischen Ansätzen zur Erfassung von Genvarianten mit Einfluss auf das Verhalten von Mutterkuhrassen; im speziellen das Verhalten der Kälber der Rassen Dt. Angus und Dt. Fleckvieh in standardisierten Testsituationen.

Ziel ist die Identifizierung von genetischen Polymorphismen in Kandidatengenen sowie Mutationen in Chromosomenabschnitten, die funktionell oder positionell mit Verhaltensausprägungen in Verbindung stehen könnten. Diese Varianten werden auf ihre Assoziation zu erhobenen Verhaltensmerkmalen in Standardtestsituationen analysiert. Mit positiv getesteten Varianten wird die Entwicklung von Gentests und Nutzung in der Markergestützten Selektion bei der Zucht von extensiv genutzten Mutterkuhrassen angestrebt.

2 Literaturübersicht

2.1 Temperament und Umgänglichkeit bei Rindern

Temperament eines Tieres ist definiert als die Reaktion eines Tieres auf Handling durch den Menschen (Burrow 1997) und wird auch als Umgänglichkeit des Tieres bezeichnet (Grignard *et al.* 2000). Diese Umgänglichkeit ist in der täglichen Arbeit mit Tieren, besonders mit Rindern, von Bedeutung, sowohl für die Arbeitssicherheit als auch hinsichtlich des Tiereschutzes und auch aus ökonomischen Gesichtspunkten. Zum Einen ist die Arbeit mit umgänglichen Rindern sicherer (Grandin 1993) und gleichzeitig zeitsparender, was wiederum Arbeitszeitkosten einspart (Becker und Lobato 1997). Zum Anderen haben ruhigere Tiere bessere Zunahmen (Tulloh 1961b; Voisin *et al.* 1997) und höhere Fleischqualität (Fordyce *et al.* 1988b) als ihre unruhigeren Artgenossen.

Mit den im Vergleich zu *Bos taurus* Rindern im Verhalten schwierigeren *Bos indicus* Rindern konnte festgestellt werden, dass ein Umgang mit Kälbern im frühen Alter (1-2 Monate) schon positive Auswirkungen auf das spätere Verhalten der Tiere haben kann (Becker und Lobato 1997). Ebenso entscheidend für das spätere Verhalten von Tieren in Handlingsituationen ist aber der Umgang mit ihnen kurz nach dem Absetzen (Boivin *et al.* 1992). In der praktischen Mutterkuhhaltung sind solche Trainingseinheiten aber nicht oder nur sehr schwer umsetzbar. Somit kommt dem tierereigenen Grundverhalten eine besondere Bedeutung zu, da der Mensch-Tier-Kontakt in dieser Haltungsform in der Regel eher eingeschränkt ist (Gauly *et al.* 2001).

Im Bereich der Fleischrinder und Mutterkühe gibt es schon seit längerem Studien, das Verhalten der Tiere zu evaluieren und dann diese Erkenntnisse züchterisch zu nutzen (Fordyce *et al.* 1988a; Tulloh 1961a).

In diesem Zusammenhang wurden verschiedene Testverfahren entwickelt, die in den täglichen Arbeitsablauf integrierbar sind und auch verschiedene Aspekte des Verhaltens berücksichtigen. Bei diesen Tests werden zuvor definierte Scores für bestimmte Verhaltensweisen vergeben, wobei niedrige Scores für ruhige und hohe Scores für nervöse und/oder aggressive Tiere stehen. Die Tests werden in Tests mit Einschränkung der Beweglichkeit des Tieres und Tests ohne Bewegungseinschränkung eingeteilt (Mathiak 2002; Urban 2007). Erstere dienen der Erfassung des Temperamentes in fixierten Momenten, wie sie bei verschiedenen Handlingsituationen mit Rindern, zum Beispiel tierärztlicher Behandlung, vorkommen. Die zweite Variante kann die Angst vor Menschen in Kombination mit der natürlichen Neugierde der Tiere sowie das Erkundungsverhalten erfassen. Zu den Tests mit

Bewegungseinschränkung zählen zum Beispiel der Anbindetest und der Wiegetest. Bei dem Anbindetest werden die Kälber mittels Kopfstrick für eine festgelegte Zeitdauer fixiert und die Bewegungsaktivität oder auch Lautäußerungen, Harn- und Kotabsatz als Parameter zur Beurteilung des Verhaltens herangezogen (Boissy und Bouissou 1988; Mathiak 2002). Im Rahmen des Wiegetestes (Fordyce *et al.* 1988a; Grandin 1993; Tulloh 1961a; Tulloh 1961b) wird das Verhalten der Tiere in verschiedenen Phasen des Wiegevorganges bewertet. Dieser Test kann auch noch um den Aspekt der Fluchtgeschwindigkeit bei Verlassen der Waage ergänzt werden. Vorteil dieses Testes ist die Praxisnähe, da die Tiere im Zuge des regulären Produktionsablaufes generell gewogen werden müssen. Als Test ohne Bewegungseinschränkung für das Tier gilt der kombinierte Separier- und Rückhaltetest, bei dem das Verhalten eines Tieres mit und ohne Anwesenheit einer Person geprüft werden kann (Le Neindre *et al.* 1995). Allerdings ist der Test mit Anwesenheit einer Person aussagekräftiger bezüglich des Temperamentes (Burrow 1997). Im Rahmen dieses Testverfahrens werden Scores von verschiedenen Personen (der Handler selbst und unbeteiligte Beobachter) vergeben und ein Mittelwert gebildet (Gauly *et al.* 2001).

Mithilfe der verschiedenen Testverfahren wurden in einigen Studien Heritabilitäten für Temperament bei unterschiedlichen Fleischrinderrassen geschätzt. Für Kälber der Rassen Hereford, Simmental und HF konnten Heritabilitäten von $0,03 \pm 0,28$ geschätzt werden (Hearnshaw und Morris 1984). Bei Deutsch Angus liegen die Werte zwischen $0,02 \pm 0,05$ und $0,33 \pm 0,24$ und bei Deutsch Fleckvieh zwischen $0,0$ und $0,29 \pm 0,12$ (Gauly *et al.* 2002).

2.2 Molekulargenetische Charakterisierung von Phänotypen

Die molekulargenetische Charakterisierung von Phänotypen stellt die Grundlage für die Etablierung molekularer Gendiagnostik dar. Hierfür stehen verschiedene DNA-Marker wie Mikrosatelliten und Polymorphismen in Genen, meist Single Nucleotid Polymorphismen (SNPs), zur Verfügung. Durch Typisierung solcher Marker in geeignetem und phänotypisch erfasstem Tiermaterial kann der genetische Einfluss auf den Phänotyp analysiert und dieses Ergebnis weiter genutzt werden.

2.2.1 Analyse von Mikrosatelliten

Mikrosatelliten, auch als „Simple Sequence Repeat“ (SSR) bezeichnet (Moore *et al.* 1994), sind Abschnitte der DNA, die aus sich wiederholenden Sequenzmotiven mit bis zu sechs Basen bestehen. Sie sind bei allen Eukaryoten zu finden, wobei besonders häufig die Varianten „TG“ und „CA“ auftreten (Hamada *et al.* 1982; Hamada *et al.* 1984; Tautz und

Renz 1984). Die Einteilung der Mikrosatelliten erfolgt nach dem Aufbau ihrer Basenabfolgen und sie werden entsprechend als perfekte, imperfekte oder zusammengesetzte Mikrosatelliten bezeichnet (Weber 1990).

Mikrosatelliten sind auf allen Chromosomen zu finden und machen fast 50% des humanen Genoms aus (Makalowski 2001). Sie treten primär in nicht-kodierenden Bereichen des Genoms auf, wurden aber auch schon sehr früh in codierenden Abschnitten nachgewiesen (Hamada *et al.* 1984). Für *Bos taurus* befinden sich zurzeit über 18.200 Einträge für Mikrosatelliten in der Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=unists>, letzter Zugriff 20.04.2009). Naylor und Clark (1990) konnten am Beispiel des Prolaktin-Gens bei Ratten darstellen, dass Mikrosatelliten in der Nähe von Genen einen Einfluss auf deren Transkription haben können.

Die Mutationsrate bei Mikrosatelliten ist mit 10^{-2} Ereignissen je Generation je Genort bei *E.coli*, 10^{-4} bei Hefen und 10^{-3} beim Menschen sehr hoch (Hancock 1999). Diese hohe Mutationsrate kann durch das Slippage-Model in eventueller Kombination mit ungleichen Crossing Over-Ereignissen erklärt werden (Holtkemper *et al.* 2001; Levinson und Gutman 1987). DNA-Slippage bedeutet, dass sich bei der Replikation die beiden DNA-Stränge voneinander trennen und sich ungleich, also außerhalb des existierenden Rasters, wieder anlagern. Dies ist nur bei repetitiven Sequenzen möglich und ändert bei weiterer Replikation die Länge des neuen DNA-Stranges durch Hinzufügen oder Fehlen von Repetitionen des Mikrosatellitenmotives, was wiederum zu verschiedenen Allelen führt.

Die Nutzung von Mikrosatelliten ist aufgrund ihrer kodominanten Vererbung, dem häufigen Vorkommen und dem hohen Polymorphiegrad sehr vielfältig. Schon früh wurden die Vorteile der Mikrosatellitennutzung, geringer Verbrauch an DNA und die Möglichkeit zur Automatisierung, erkannt (Tautz 1989). Sie sind durch den hohen Polymorphiegrad gut für Kopplungsanalysen (Litt und Luty 1989) geeignet, werden aber zum Beispiel auch in der Populationsgenetik, phylogenetischen Fragestellungen und bei der Erstellung von Genomkarten eingesetzt (Schlötterer *et al.* 1997).

2.2.2 Genetische Kartierung mittels Mikrosatelliten

Die genetische Kartierung oder auch Kopplungsanalyse bestimmt den relativen Abstand der verwendeten Marker auf dem Chromosom anhand der Rekombinationsfrequenz der verschiedenen Allele. Als Marker kommen alle DNA-Varianten in Frage, wobei die Mikrosatelliten aufgrund ihres hohen Polymorphiegrades, der in einem hohen Polymorphic Information Content (PIC) (Botstein *et al.* 1980) resultiert, am zweckmäßigsten sind. Die

Einheit einer solchen Karte ist centiMorgan (cM), wobei ein cM einer Rekombinationsfrequenz von einem Prozent entspricht. Mehrere Karten für das Rindergenom oder auch einzelner Chromosomen wurden mit dieser Methode erstellt (Barendse *et al.* 1994; Barendse *et al.* 1993; Barendse *et al.* 1997; Ihara *et al.* 2004; Itoh *et al.* 2005).

2.2.3 QTL-Studien

Quantitative Merkmale, zu denen auch das Verhalten zählt, sind aufgrund ihrer komplexen physiologischen Aspekte durch verschiedene Gene und Chromosomenabschnitte kontrolliert (Geldermann 1975) und durch Umweltfaktoren beeinflusst (Andersson 2001; Dekkers und Hospital 2002). Ein Abschnitt des Genoms, der ein quantitatives Merkmal beeinflusst, wird als „Quantitative Trait Locus“ (QTL) bezeichnet (Andersson 2001; Geldermann 1975). Die Identifizierung eines QTL kann über Assoziationsstudien mit Kandidatengen, Genomscans mit Mikrosatelliten oder auch kombinierte Verfahren durchgeführt werden (Andersson 2001). Die Lokalisation des QTL wird durch statistische Berechnungen unter Berücksichtigung von Genotyp und Phänotyp in geeignetem (Familien-)material dargestellt. Ein QTL selbst hat keinen funktionalen Zusammenhang, kann aber mit dem eigentlichen genetischen Marker, der den Phänotyp bedingt, gekoppelt sein und dadurch als indirekter Marker fungieren (Cheverud und Routman 1993; Dekkers und Hospital 2002). Für die Identifikation der zugrundeliegenden ursächlichen Mutation ist eine Eingrenzung und somit Verkleinerung des QTL-Bereiches mittels Feinkartierung nötig. Viele QTL haben einen geringen phänotypischen Effekt und die Unterscheidung der zugrundeliegenden Mutation(en) von neutralen Polymorphismen fällt oft schwer (Andersson und Georges 2004). Daher bieten QTL-Analysen nur Anhaltspunkte zur weiteren Analyse zum Auffinden eines ursächlichen Polymorphismus.

2.2.4 Analyse von Kandidatengen

Als Kandidatengen wird ein Gen bezeichnet, das einen möglichen Einfluss auf das zu untersuchende Merkmal hat (Baumung 2001; Cheverud und Routman 1993; Lymbery 1996). Dieser kann auf physiologischem Weg gegeben sein, dass das Genprodukt (zum Beispiel ein Protein oder Enzym) auf biochemischer Ebene einen Zusammenhang zu dem Merkmal hat. In diesem Fall spricht man von funktionellem Kandidatengen. Andererseits kann rein von der Lokalisation des Genes auf dem Chromosom von einem Einfluss ausgegangen werden, wenn sich dieses Gen in einem QTL befindet und somit eine mögliche Kopplung zwischen

Genvarianten und Mikrosatellitenallelen vorliegt. Ein solches Kandidatengen wird als positionelles Kandidatengen bezeichnet.

Die Gene werden hinsichtlich vorhandener Mutationen analysiert, wobei dies Nukleotidaustausche, Insertionen und Deletionen oder auch zum Beispiel das Fehlen von Exons sein können. Diese Mutationen können eine Änderung der Aminosäuresequenz (nicht-synonym) oder auch von Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren bewirken, aber auch als stille Mutation (synonym) ohne offensichtliche Veränderung der Aminosäuresequenz auftreten. Steht diese Mutation in einer Verbindung zu dem untersuchten Merkmal, spricht man von einem direkten Marker (Lymbery 1996; Schwarzenbacher und Dolezal 2003).

Zum Auffinden der Mutationen müssen zunächst in dem ausgewählten Kandidatengen mit Hilfe der in der Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) veröffentlichten Sequenzen und Literaturangaben die zu analysierenden Genbereiche identifiziert werden. Anhand der Genbanksequenz werden Primer kreiert und mit diesen Sequenzen des eigenen Tiermaterials ermittelt. Diese wiederum können mit Hilfe von Computerprogrammen (BLAST = Basic Local Alignment Search Tool, Altschul *et al.* 1990 oder ClustalW aus ChromasPro) verglichen und somit Polymorphismen erkannt werden. Die exakte Lokalisation innerhalb des Gens wird durch Sequenzvergleiche bestimmt, wobei Nukleotidaustausche in nicht-kodierenden Regionen häufiger als in kodierenden Abschnitten vorkommen (Kim und Misra 2007). Bei Identifikation dieser im Exon werden sie auf ihren Einfluss auf die Aminosäuresequenz analysiert und bei Vorliegen im Intron auf Veränderungen möglicher Transkriptionsfaktorbindungsstellen (TFSEARCH). Weiterhin sollten Segregationsanalysen in Familienmaterial durchgeführt werden und anschließend werden routinemässige Typisierungsmethoden etabliert.

2.2.5 Praktischer Nutzen der molekularen Gendiagnostik

Die molekulare Gendiagnostik kann in verschiedenen Bereichen der Tierzucht eingesetzt werden. Ein klassisches Beispiel ist die international vereinheitlichte Abstammungskontrolle mittels Mikrosatelliten, über die eine über 99%ige Zuordnung der Elterntiere möglich ist (ISAG 2003). Das Erkennen von rezessiv vererbten Erkrankungen ist auf genetischer Ebene durch direkte oder indirekte Marker möglich und wird beim Rind zum Beispiel bei Boviner Leukozytenadhäsionsdefizienz (BLAD, direkt (Kehrli *et al.* 1992; Shuster *et al.* 1992)), Weaver (Bovine Progressive Degenerative Myeloencephalopathie, indirekt (Georges *et al.* 1993a; Hoeschele und Meinert 1990)) und für die spezifisch bei der Rasse Braunvieh vorkommende Spinale Demyelinisierung und Spinale Muskelatrophie (Casanova *et al.* 2003)

eingesetzt. Weiterhin kann bei getrennt geschlechtlichen Zwillingsgeburten der XX/XY-Chimärismus auf molekulargenetischem Weg sicher diagnostiziert werden (GeneControl GmbH, Grub, www.genecontrol.de). Auch für Exterieurmerkmale konnten auf genetischer Ebene Tests etabliert werden, wie zum Beispiel das Doppellendersyndrom besonders beim Weiß-Blauen Belgier (Fahrenkrug *et al.* 1999; Grobet *et al.* 1998; McPherron und Lee 1997) oder auch der Rotfaktor bei schwarzbunten Dt. Holstein Bullen (Joerg *et al.* 1996; Klungland *et al.* 1995).

2.3 QTL-Studien für Verhaltensmerkmale bei *Bos taurus* und anderen Tierarten

Bei Rindern liegt der Schwerpunkt der QTL-Studien bei Parametern der Milchproduktion und den dafür entscheidenden Parametern wie Milchmenge, Protein- und Fettgehalt. Aber auch Exterieurmerkmale wie Beinstellung (Buitenhuis *et al.* 2007), Euteraufhängung und Zitzenlänge sind im Interesse der QTL-Studien ebenso wie Krankheitsanfälligkeit zum Beispiel für Mastitiden und Mycobakterien (Gonda *et al.* 2007; Klungland *et al.* 2001; Lund *et al.* 2007) sowie Fruchtbarkeitsparameter (Kuhn *et al.* 2003; Thomasen *et al.* 2008). Für Milchmenge und Inhaltsstoffe konnten in den Anfängen QTL auf fünf verschiedenen Chromosomen dargestellt werden (Georges *et al.* 1995). Inzwischen befinden sich in den Datenbanken Einträge auf fast allen Chromosomen zu diesen Merkmalen (<http://www.animalgenome.org/cattle/>). In Holstein Friesian wurden mittels Whole Genome Scan insgesamt 61 chromosomenweite QTL für Exterieurmerkmale und Fruchtbarkeitsparameter detektiert (Schrooten *et al.* 2000). Bei Brown Swiss konnten genomweit 43 QTL-Regionen für Milchmenge und Proteinprozente detektiert werden, die teilweise mit den in Dt. Holstein dargestellten übereinstimmen (Bagnato *et al.* 2008). In drei französischen Rassen wurden sowohl genom- als auch chromosomenweite QTL für Produktions- und Exterieurmerkmale analysiert (Boichard *et al.* 2003). Eine solche QTL-Analyse wurde auch in einer Dt. Holstein Population mit Exterieurmerkmalen und Melkgeschwindigkeit durchgeführt und auf 20 Chromosomen konnten QTL für diese Merkmale detektiert werden (Hiendleder *et al.* 2003). In dieser Studie wurde auch ein QTL für Verhalten/Temperament während des Melkens auf BTA29 bei 20cM lokalisiert. Mit einer anderen Definition für Temperament (Reaktion auf Isolation) wurden bei kanadischen Fleischrindern fünf QTL für dieses Merkmal auf verschiedenen Chromosomen (BTA1, 5, 9, 14 und 15) detektiert (Schmutz *et al.* 2001). Bei kanadischen Holstein Bullen wurden QTL-Studien mit SNPs als

Marker unter anderem für Melktemperament als funktionales Merkmal durchgeführt und auf BTA29 zwischen 23.068.761 bp und 38.944.167 bp Signifikanzen detektiert (Kolbehdari *et al.* 2008). Für Verhalten beim Rind sind keine weiteren Untersuchungen auffindbar und in den bovinen QTL-Datenbanken (Hu *et al.* 2007; Hu und Reecy 2007; Polineni *et al.* 2006) findet sich nur der von Hiendleder *et al.* (2003) detektierte QTL auf BTA29 für Verhalten wieder und keine weiteren Einträge zu Temperament (<http://genomes.sapac.edu.au/bovineqtl/> und <http://www.animalgenome.org/QTLdb/cattle.html>).

Die ersten und umfassendsten QTL-Studien zum Verhalten von Tieren wurden mit Mäusen und Ratten durchgeführt. Diese wurden verschiedenen Tests wie dem Open Field Test oder auch Elevated Plus Maze Test unterzogen und ihr Verhalten währenddessen zum Beispiel mit Lernverhalten, Angst oder Aggression in Verbindung gebracht. In den anschließenden genetischen Untersuchungen wurden bei Mäusen QTL für verschiedene Verhaltensmuster besonders auf Chromosom 1, 15 und 18 dargestellt (zusammengefasst bei Flint 2003).

Bei Schweinen (6 Wochen alte Ferkel) wurden Verhaltensuntersuchungen zur Reaktion auf neue Umgebung durchgeführt und für die erfassten Reaktionsparameter verschiedene QTL detektiert (Désautés *et al.* 2002).

2.4 Kandidatengene für Verhalten bei Rindern

Psychoanalytische Verhaltensmodelle wie beim Menschen, die eine Verbindung von Verhaltensweisen zu biochemisch-physiologischen Vorgängen herstellen, gibt es für das Rind nicht. So legen verschiedene Verhaltensforscher auch unterschiedliche Basisemotionen denselben Verhaltensweisen zugrunde. Demgegenüber stehen die fixen Verhaltensmuster, die, sobald einmal durch einen Schlüsselreiz ausgelöst, bei allen Tieren gleich ablaufen (Grandin 2005).

Eine Annäherung an die biochemisch-physiologischen Vorgänge bei Tieren und hier im speziellen Fall bei *Bos taurus* ist über humane Modelle möglich. Im humanen Verhaltensmodell existieren vier verschiedene Temperamentdimensionen: das Novelty Seeking (aktives Vorgehen gegen Monotonie), Harm Avoidance (Vermeidung negativer Erfahrungen), Reward Dependence (Abhängigkeit von äußerer Anerkennung) und Persistence (Beharrlichkeit, auf Erschöpfung und Frustration zu reagieren) (Cloninger 1987; Cloninger *et al.* 1993). Diesen verschiedenen Aspekten, die die Ausprägung des Temperamentes und Verhaltens bedingen, können unterschiedliche physiologische Aspekte zugeordnet werden. Novelty Seeking ist mit Schwankungen des Dopaminspiegels, Harm Avoidance mit Variationen im Serotoninlevel

und Reward Dependence mit Norepinephrin, einem Substrat für Monoaminoxidase A, assoziiert (Keltikangas-Jarvinen *et al.* 2003). Diese verschiedenen biochemischen Produkte und Vorgänge sind alle miteinander verkettet. So wird sowohl der Dopamin- als auch der Serotoninspiegel durch das Enzym Monoaminoxidase A mitreguliert (Cases *et al.* 1995; Löffler und Petrides 1998). Serotonin- und Cholecystokininrezeptoren sind durch enge anatomische Lokalisationen miteinander verbunden und es gibt Vermutung zur Nutzung gemeinsamer neuronaler Wege (van Megen *et al.* 1994).

2.4.1 Cholecystokininrezeptor B

Der Neurotransmitter Cholecystokinin kommt in verschiedenen Isoformen im gesamten Organismus vor und kann über zwei unterschiedliche Rezeptoren agieren, die als Form A (CCKAR bzw. CCK₁-Rezeptor) und B (CCKBR bzw. CCK₂-Rezeptor) bezeichnet werden. Die biochemisch längeren und sulfatierten Cholecystokininvarianten (CCK-33, CCK-59 und sulfatiertes CCK-8) agieren bevorzugt mit CCKAR und die kürzeren wie zum Beispiel CCK-4, CCK-5 sowie unsulfatiertes CCK-8 mit CCKBR (Cohen *et al.* 2004; Hernandez-Gómez *et al.* 2002). Die Rezeptoren gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit sieben transmembranären Domänen und unterscheiden sich durch ihre Lokalisationen, wobei CCKBR besonders im Gehirn anzutreffen ist (Noble und Roques 1999; Wang *et al.* 2005). Dort ist der CCKBR besonders in den anatomischen Bereichen vorkommend, die physiologisch mit Angst und Emotionen in Verbindung stehen, wie dem Hypothalamus, dem limbischen System und dem frontalen Kortex (Hattori *et al.* 2001). Der am Magen vorkommende Gastrinrezeptor ist mit dem CCKBR identisch (Crawley und Corwin 1994).

2.4.1.1 Physiologische und pharmakologische Bedeutung des Cholecystokininrezeptors B

Über den CCKBR werden die neuronalen Funktionen von Cholecystokinin vermittelt. Dieses greift in verschiedene Funktionskreisläufe wie zum Beispiel Regulation der Futteraufnahme, Kontrolle von Lernen und Erinnerung, ängstliche Verhaltensäußerungen, Schmerzvermittlung und auch Funktionen, die über das dopaminerge, serotonerge oder opioide System beeinflusst werden, ein (Crawley und Corwin 1994; Wang *et al.* 2005). Zwischen Cholecystokinin und Dopamin bestehen enge Wechselwirkungen, wobei eine Stimulation des CCKBR im *Nucleus Accumbens* die weitere Freisetzung von Dopamin inhibiert und somit in die dopamin-gesteuerten Vorgänge über negatives Feedback eingreift (Crawley und Corwin 1994). Auch im Zusammenhang mit Stress und daraus resultierenden Verhaltensweisen ist das Cholecystokininsystem somit eine wichtige Komponente (Daugé und Léna 1998).

Bei Patienten mit Panic Disorders und Gesunden können durch die Gabe von CCK₄, einem Agonisten von CCKBR, Panikattacken ausgelöst werden, die durch CCKBR-Antagonisten wieder behoben werden können (Bradwejn *et al.* 1994). Man vermutet, dass bei Patienten mit Panic Disorders der CCKBR empfindlicher reagiert (Daugé und Léna 1998). Allerdings ist es bisher nicht gelungen, Antagonisten der Cholecystokininrezeptoren therapeutisch einzusetzen (Harro 2006). Bei Patienten mit Schizophrenie wurde eine signifikante Reduktion der Cholecystokininrezeptoren im limbischen und corticalen System nachgewiesen (Bourin *et al.* 1996). Auch im Rahmen selbstzerstörerischen Verhaltens spielt CCKBR eine Rolle, da sich deren Regulation ändert und bei Suizidopfern eine reduzierte Anzahl Cholecystokininrezeptoren im frontalen Kortex nachgewiesen werden konnte (Harro *et al.* 1992).

2.4.1.2 Genstruktur des Cholecystokininrezeptors B: CCKBR

Die Struktur des CCKBR ist zwischen den Spezies stark konserviert (Noble und Roques 1999). Das Gen besteht aus fünf Exons und vier Introns (Wang *et al.* 2005). Exon I codiert für das extrazelluläre Aminoende, Exon II für die transmembranären Domänen (TM) I – III, Exon III für TM III – V, Exon IV für TM V und einen Teil des dritten intrazellulären Loop und Exon V vervollständigt den dritten intrazellulären Loop und codiert für TM VI und TM VII sowie das intrazelluläre Carboxylende des Proteins (Noble und Roques 1999).

Beim Rind wurde das Gen des CCKBR 1996 kloniert und analysiert (Dufresne *et al.* 1996). Die mRNA hat eine Länge von 2344 Basenpaaren. Die Exons haben eine Länge von 176 Basenpaaren (Exon IV) bis 1428 Basenpaaren (Exon V). 1364 Basenpaare der mRNA (GenbankNr. NM_174262) sind codierend, dies entspricht einer Aminosäuresequenz mit 454 Aminosäuren (Dufresne *et al.* 1996). Das CCKBR-Gen ist beim Rind auf Chromosom 15 zentral stromaufwärts lokalisiert (GeneID 281665).

2.4.1.3 Polymorphismen im humanen CCKBR-Gen und Assoziationen

Im humanen CCKBR-Gen sind mehrere SNPs in unterschiedlichen Genabschnitten beschrieben, so zum Beispiel C109T in Exon I (Tachikawa *et al.* 1999), G1753A, T1962C und G1985A in Exon III (Harada *et al.* 1996), aber auch in Intron 4 (C2491A) oder auch in der 3'UTR: G3263C und A3264G (Yamada *et al.* 2001). Diese Polymorphismen wurden primär auf ihre Assoziation zu Schizophrenie und Panic Disorders untersucht (Hamilton *et al.* 2001; Hösing *et al.* 2004; Kennedy *et al.* 1999; Tachikawa *et al.* 1999); es gibt aber auch Untersuchungen zum Beispiel zum Alkoholismus und CCKBR, die allerdings keinen Zusammenhang darstellen konnten (Harada *et al.* 1996). Zwar konnten signifikante Unterschiede der Genotypfrequenzen von SNPs im humanen CCKBR zwischen

Schizophreniepatienten und Kontrollgruppe nachgewiesen werden, allerdings waren diese nach Bonferroni-Korrektur nicht mehr haltbar. Es konnte kein Zusammenhang zwischen den Polymorphismen und der klinischen Ausprägung der Schizophrenie festgestellt werden (Tachikawa *et al.* 1999).

Kennedy *et al.* untersuchten 1999 einen (CT)_n Mikrosatelliten in der 5'-UTR-Region des *CCKBR* bei Patienten mit Panic Disorders (PD) und einer Kontrollgruppe. Sie konnten in verschiedenen Modellen (Analyse aller 16 detektierten Allele und Aufteilung in vier Gruppen) einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Allel 6 und 7 und dem Vorhandensein von PD nachweisen. Einen positiven Zusammenhang zwischen bestimmten Allelen und PD bestätigen Hösing *et al.* (2004). Hier wurde der CT-Repeat im *CCKBR* bei deutschen Panic Disorder Patienten untersucht und ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen den langen Allelen (164 – 180 bp) des Mikrosatelliten und dem Vorliegen der Erkrankung festgestellt. Keine Assoziation zwischen dem CT-Repeat und Panic Disorders konnten Hamilton *et al.* (2001) nachweisen.

2.4.1.4 Cholecystokininrezeptor B bei Tieren

Die systemische oder intracerebrale Gabe von CCKBR-Agonisten induziert ängstliches Verhalten bei Mäusen, Ratten, Meerschweinchen, Katzen und Affen (Wang *et al.* 2005). Die Gabe von spezifischen CCKBR-Antagonisten führt in verschiedenen Tests bei Mäusen und Ratten zu reduziertem Angstverhalten (Daugé und Léna 1998). Die Einflüsse auf das Angstverhalten in den Tests lassen sich nur mit spezifischen CCKBR-Agonisten, nicht jedoch mit unspezifischen Agonisten oder CCKAR-Agonisten nachweisen (Fink *et al.* 1998).

Bei Ratten kann mit der Gabe von Caerulein, einem unselektiven CCK-Agonisten, das explorative Verhalten im Elevated Plus Maze Test reduziert werden. Diese Wirkung kann aber mit der Applikation eines CCKBR-Antagonisten aufgehoben werden, die Gabe eines CCKAR-Antagonisten hat jedoch keinen Einfluss auf das Explorationsverhalten (Männistö *et al.* 1994).

Hernandez-Gómez *et al.* (2002) führten mit männlichen Ratten drei verschiedene Verhaltens-tests (Elevated Plus Maze Test, Open Field Test und Four Hole Box Test) durch. Den Tieren wurden verschiedene CCK-Isoformen, die für einen der beiden Rezeptoren spezifisch sind, in den *Nucleus Accumbens* injiziert. Die Ergebnisse bezüglich CCKBR stimmten mit oben Beschriebenen überein und es zeigte sich, dass der CCKAR nicht in das Angstverhalten involviert ist. Dies bestätigt auch eine Studie mit männlichen Ratten zweier unterschiedlicher Stämme (PVG hooded und Sprague-Dawley), die dem Elevated Plus Maze Test unterzogen wurden, wobei entweder CCKBR-Agonisten oder CCKBR-Antagonisten appliziert wurden

(Farook *et al.* 2001). Bei diesen beiden Rattenstämmen ist ein unterschiedliches Angstverhalten bekannt. Dies wurde im Cat Exposure Test durch das „freezing behaviour“ dargestellt (Farook *et al.* 2001). Der Rattenstamm PVG hooded zeigt ein im Vergleich zu dem Rattenstamm Sprague-Dawley (SD) verstärktes „freezing behaviour“ und geringere Bewegungsaktivität. Bei ihnen werden die Cholecystokininrezeptoren B in größerem Maße exprimiert. Diese Unterschiede wurden auch von Wang *et al.* (2003) durch cDNA Microarray-Studien mit beiden Rattenstämmen bestätigt. In einer weiteren Studie wurde Ratten nach ihrem Verhalten im Elevated Plus Maze Test ein bestimmtes Level an Ängstlichkeit zugeschrieben und in den verschiedenen Gehirnregionen die Expression des CCKBR bestimmt. Eine Hochregulierung des CCKBR wurde nur im Kortex der als sehr ängstlich eingestuften Ratten nachgewiesen (Wang *et al.* 2005).

Den Anstieg der Cholecystokininrezeptoren B im frontalen Kortex in Verbindung mit Angst wurde auch schon viele Jahre zuvor nachgewiesen (Vasar *et al.* 1993). Die Arbeitsgruppe isolierte Ratten und testete diese im Vergleich zu in Gruppen gehaltenen Ratten im Elevated Plus Maze Test. Die isoliert gehaltenen Ratten zeigten eine reduzierte Bewegungs- und Erkundungsaktivität, was als Angstverhalten gedeutet wurde. Mittels Rezeptorbindungstechniken stellte sich heraus, dass bei den ängstlicheren Ratten die Anzahl der CCKBR im frontalen Kortex im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht war. Durch die Gabe des CCKBR-Agonisten Caerulein konnte das Aktivitätsverhalten der in Gruppen gehaltenen Ratten reduziert werden.

Bei Ratten wurde auch der Einfluss von „antisense oligonucleotides (ASODN)“, die die Synthese des ihrer Sequenz entsprechenden Proteins inhibieren, auf das Angstverhalten untersucht (Cohen *et al.* 2004). In dieser Studie wurde festgestellt, dass die Kombination von CCK-ASODN mit einem CCKBR-Antagonisten eine signifikante Reduzierung des Angstverhaltens der Ratten im Vergleich zur Einzelmedikation der beiden Substanzen hervorruft.

Bezüglich des bovinen CCKBR existieren sehr wenige Studien. In der postnatalen Entwicklung des Kalbes sind unterschiedliche Expressionsprofile mit RT-PCR von CCKBR in den verschiedenen Geweben darstellbar, wobei die Expression im frontalen Kortex am höchsten ist, gefolgt von Pankreas und Magen (Desbois *et al.* 1998). Im Pankreas hat der Cholecystokininrezeptor B eine Bedeutung bei der Regulation der exokrinen Sekretion (Le Dréan *et al.* 1999). Die mRNA-Expression von CCKBR im Labmagen ist sowohl vom Alter als auch von der Fütterung der Kälber abhängig. Die Expression reduziert sich signifikant bei Vergleich drei Wochen und 13 Wochen alter Tiere. Im Alter von 13 Wochen zeigt sich ein

signifikanter Einfluss der Fütterung; die CCKBR-mRNA-Expression ist bei Tieren mit MilCHFütterung deutlich erhöht (Yonekura *et al.* 2002).

2.4.1.5 CCKBR-knockout-Tiere

Die CCKBR-knockout-Mäuse zeigen dem Wildtyp entsprechendes Verhalten und sind fertil (Noble und Roques 2002). Im Elevated Plus Maze Test konnten Daugé *et al.* (2001) keinen Unterschied zwischen Knockout- und Wildtyp-Mäusen im Verhalten während des Testes darstellen. In einer Studie, die sich nur mit weiblichen Mäusen befasste, wurde nachgewiesen, dass CCKBR-knockout-Mäuse ein im Vergleich zu den Wildtypen verstärktes Erkundungsverhalten zeigten (Raud *et al.* 2003). Auch Horinouchi *et al.* (2004) konnten mithilfe des Black and White Box Tests und des Elevated Plus Maze Tests feststellen, dass CCKBR-knockout-Mäuse ein weniger ängstliches Verhalten als die Wildtypen zeigen. Zu diesem Ergebnis kamen auch Miyasaka *et al.* (2002).

Bei CCKBR-knockout-Mäusen ist das Opioidsystem hochreguliert. Dies zeigte sich in einer Studie, bei der Knockout-Mäuse in verschiedenen Tests unter der Gabe unterschiedlicher Agonisten und Antagonisten untersucht wurden (Pommier *et al.* 2002). Die Bewegungsaktivität der Knockout-Mäuse ist im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen gesteigert (Actimeter-Test). Dieser Effekt kann durch die Gabe eines Opiodantagonisten aufgehoben werden.

2.4.2 Dopaminrezeptor D4

Der Neurotransmitter Dopamin spielt eine wichtige Rolle im ZNS im Rahmen der Lokomotion, Wahrnehmung und Emotionen sowie der Regulation der endokrinen Organe (Oak *et al.* 2000; Rubinstein *et al.* 1997). Bei ängstlichen Hunden konnte ein Anstieg des Dopaminspiegels im Plasma nachgewiesen werden (Riva *et al.* 2008). Die Rezeptoren für Dopamin, die in fünf verschiedenen Subtypen (D1 – D5) vorkommen, gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und werden von verschiedenen Genen codiert (Civelli *et al.* 1993). Sie werden zwei verschiedenen Klassen (D₁ und D₂) zugeordnet, wobei die Isoformen D1 und D5 zur D₁-Klasse und D2, D3 sowie D4 zur D₂-Klasse gehören (Seeman und Van Tol 1994). Die Rezeptoren der D₂-Klasse bewirken über die Aktivierung des G-Proteins eine Reduzierung des cAMP-Spiegels in der Zelle. Der D1- und der D5-Rezeptor haben gegenteilige Wirkung (Sibley und Monsma 1992).

2.4.2.1 Medizinische Nutzung des DRD4

Der Dopaminrezeptor D4 (DRD4) zeichnet sich durch die höchste Affinität der Dopaminrezeptoren zu Clozapin aus (Rubinstein *et al.* 1997; Seeman und Van Tol 1994; Van Tol *et al.*

1991). Dieses, inzwischen auch als Generika erhältliche, Neuroleptikum wird bei therapieresistenten Psychosen als letzte Möglichkeit eingesetzt, allerdings mit Risiko schwerer Nebenwirkungen wie Gewichtszunahme, Diabetes, Leukopenie und Agranulozytose (Agelink *et al.* 2006).

2.4.2.2 Genstruktur des Dopaminrezeptors D4: *DRD4*

Eine erste Klonierung des humanen *DRD4* wurde 1991 durchgeführt (Van Tol *et al.* 1991). Das Gen des humanen *DRD4* besteht aus vier Exons und ist auf Chromosom 11 an Position 11p15.5 lokalisiert (Oak *et al.* 2000). Bei *Bos taurus* ist *DRD4* durch Radiation Hybrid Mapping auf BTA29 kartiert (Haegeman *et al.* 2003b), was sich auch in der vergleichenden Genkartierung Mensch – Rind andeutet (Larkin *et al.* 2003). Eine genetische Kartierung sowie eine vollständige Sequenzierung der DNA bzw. mRNA ist bisher bei *Bos taurus*, auch im Rahmen der Whole Genome Sequence (Btau_3.1), noch nicht erfolgt. Für andere Tierarten und den Menschen sind Daten in der Genbank vorhanden (zum Beispiel: *Homo sapiens*: L12397; *Equus caballus*: EF561289; *Mus musculus*: NM_007878; *Canis familiaris*: AB044885).

Zwischen Mensch und Ratte gibt es bei *DRD4* nur eine zu 75 % übereinstimmende codierende Sequenz, was sehr auffällig ist, da die Übereinstimmung bei anderen Dopaminrezeptoren zwischen diesen Spezies > 90 % ist (Asghari *et al.* 1994). Eine Erklärung hierfür liegt in der repetitiven Sequenz in Exon III (VNTR), deren Vorkommen und Allele sich zwischen den Spezies stark unterscheiden (Niimi *et al.* 1999).

2.4.2.3 *DRD4* und Schizophrenie

Studien des *DRD4* wurden im Zusammenhang mit Schizophrenie durchgeführt, da bei dieser Erkrankung eine Dysfunktion des dopaminergen Systems zugrunde liegt.

Mittels immunohistochemischen Methoden lässt sich ein sechsfacher Anstieg des Dopaminrezeptors D4 im Gehirn von Schizophreniepatienten im Vergleich zu einer Kontrollgruppe darstellen (Seeman *et al.* 1993). Im Rahmen von *DRD4*-mRNA-Studien konnten Mulcrone und Kerwin (1996) im postmortalen Frontallappen von Schizophreniepatienten und Kontrollgruppe keinen signifikanten Unterschied der mRNA Expression feststellen. Dieses Ergebnis wurde auch von Roberts *et al.* (1996) bestätigt. In einer späteren mRNA-Studie, in der der Frontallappen und der *Nucleus Caudatus* einbezogen waren, konnte im Frontallappen ein dreifacher Anstieg der *DRD4*-mRNA nachgewiesen werden (Stefanis *et al.* 1998).

Bei Untersuchung peripherer mononuklearer Zellen, in denen auch der *DRD4* exprimiert wird, konnte ein signifikanter Unterschied der *DRD4*-Expression in Granulozyten zwischen

Schizophreniepatienten und Kontrollgruppe festgestellt werden (Rodrigues *et al.* 2005). Dies wird mit den wahnhaften Vorstellungen der Schizophrenie in Verbindung gebracht.

2.4.2.4 Polymorphismen im humanen *DRD4*-Gen und Assoziationen

Im Exon III des *DRD4*, welches für den dritten zytoplasmatischen Loop codiert, existiert ein VNTR-Polymorphismus (Variable Number of Tandem Repeats), bei dem sich eine 48bp-Sequenz zwei- bis zehnmal (*DRD4.2* - *DRD4.10*, entsprechend) wiederholt. Von verschiedenen Arbeitsgruppen konnten insgesamt 27 verschiedene Haplotypen dargestellt werden, aus denen 20 verschiedene Proteinvarianten hervorgehen (Oak *et al.* 2000; Van Tol *et al.* 1992). In pharmakologischen Studien zeigten sich Unterschiede zwischen den Varianten bezüglich ihrer Affinitäten zu verschiedenen Agonisten bzw. Antagonisten des *DRD4*. So hat zum Beispiel die Variante *DRD4.9* im Vergleich zu *DRD4.2* und *DRD4.4* zweifach höhere Affinität zu Dopamin. Der Antagonist Clozapin wird von *DRD4.5* mit einer 1,6fach höheren Affinität als von *DRD4.4* gebunden (Asghari *et al.* 1994).

Bei Kindern wurde die Verbindung dieses *DRD4*-VNTR zu deren Temperament mit dem Alter entsprechenden Tests untersucht. Im Alter von zwei Monaten haben Kinder mit langen *DRD4*-Allelvarianten (> 7 Repeats) im Vergleich zu ihren Altersgenossen mit kurzen *DRD4*-Allelvarianten signifikant niedrigere Scores der Eigenschaften „Negative Emotion“ und „Distress to Limitation“ (Auerbach *et al.* 1999). Mit einem Jahr zeigten die Kinder mit den langen Allelvarianten geringeres Interesse an strukturierten Spielsituationen und sind in freien Spielsituationen aktiver (Auerbach *et al.* 2001).

In einer Untersuchung Jugendlicher konnten Becker *et al.* (2005) eine Verbindung zwischen dem *DRD4*-VNTR und Novelty Seeking darstellen. Männliche Jugendliche mit mindestens einem 7-Repeat-Allel haben im Vergleich zu männlichen Jugendlichen ohne ein 7-Repeat-Allel signifikant höhere Novelty Seeking Scores. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch Ebstein *et al.* (1996), die mit 124 Erwachsenen den Tridimensional Personality Questionnaire (TPQ) durchführten und den Genotyp des *DRD4*, Exon III bestimmten. Personen mit dem 7-Repeat-Allel haben signifikant höhere Novelty Seeking Scores, unabhängig ihres Alters, Geschlechts und ethnischer Zugehörigkeit als Personen ohne das 7-Repeat-Allel. 1997 wiederholten Ebstein *et al.* die Untersuchung mit einer vergrößerten Versuchsgruppe und konnten ihre Ergebnisse bestätigen. Diesen positiven Ergebnissen stehen auch negative gegenüber. Kühn *et al.* (1999) konnten in der von ihnen untersuchten Population keinen signifikanten Zusammenhang zwischen den langen *DRD4*-Allelen und Novelty Seeking feststellen. Auch Kim *et al.* (2006) konnten in einer koreanischen Population keinen Zu-

sammenhang zwischen *DRD4*-Genotyp und den Temperamentdimensionen des TPQ darstellen.

Ein SNP im 5'-UTR Bereich des *DRD4* wurde in Verbindung mit dem Auftreten von Schizophrenie beschrieben. Die Allele dieses Polymorphismus, -521 C/T, unterscheiden sich signifikant zwischen Kontrollgruppe und Schizophreniepatienten, bei denen das Allel C häufiger vorkommt (Okuyama *et al.* 1999). Des weiteren ist in Zellkulturen die Transkriptionsrate des Allels C höher als die des Allels T (Okuyama *et al.* 1999).

Eine andere Studie konnte den Zusammenhang zwischen -521 C/T und Schizophrenie nicht bestätigen (Xing *et al.* 2003). Hier wurden neben diesem SNP drei weitere SNPs und zwei Deletionen der 5'UTR sowie ein 120bp-VNTR dieses Bereiches untersucht. Eine Assoziation zu Schizophrenie konnte nur für das lange Allel des 120bp-VNTR nachgewiesen werden, was durch Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren in diesem Bereich erklärt wird.

Zwischen dem -521 C/T Polymorphismus und dem 48bp-VNTR in Exon III gibt es ein Kopplungsgleichgewicht (Ekelund *et al.* 2001). Allerdings konnte keine Assoziation des SNP zu Novelty Seeking nachgewiesen werden. Dies bestätigen auch Strobel *et al.* (2003), die sowohl den SNP als auch den VNTR Polymorphismus analysierten.

Im Rahmen einer Metaanalyse werden insgesamt 17 verschiedenen *DRD4*-Polymorphismen beschrieben, deren Zusammenhang zu Schizophrenie mit teils sehr differierenden Ergebnissen untersucht wurde (Jönsson *et al.* 2003). Hierzu zählen neben den oben beschriebenen (exkl. dem 120bp-VNTR) zwei Deletionen, ein 12bp-Repeat und ein SNP im Exon I, ein Mikrosatellit im Intron 1 sowie ein Aminosäureaustausch im Exon III. Eine weitere Analyse wurde mit dem 48bp-VNTR Exon III, 12bp-VNTR Exon I und dem -521 C/T Polymorphismus durchgeführt und eine Assoziation mit Schizophrenie konnte nur für das Allel C des -521 C/T bestätigt werden. Neben diesem -521 C/T Polymorphismus und dem 48bp-VNTR im Exon III wurden weitere SNPs in der 5'untranslated Region sowie Deletionen im Exon I im Zusammenhang mit Schizophrenie untersucht (Jönsson *et al.* 2003).

2.4.2.5 *DRD4* bei Tieren

Das Exon III des *DRD4* wurde hinsichtlich seines VNTR bei verschiedenen Säugetierspezies analysiert. Dieser Polymorphismus konnte regelmäßig dargestellt werden, unterliegt aber hinsichtlich der Größe der replizierten Sequenz Schwankungen (Larsen *et al.* 2005).

Bei Primaten verschiedener Spezies (Gorilla, Schimpanse, Orangutan, Pavian, Totenkopffaffen und Rhesusaffe) wurde das Exon III des *DRD4* untersucht und mit dem humanen verglichen (Livak *et al.* 1995). Auch bei den nichthumanen Primaten gibt es einen VNTR-Polymorphismus, der in seiner Grundstruktur, 48bp repetitive Sequenz, dem humanen

identisch ist. Allerdings zeigen sich Unterschiede zwischen den Spezies, die durch die Evolution erklärbar sind. Bei einer Gruppe von 452 Grünen Meerkatzen, die zur Ordnung der Primaten gehören, wurden zwei Varianten der repetitiven Sequenz im Exon III des *DRD4* identifiziert. Durch das Aufstellen eines für die Tiere unbekannten Planschbeckens in den Käfig wurde bei diesen Tieren die Temperamentdimension Novelty Seeking anhand der Reaktion auf das Becken erfasst und es konnte ein signifikanter Einfluss des *DRD4*-Allels auf das gezeigte Verhalten Neuem gegenüber dargestellt werden (Bailey *et al.* 2007).

Weitere Varianten, eine 6bp-Insertion und 8bp-Deletion, sind im Intron 2 lokalisiert und konnte bei Affen und dem Mensch nachgewiesen werden (Shimada *et al.* 2004).

Niimi *et al.* (1999) untersuchten in ihrer Studie eine repetitive Region im *DRD4*, Exon III, die sich in der Nähe des beim Menschen identifizierten VNTR befindet, bei Golden Retrievern und Shibas. Es zeigte sich, dass von den vier detektierten Allelen bei den Golden Retrievern nur die Varianten A und B vorkommen, bei den Shibas die Varianten B, C und D. Dies wird mit den unterschiedlichen Entstehungsgeschichten der Rassen sowie deren differierenden Einsatzgebieten (Golden Retriever: Familienhund; Shiba: Wachhund) begründet. Eine Ergänzung des Tiermaterials um zwei weitere Rassen, Beagle und Shetland Sheepdog, führte zur Darstellung drei weiterer Allele (Niimi *et al.* 2001). In einer Folgestudie wurden 23 verschiedene Hunderassen auf diesen Polymorphismus untersucht und das Verhalten der Tiere mittels Besitzerbefragung erfasst. Die Rassen wurden anhand der dargestellten Allellängen in zwei Gruppen eingeteilt. In der Gruppe mit langen Allelvarianten (8 der 23 Rassen) weisen die zugehörigen Tiere höhere Aggressionsscores als die Tiere der anderen Rassen auf (Ito *et al.* 2004). Bei Deutschen Schäferhunden zeigten sich signifikante Unterschiede der VNTR-Allele bei als Polizeihunden und als Familienhunden gehaltenen Tieren (Hejjas *et al.* 2007). Innerhalb der Ordnung der Carnivoren zeigten sich Unterschiede im Auftreten dieser repetitiven Sequenzen. So konnten bei Wolf und Marderhund verschiedene Allele dargestellt werden; bei Katzen, Waschbär und Asiatischem Schwarzbär hingegen nicht (Inoue-Murayama *et al.* 2002).

Bei Equiden zeigten sich Sequenzunterschiede im Exon III, die auf einer 18bp-Sequenz beruhen, die sich bis zu neunmal wiederholt (Hasegawa *et al.* 2002). Zwei innerhalb dieses VNTR lokalisierte SNP wurden bei Rennpferden untersucht. Für diese Tiere wurde von Betreuungspersonen ein Fragebogen zum Temperament bearbeitet, der sich mit insgesamt 20 Charaktereigenschaften, unter anderem Nervosität, Konzentration, Gedächtnis, Neugierde und Wachsamkeit, befasst. Zwischen einem der beiden SNP (A→G), der einen Aminosäuren-

austausch von Asparagin zu Aspartat induziert, und den Merkmalen Neugierde und Wachsamkeit gibt es einen signifikanten Zusammenhang (Momozawa *et al.* 2005).

Im Exon III des *DRD4* bei Pottwal, Schweinswal, Weißschnauzendelphin und nördlichem Zwergwal wurde ein Tandem Repeat mit einer 18bp-Sequenz dargestellt. Es zeigte sich, dass es sich um einen imperfekten Repeat handelt, dessen Ausprägung zwischen den Arten variiert (Mogensen *et al.* 2006).

Mit EEB (Early Exploratory Behavior) ist es möglich, Vögel hinsichtlich ihres Novelty Seeking Verhaltens zu selektieren. Zu diesem Zweck wurde den Vögeln in ihre gewohnte Umgebung ein neues Objekt (z.B. ein neuer Baum) gestellt und ihre Reaktion darauf anhand einer Skala bewertet. In einer Studie mit Kohlmeisen wurden selektierte Tiere und Wildtypen miteinander verglichen und der *DRD4*-Genotyp eines SNP (SNP830 C→T) bestimmt (Fidler *et al.* 2007). Statistisch haben die drei Genotypen einen signifikanten Einfluss auf den EEB; homozygot T Meisen haben höhere EEB-Scores als homozygot C Meisen. Auch bei Hühnern, Japanischer Wachtel und Fasanen wurde das *DRD4*-Gen analysiert, allerdings ohne phänotypische Untersuchungen der Tiere durchzuführen. Bei den untersuchten Arten konnte in der Aminosäuresequenz eine Prolinwiederholung unterschiedlicher Länge identifiziert werden (Sugiyama *et al.* 2004).

2.4.2.6 *DRD4*-knockout-Tiere

Durch Zucht mit männlichen Mäusen, denen mittels Vektor ein *DRD4*-Transkript ohne Exon II zugeführt wurde, gehen in der F2-Generation *DRD4*-knockout-Mäuse hervor, die physiologisches Wachstum sowie Fertilität zeigen (Rubinstein *et al.* 1997). In einer Vergleichsstudie von Knockout-Mäusen und Wildtypmäusen zeigten die Knockout-Tiere eine reduzierte Aktivität, was sich durch kürzere Wegstrecken und langsamere Fortbewegung äußerte (Rubinstein *et al.* 1997). Bei dem in derselben Studie durchgeführten Rotarodtest, einem Test zur Untersuchung der Fähigkeit auf komplexe Bewegungen zu reagieren, zeigten sich die Knockout-Mäuse den Wildtyptieren durch signifikant weniger Stürze und einen signifikant höheren Zeitraum zwischen den Stürzen überlegen. In einem Open Field Test betreten *DRD4*-knockout-Mäuse im Vergleich zu Wildtypmäusen das Zentrum des Feldes signifikant weniger und zeigen dadurch geringere Bewegungsaktivität sowie reduzierte Verhaltensantworten auf Neues (Dulawa *et al.* 1999). Dies bestätigte sich auch in einem Emergence Test, bei dem die Mäuse in einem offenen Zylinder in das Open Field gesetzt werden. In derselben Studie wurde als dritter Test ein Novel Object Test durchgeführt. Auch hier ließen sich die reduzierten Verhaltensantworten der Knockout-Mäuse replizieren.

Eine durch Apomorphin ausgelöste Bewegungsblockade kann bei Mäusen durch die Gabe von Clozapin antagonisiert werden. *DRD4*-knockout-Mäuse sind resistenter gegen die Clozapinwirkung, bei ihnen ist die zehnfache Dosis zur Erzielung eines vergleichbaren Ergebnisses nötig (Rubinstein *et al.* 1997).

2.4.3 Monoaminoxidase A

Monoaminoxidase (MAO; EC 1.4.3.4) spielt eine wichtige Rolle bei der Metabolisierung von Neurotransmittern und Aminen im Organismus. Es handelt sich bei diesem Enzym um ein Flavoprotein, das an der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert ist. Es existiert in zwei Isoformen, MAOA und MAOB, mit bis zu 70 % übereinstimmenden Aminosäuresequenzen. MAOA hat ein Molekulargewicht von 59,7 kDa und MAOB 58,8 kDa. Beide nutzen FAD als Redox-Kofaktor und haben entsprechende Bindungsstellen (bei MAOA Cys-406) (Geha *et al.* 2002). In den meisten Geweben liegen beide Isoformen vor, aber zum Beispiel in der Plazenta und Fibroblasten existiert nur MAOA (Bach *et al.* 1988; Edmondson *et al.* 2004).

2.4.3.1 Physiologische Funktion der Monoaminoxidasen

Beide Enzyme bauen die Neurotransmitter Serotonin, Norepinephrin, Dopamin und Phenylethylamin ab, jedoch mit unterschiedlichen Affinitäten. Weiterhin unterscheiden sie sich durch ihre Inhibitoren: MAOA wird durch Clorgylin irreversibel gehemmt und MAOB durch Pargylin und Deprenyl. Über die Metabolisierung von Katecholaminen und Serotonin beeinflusst MAOA Verhaltensformen, die durch diese Mediatoren kontrolliert werden (Popova *et al.* 2001).

Bei MAOA-knockout-Mäusen stellten Cases *et al.* (1995) fest, dass diese erhöhte Spiegel an Serotonin, Dopamin und Norepinephrin haben, wohingegen 5-Hydroxyindol-Essigsäure, ein Metabolit des Serotoninabbaus, in geringeren Mengen vorhanden ist. Dies spiegelt die Rolle des MAOA im Serotoninstoffwechsel gut wider.

2.4.3.2 Medizinische Nutzung der Monoaminoxidasen

MAOA-Inhibitoren werden zur Therapie bei Depressionen (Geha *et al.* 2002; Livingston und Livingston 1996) und bei Angsterkrankungen (Davidson 1998) eingesetzt. Die anfängliche Problematik der Lebertoxizität und „cheese reaction“ (Wechselwirkung mit biogenen Aminen, die zu Kreislaufstörungen führen kann) ist durch die Weiterentwicklung zu inzwischen selektiven und reversiblen Inhibitoren behoben (Tipton *et al.* 2004; Youdim und Bakhle 2006).

2.4.3.3 Genstruktur der Monoaminoxidase A: MAOA

Das für MAOA kodierende Gen (GenID 281293) ist auf dem X-Chromosom lokalisiert (Barendse *et al.* 1997; Sabol *et al.* 1998). Für das Rind wurde die Primärstruktur des *MAOA* erstmals 1989 durch Powell *et al.* mittels cDNA-Klonierung aufgeklärt. Das bovine *MAOA* besteht wie das humane aus 527 Aminosäuren und zeigt identische Exon-Intron-Organisation mit 15 Exons und 14 Introns. Die codierende Sequenz der bovinen mRNA besteht aus 1583 Basenpaaren (GenbankNr. NM_181014). Die Übereinstimmung der gesamten Aminosäuresequenz zwischen *Homo sapiens* und *Bos taurus* beträgt 87,9%, wobei hier besonders das Exon XII (98bp) mit einer Übereinstimmung von 97% zu bemerken ist (Grimsby *et al.* 1991). Dieses codiert für die FAD-Bindungsstelle und ist zwischen den Spezies am stärksten konserviert (Grimsby *et al.* 1991). Zwischen diesen Spezies und der Ratte wurde eine hohe Übereinstimmung von 87% der Gesamtsequenz gefunden (Abell und Kwan 2001).

2.4.3.4 Polymorphismen im humanen MAOA-Gen und Assoziationen

Von Brunner *et al.* (1993a) wurde eine niederländische Familie beschrieben, in der einige Männer aggressives und teils gewalttätiges Verhalten sowie mentale Retardierung zeigten. Mittels Assoziationsanalyse mit Markern wurde ein Bereich auf dem X-Chromosom in der Umgebung der *MAO*-Gene mit den Auffälligkeiten in Verbindung gebracht (Brunner *et al.* 1993b). Bei den Betroffenen wurde ein gestörter MAOA-Stoffwechsel diagnostiziert und daraufhin das *MAOA*-Gen untersucht. Hierbei wurde eine Punktmutation im Exon VIII des Gens (C936T) identifiziert, die dazu führt, dass ein Glutaminocodon in ein Stoppcodon umgewandelt wird (Aminosäureposition 296). Diese Mutation wurde nur bei betroffenen Männern gefunden und einige Frauen der Familie fielen als Trägerinnen ohne Symptome auf. Allerdings handelt es sich um eine sehr seltene Mutation, die bisher in keiner weiteren Studie bestätigt werden konnte (Mejia *et al.* 2001; Schuback *et al.* 1999).

In einer brasilianischen Studie wurde ein „upstream Variable Number of Tandem Repeats“ (uVNTR) im Promotor des *MAOA*-Gens in Bezug auf Alkoholabhängigkeit und impulsives Verhalten untersucht (Contini *et al.* 2006). Dieser uVNTR, der 1 – 1,2 kb oberhalb des ATG-Codons liegt, und sein Einfluss auf die Transkription wurde durch Sabol *et al.* (1998) zum ersten Mal veröffentlicht. Es werden Allele mit 3, 3½, 4 und 5 Wiederholungen einer 30bp-Sequenz beschrieben, wobei die Allele mit 3½ und 4 Wiederholungen in einer Transkriptionsstudie mit verschiedenen Zelllinien eine signifikant höhere Expression zeigten als die Allele mit 3 und 5 Wiederholungen (Sabol *et al.* 1998). Contini *et al.* (2006) fanden in ihrer Studie heraus, dass bei Alkoholerkrankten mit den „high activity alleles“ (3½ und 4

Wiederholungen) im Gegensatz zu Personen mit dem „low activity allele“ mit 3 Wiederholungen das Alter bei Beginn der Alkoholerkrankung signifikant höher ist. Allerdings zeigten sich zwischen den untersuchten Temperamentmerkmalen und den Allelen des uVNTR keine Zusammenhänge, außer, dass Personen mit drei Wiederholungen der Sequenz in einem Alter von mehr als 15 Jahren mehr Symptome von asozialem Verhalten zeigen. Die Zusammenhänge zwischen dem „low activity allele“ und Alkoholismus wurde schon zuvor von anderen Autoren in verschiedenen Populationen beschrieben. (Saito *et al.* 2002; Samochowiec *et al.* 1999). Weiterhin wurde dieser uVNTR im Zusammenhang mit Panic Disorders untersucht. Deckert *et al.* fanden 1999 bei Studien mit zwei unabhängigen Versuchsgruppen (eine italienische und eine deutsche) heraus, dass bei den weiblichen Panic Disorders-Patienten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe signifikant mehr lange Allele (3½, 4 und 5 Wiederholungen) vorkommen.

Auch in Verbindung mit Depressionen und Schlafstörungen wurde das *MAOA*-Gen untersucht. Du *et al.* (2004) fanden keinen Zusammenhang zwischen diesen Erkrankungen und dem uVNTR-Polymorphismus. Neben diesem wurde auch der *EcoRV*-Polymorphismus, eine stille Mutation von Cytosin zu Thymin an Position 1460 (Hotamisligil und Breakefield 1991) des *MAOA*-Gens, analysiert. Hier zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied in der Allelverteilung zwischen den männlichen Patienten mit Depressionen und der Kontrollgruppe. Bei den weiblichen Patienten wurden keine Zusammenhänge beobachtet.

Ein weiterer Polymorphismus im *MAOA*-Gen wurde von Black *et al.* (1991) beschrieben. Hierbei handelt es sich um eine Dinucleotid-Wiederholung von Adenin und Cytosin mit sieben verschiedenen Allelvarianten. Lim *et al.* (1994) untersuchten diesen Mikrosatelliten in einer Fall-Kontroll-Studie mit manisch-depressiven Patienten (bipolar affektive Störung) in Großbritannien. In dieser Studie wurden neun Allele gefunden. Allerdings erbrachte die Assoziationsstudie keinen signifikanten Zusammenhang, ließ aber dennoch vermuten, dass ein solcher besteht. 1995 untersuchten Kawada *et al.* denselben Polymorphismus in einer japanischen Population. Sie konnten wie Black *et al.* (1991) auch nur sieben Allele nachweisen und es zeigte sich ein geringer, aber signifikanter Unterschied in der Allelverteilung bei Patienten und der Kontrollgruppe.

Eine weitere Verhaltensauffälligkeit beim Menschen, die mit *MAOA* in Verbindung gebracht wird, ist das Aufmerksamkeits-Defizit-Syndrom mit Hyperaktivität (ADH). Die Ursache der Erkrankung ist bisher unbekannt, wird aber in den dopaminergen, serotonergen und/oder noradrenergen Stoffwechseln vermutet. Da *MAOA* in den Abbau dieser Neurotransmitter involviert ist, wird es auch als Kandidatengen für ADH gesehen (Lawson *et al.* 2003). In einer

Studie wurden sowohl der schon beschriebene uVNTR als auch ein Single-Nucleotid-Polymorphism in Exon VIII (T941G), der auch als *Fnu4HI*-Polymorphismus (Hotamisligil und Breakefield 1991) bezeichnet wird, in ADH-Patienten untersucht. Allerdings wurde zwischen keinem der beiden Polymorphismen und ADH ein Zusammenhang gefunden (Lawson *et al.* 2003). Auch Lung *et al.* untersuchten 2006 den uVNTR-Polymorphismus in einer Fall-Kontroll-Studie mit ADH-Patienten und konnten keinen Zusammenhang zwischen Genotyp und Erkrankung darstellen.

Im Rahmen von Untersuchungen zur Gewaltspirale (Cycle of Violence), dass also misshandelte Kinder im Erwachsenenalter selbst auch zu Gewalttätern werden können, wurde *MAOA* einbezogen (Craig 2007). In einer Langzeitstudie über 26 Jahren wurden Daten aus dem familiären und sozialen Umfeld von 442 Probanden gesammelt und ihr Verhalten als Erwachsene dokumentiert. Für das soziale Verhalten wurde ein kombinierter Index vergeben, der zum Beispiel die Selbsteinschätzung zur Gewaltneigung und Verhaltensstörungen beinhaltet. Von allen Probanden wurde der Promotor-Polymorphismus des *MAOA* typisiert und die Gen-Umwelt-Interaktionen in Bezug zu Verhaltensauffälligkeiten untersucht. Der eigene *MAOA*-Genotyp hat keinen Einfluß darauf, ob die Kinder misshandelt werden und in welchem Maße. Aber es stellte sich heraus, dass antisoziales Verhalten in statistisch signifikant höherem Masse bei den Männern mit geringer *MAOA*-Aktivität auftrat, die als Kinder irgendeine Art Misshandlung erfahren mussten (Caspi *et al.* 2002). Diese Untersuchung zeigt deutlich, dass die Erfahrungen, die in jungen Jahren gemacht werden, auch Auswirkungen auf das spätere Verhalten haben und somit kann auch das Management mit jungen Tieren (Becker und Lobato 1997) im Zusammenhang mit Polymorphismen ihr späteres Verhalten beeinflussen.

2.4.3.5 MAOA bei Tieren

Newman *et al.* (2005) untersuchten 45 männliche Rhesusaffen mit Verhaltenstests und analysierten einen funktionalen Längenpolymorphismus im Promotorbereich des *MAOA*-Gens der Affen mit drei Allelen (5, 6 oder 7 Wiederholungen). Die Arbeitsgruppe stellte signifikante Effekte der Interaktion Genotyp x Aufzuchttyp (mit Mutter oder Amme) fest. Affen mit dem „low activity Allel“ zeigten bei Mutteraufzucht vermehrt aggressives Verhalten sowohl im Futterneidtest als auch Revierverhaltenstest im Vergleich mit „low activity Allel“ Affen mit Ammenaufzucht. Dieser Polymorphismus sowie weitere in anderen Genen (*DRD4* und *SERT*) wurden bei verschiedenen Affenarten untersucht (Wendland *et al.* 2006). Es stellte sich heraus, dass Affenarten, die tolerantes Verhalten zeigen, keine

Variationen im *MAOA*-Genotyp haben. Im Gegensatz dazu sind intolerante und stark hierarchisch strukturierte Affenarten im *MAOA*-Gen polymorph.

2.4.3.6 MAOA-knockout-Tiere

In einer Studie mit transgenen Mäusen, deren *MAOA*-Genexpression gehemmt ist, zeigten sich altersabhängige Verhaltensänderungen (Cases *et al.* 1995). So fielen Neugeborene durch intensives Kopfnicken auf. Im Alter von 5 bis 10 Tagen zeigten die jungen Mäuse verlängerte und stärkere Reaktionen auf Kneifen, Rückwärtsdrang statt Erkundungsverhalten und Zittern nach Bewegung. In etwas höherem Alter (11-16 Tage) versuchten die Mäuse, ihren Handler zu beißen, hatten ein gestörtes Schlafverhalten, zeigten gebückte Körperhaltung, rannten und sprangen wild umher und versteckten sich als Reaktion auf gemäßigte Geräusche und Bewegungen. Diese atypischen Verhaltensweisen der Jungtiere ließen sich auch in nicht ganz so ausgeprägter Form bei Wildtyp-Mäusen mit einem *MAOA*-Inhibitor (Clorgyline) erzeugen. Bei den ausgewachsenen *MAOA*-defizienten Mäusen war auffällig, dass die männlichen Tiere offensives aggressives Verhalten zeigen. Zu diesem Ergebnis kamen auch Popova *et al.* (2001), die in ihrer Studie *MAOA*-knockout-Mäuse verschiedenen Verhaltens-tests zur Untersuchung von Angst, Schreckreaktion, Bewegungs- und Erkundungsaktivität, Aggression der Männchen und sexueller Motivation unterzogen. Für die Untersuchung der Aggression wurde die Testmaus mit einer anderen für zehn Minuten zusammengesetzt und die Dauer, bis es zum Kampf kommt, die Dauer des Kampfes und Anzahl der Kämpfe aufgezeichnet. Die männlichen Knockout-Mäuse kämpften zwar weniger, aber dafür waren die einzelnen Kämpfe heftiger, was sich in höheren Todesfallzahlen widerspiegelte.

Chen *et al.* beschrieben 2004 in einer *MAOB*-knockout-Mäusepopulation eine spontan auftretende Punktmutation im *MAOA*-Gen, die dazu führt, dass auch *MAOA* nicht produziert wird. Diese Mutation im Exon VIII des *MAOA* induziert ein Stoppcodon und ist somit der humanen C936T Mutation (Brunner *et al.* 1993a; Brunner *et al.* 1993b) sehr ähnlich. Bei den Doppel-knockout-Mäusen zeigte sich ein spezifischer biochemischer Phänotyp (Messung in Gehirnhomogenisaten), der sich von singulär *MAOA*- bzw. *MAOB*-knockout-Mäusen unterscheidet. Dies bezieht sich besonders auf das Serotonin- und Phenylethylaminlevel. Bezüglich der Verhaltensphänotypen, die in verschiedenen Tests ermittelt wurden, weisen die *MAOA*-knockout-Mäuse im Vergleich zu den Doppel-knockout-Mäusen ein weniger ängstliches und aggressiveres Verhalten auf. Dies begründeten Chen *et al.* (2004) mit den unterschiedlichen biochemischen Profilen der Tiere.

2.4.4 Serotonintransporter

Der Neurotransmitter Serotonin (5HT), ein biogenes Amin, kann mit verschiedenen prä- und postsynaptischen Rezeptoren sowohl peripher als auch zentral agieren. Die Wirkung des Serotonin wird durch den Rücktransport in das präsynaptische Neuron terminiert. Für diesen Vorgang ist der Serotonintransporter (5HTT, SLC6A4) zuständig (Lesch und Gutknecht 2005; Mortensen *et al.* 1999).

Das Serotoninsystem ist während der Ontogenese und weiteren neuronalen Entwicklung für die Spezifikation und Differenzierung von Bedeutung (Lesch und Gutknecht 2005; Semenova 1997). Im adulten Gehirn ist Serotonin an verschiedenen biologischen Funktionen, wie dem circadianen Rhythmus, endokrinen Aktivitäten, Erinnerung, Schlaf, Appetit, Schmerzempfindung und Emotionen, beteiligt (Bellivier *et al.* 2002; Lesch und Mössner 1998). Störungen des Serotoninsystems können unter anderem zu Depressionen, Angstverhalten, Panikattacken und Zwangsstörungen führen (Deakin 1991; Ressler und Nemeroff 2000). Bei ängstlichen Hunden wurden im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöhte Serotoninspiegel im Plasma nachgewiesen (Riva *et al.* 2008).

2.4.4.1 Physiologische Funktion des Serotonintransporters

Der Serotonintransporter (SERT) ist das Schlüsselenzym für die Regulation der Konzentration von Serotonin im synaptischen Spalt (Bellivier *et al.* 2002). Der Rücktransport des Serotonins in das präsynaptische Neuron kann nur über den Serotonintransporter vermittelt werden und stellt somit eine Art „biologischen Flaschenhals“ im Serotoninsystem dar (Lesch und Mössner 1998).

2.4.4.2 Medizinische Beeinflussung des SERT

Selective Serotonin Reuptake Inhibitors (SSRIs), die mit dem Serotonintransporter agieren, werden zur Therapie verschiedener Erkrankungen eingesetzt. Dazu zählen Depressionen, Ängste und Erkrankungen, die mit dem Verlust der Kontrolle einhergehen bzw. repetitive Verhaltensweisen zeigen (Lesch und Gutknecht 2005; Lesch und Mössner 1998; Sutcliffe *et al.* 2005). Die Interaktion mit dem SERT kann über eine Inhibition der Serotoninaufnahme oder auch einer Umkehrung des Transportes erfolgen (Mathews *et al.* 2004).

Die Wirkung verschiedener Drogen, zum Beispiel Kokain und Amphetamine, beruht auf einer Wechselwirkung mit dem Serotonintransporter (Mortensen *et al.* 1999).

2.4.4.3 Das Gen des Serotonintransporter: *SERT*

Das Gen des Serotonintransporters, *SERT*, ist beim Menschen auf Chromosom 17q12.2 lokalisiert. Es umschließt einen Bereich von 31-35 kb und besteht aus 14 Exons (Lesch *et al.* 1994; Lesch und Merschdorf 2000).

Die Klonierung des bovinen *SERT* und Aufklärung der Struktur erfolgte 1999 (Mortensen *et al.*). Die codierende Sequenz umfasst bei *Bos taurus* 1892 Basenpaare (GenbankNr. NM_174609). *SERT* ist beim Rind auf BTA19 stromaufwärts lokalisiert und besteht aus 14 Exons (GenID 282365). Die Aminosäurestruktur zwischen *Bos taurus* und *Homo sapiens* sind zu 93 % identisch, zwischen *Bos taurus* und *Ovis aries* zu 98 %, das entspricht Unterschieden bei 11 der 630 Aminosäuren (Mortensen *et al.* 1999).

2.4.4.4 Polymorphismen im humanen *SERT*-Gen und Assoziationen

Der am häufigsten untersuchte Polymorphismus des *SERT*-Gen ist eine 44 Basenpaar Insertion/Deletion im Promotor (5HTTLPR, Serotonintransportergene-linked-polymorphic-region), die 1995 das erste Mal beschrieben wurde (Heils *et al.*). Bei Vorliegen einer homozygoten Deletion wird der Genotyp als „SS“ („Short-Short“) bezeichnet, bei homozygoter Insertion entsprechend „LL“ („Long-Long“). Das Vorliegen der „Long“-Variante beeinflusst die Expression des Serotonintransporters *in vitro* positiv und es kommt in der Folge zu einer im Vergleich zur „Short“-Variante 1,9 - 2,2fach höheren Wiederaufnahme von Serotonin in die Zelle (Hallikainen *et al.* 1999; Lesch *et al.* 1996). In einer *in vivo* Studie wurde mittels Positronenemissionstopographie nachgewiesen, dass dieser Promotorpolymorphismus keinen Einfluss auf die Effektivität der Serotoninbindung habe (Shioe *et al.* 2003).

Für diesen Polymorphismus sind Assoziationen zu verschiedenen Erkrankungen und Verhaltensphänotypen, wie ängstliches Verhalten (Lesch *et al.* 1996), Alkoholismus mit antisozialem-aggressivem Verhalten und Medikamentenmissbrauch (Hallikainen *et al.* 1999), beschrieben. Der Zusammenhang des *SERT*-Genotyps zu Angstverhalten, dargestellt durch den Aspekt Harm Avoidance des TPQ, konnte in einer israelischen Studie von 1997 nicht bestätigt werden (Ebstein *et al.*). In einer japanischen Population wurden andere Genotypfrequenzen als bei Ebstein gefunden und es konnte eine Assoziation zu ängstlichem Verhalten bestätigt werden, sowie eine Verbindung zu den Scores für Harm Avoidance dargestellt werden (Katsuragi *et al.* 1999). Ein Zusammenhang zwischen Promotorpolymorphismus des *SERT* und phobischen Erkrankungen als eine Steigerung von Angstverhalten konnte nicht dargestellt werden (Samochowiec *et al.* 2004). Gerra *et al.* (2004) analysierten 101 Heroinabhängige und eine entsprechende Kontrollgruppe bezüglich

dieses Polymorphismus und führten psychiatrische Untersuchungen durch. Sie stellten fest, dass der 5-HTT-SS-Genotyp in der Gruppe der Heroinabhängigen signifikant häufiger als in der Kontrollgruppe vorkommt und signifikant mit dem Vorliegen gewalttätigen und kriminellen Verhaltens in Verbindung steht. Diese Ergebnisse konnten in einer weiteren Studie mit Persönlichkeitsmerkmalen bestätigt werden (Gerra *et al.* 2005).

Ein weiterer Polymorphismus ist ein VNTR im Intron 2 (Battersby *et al.* 1996; Ogilvie *et al.* 1996). Dieser besteht aus einem 16/17bp-Repeat, der in neun, zehn oder zwölf Kopien vorliegt (Lesch und Gutknecht 2005). Mit Mäuseembryonen konnte dargestellt werden, dass das Allel mit zwölf Kopien (STIn2.12) in der *Medulla oblongata* eine höhere Expression als STIn2.10 aufweist. Es wird vermutet, dass die Region dieses Polymorphismus als Transkriptionsregulator agiert (MacKenzie und Quinn 1999). Diese Ergebnisse sind identisch mit denen einer Expressionsstudie des Intron 2-Polymorphismus mit embryonalen Stammzellen (Fiskerstrand *et al.* 1999). In Assoziationsstudien konnte ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten des Allels mit neun Kopien des VNTR in Intron 2 und uni- sowie bipolaren Erkrankungen nachgewiesen werden (Battersby *et al.* 1996; Ogilvie *et al.* 1996). In einer japanischen Studie wurden diese Ergebnisse nicht belegt (Kunugi *et al.* 1996). Es besteht jedoch ein hochsignifikanter Unterschied in den Allel- und Genotypfrequenzen zwischen japanischen (2 Allele) und europäischen (3 Allele) Populationen (Kunugi *et al.* 1996). In anderen Studien wurden signifikante Assoziationen zwischen dem Vorliegen des Allels mit 12 Kopien und bipolarer Erkrankung, nicht jedoch unipolaren Erkrankungen, nachgewiesen (Collier *et al.* 1996; Kunugi *et al.* 1997).

Die gemeinsame Auswirkung sowohl des Promotor- als auch des Intron-Polymorphismus wurde 2002 von Kaiser *et al.* am Modell der Blutplättchen, deren Serotoninstoffwechsel dem in neuronalen Gewebe entspricht, untersucht. In dieser Studie konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen den genetischen Varianten und dem Serotoninstoffwechsel dargestellt werden. Eine Haplotypenanalyse beider Polymorphismen wurde 2006 in Verbindung mit verschiedenen Persönlichkeitsmerkmalen nach TPQ und NEO-PI-R durchgeführt (Vormfelde *et al.*). Assoziationen zwischen dem Haplotyp L 12 („long“-Allel im Promotor und 12bp Allel im Intron 2) mit Angstverhalten und Novelty Seeking zeigten sich nur bei den männlichen Probanden, nicht jedoch bei den weiblichen.

In einer Kopplungsanalyse in Autismusfamilien wurde der Abschnitt q11.2 auf Chromosom 17, in dessen Nähe das Gen des Serotonintransporters lokalisiert ist, als signifikant identifiziert (McCauley *et al.* 2004). Verschiedene Polymorphismen in unterschiedlichen Abschnitten des *SERT*-Gens treten bei Autisten häufiger auf und es bestehen signifikante

Assoziationen zwischen Autismus und einem SNP im Intron 5 sowie dem Promotorpolymorphismus (McCauley *et al.* 2004; Sutcliffe *et al.* 2005). Die bei vielen Autisten nachgewiesene Hyperserotoninämie kann physiologisch auf das signifikant häufigere Vorkommen des „LL“-Genotyps des 5HTTLPR zurückgeführt werden (Yirmiya *et al.* 2001).

2.4.4.5 SERT bei Tieren

Bei verschiedenen Primaten und anderen Säugetieren wurde der Promotor des *SERT* untersucht. Bei den Primaten und dem Mensch konnte der 5HTTLPR mit verschiedenen Allelen dargestellt werden, die sich mit den Erkenntnissen der Evolution in Einklang bringen lassen. Bei Maus und Spitzhörnchen konnte kein Polymorphismus im untersuchten Genabschnitt nachgewiesen werden (Lesch *et al.* 1997). Bei sieben verschiedenen Spezies des Genus *Macaca* konnten fünf verschiedene Allele des 5HTTLPR dargestellt werden, deren Allelfrequenzen zwischen den Spezies variieren. Tolerante und wenig hierarchisch organisierte Spezies wie zum Beispiel Tonkean-Makak und Berberaffen sind monomorph für ein Allel. Rhesusaffen, die das höchste Aggressionspotential unter Affen haben und am meisten Intoleranz zeigen, sind an diesem Genort polymorph (Wendland *et al.* 2006).

2.4.4.6 SERT-knockout-Tiere

Serotonintransporter-knockout-Mäuse (*SERT*^{-/-}) sind lebensfähig und zeigen sich in ihrer Entwicklung und Vermehrung unauffällig (Holmes *et al.* 2002b). Dennoch lassen sich signifikant höhere Serotinspiegel im *Corpus Striatum* nachweisen (Mathews *et al.* 2004).

In einem Alter von sechs Monaten haben *SERT*-knockout-Mäuse ein signifikant höheres Körpergewicht als der Wildtyp, wenn der Mäusestamm C57BL/6J der Mutation zugrunde liegt. Mit dem Mäusestamm 129S6 lassen sich diese Ergebnisse nicht replizieren (Holmes *et al.* 2002b). Im Cat Room Exposure Test und Elevated Plus Maze Test haben die Knockout-Mäuse eine im Vergleich zu Wildtyp- und *SERT*^{+/-}-Mäusen erhöhte Anfälligkeit für andauerndes Angstverhalten (Adamec *et al.* 2006). In Tests zu eigenständigem Grab- und Käfiggestaltungsverhalten zeigen die Knockout-Tiere im Vergleich zu den Wildtypen Hypoaktivität. Heterozygote Knockout-Mäuse unterscheiden sich diesbezüglich nicht von den Wildtypmäusen (Kalueff *et al.* 2006). In einer früheren Studie wurde primär im Resident-Intruder-Test das Aggressionsverhalten der Tiere untersucht. Die Knockout-Mäuse brauchten signifikant länger Zeit bis zum ersten Angriff auf den „Eindringling“ und sie bissen signifikant weniger zu als Wildtyp-Mäuse. *SERT*^{+/-}-Mäuse zeigten ein intermediäres Verhalten mit einer ähnlich kurzen Dauer bis zum ersten Angriff wie der Wildtyp, aber die Anzahl der Bisse entspricht der der Knockout-Mäuse. Da die *SERT*^{-/-}-Mäuse aber beim

ebenfalls untersuchten Sozialverhalten keine Unterschiede zum Wildtyp aufwiesen, wird keine generelle Hypoaktivität, sondern ein reduziertes Aggressionsverhalten postuliert (Holmes *et al.* 2002a).

Ratten, die keinen Serotonintransporter exprimieren, zeigen identisches Verhalten wie Wildtyp-Ratten. Nur die weiblichen Ratten im Alter von drei Wochen unterscheiden sich durch ein zehn Prozent geringeres Gewicht. Die Serotoninwiederaufnahme der SERT-knockout-Ratten im Hippocampus in das präsynaptische Neuron ist jedoch im Vergleich mit den Wildtyp-Ratten nur um 72,2% reduziert. Dies wird mit einer partiellen Übernahme des Transportes durch noradrenerge Neurone begründet (Homberg *et al.* 2007).

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Tiere

Für die Untersuchung standen die Kälber der Jahrgänge 1998 bis 2001 der Rassen Dt. Angus (DA) und Dt. Fleckvieh (FV) zur Verfügung. Die Tiere wurden auf dem Lehr- und Versuchsbetrieb Rudlos der Justus-Liebig-Universität Gießen geboren und aufgezogen und in zwei Studien bezüglich ihres Verhaltens getestet (Mathiak 2002; Urban 2007).

Es handelt sich insgesamt um 962 Kälber, die sich auf 545 Dt. Angus Kälber von sechs Vätern und 417 Dt. Fleckvieh Kälber von acht Vätern aufteilen. Die Halbgeschwisterfamiliengrößen variieren zwischen 29 und 111 Kälbern bei den Dt. Angus und bei den Dt. Fleckvieh zwischen 16 und 84 Kälbern (siehe Tabelle 1). Eine Aufstellung der Vollgeschwistergruppen je Bulle findet sich in Anhangstabelle 1A. 50,46% der DA-Kälber und 49,40% der FV-Kälber sind männlich.

3.1.2 Probenmaterial

Als Probenmaterial standen von allen Kälbern der vier Jahrgänge sowie den eingesetzten 14 Bullen Blut- und DNA-Proben zur Verfügung.

Als Test-DNA zur PCR-Austestung stand DNA einer Fleckviehkuh der Lehr- und Forschungsstation Oberer Hardthof zur Verfügung und die Sequenzierungen zur Mutationssuche erfolgten an fünf Müttern je Rasse.

Die Überprüfung der Segregation der Nukleotidaustausche erfolgte in Familienmaterial (Bulle mit Kühen und Kälbern) und zur Bestimmung der Allelfrequenzen der Polymorphismen in den beiden Rassen wurden je Rasse 48 unverwandte Mütter typisiert (siehe Anhangstabelle 2A).

Für die Kartierung des *DRD4*-Gens wurden die DNA-Proben aller Mütter (Dt. Angus: $n = 164$; Dt. Fleckvieh: $n = 157$) mit in die Analyse einbezogen.

Tabelle 1: Aufstellung der Halbgeschwisterfamilien nach Rassen getrennt, mit Nachkommenzahlen je Jahr und nach Geschlechtern getrennt.

DE-Nr.	Bulle	Name Bulle	1998	1999	2000	2001	Gesamt- nach- kommen	♂	♀	Gesamt je Rasse
Dt. Angus										
DE0665118487		Claudius	24	27	24	29	104	48	56	
DE0340386055		Heino	25	28	29	0	82	50	32	
DE0665123113		Hiro	0	0	0	29	29	14	15	
DE0340118479		Pamtera	26	31	23	29	109	48	61	
DE0665094128		Pauker	24	28	27	31	110	54	56	
DE0665118486		Vollkorn	26	28	27	30	111	61	50	
Gesamt DA								275	270	545
Dt. Fleckvieh										
DE0665124735		Habsburg	0	0	0	16	16	5	11	
DE1500244225		Herkan	22	23	18	0	63	32	31	
DE0980232295		Honannes	25	22	17	20	84	38	46	
DE0932318461		Mambo	0	0	0	19	19	9	10	
DE1500258855		Matze	24	13	23	21	81	43	38	
DE0576839147		Paros	22	25	21	9	77	37	40	
DE0930336668		Poker	0	0	22	16	38	20	18	
7760280		Theo	21	18	0	0	39	22	17	
Gesamt FV								206	211	417

3.1.3 Verhaltensdaten

Die Verhaltensparameter für die Kälber wurden in zwei Studien erhoben (Mathiak 2002; Urban 2007), in denen die Verhaltenstests ausführlich beschrieben sind. Hier folgt nur ein kurzer Abriss und die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Zusammenstellung der Daten beider Studien.

3.1.3.1 Anbindetest

Mit den Kälbern aller vier Jahrgänge wurde im Alter von ca. drei Wochen (im Mittel 21 Tage) ein Anbindetest (modifiziert nach Boissy und Bouissou, 1988) durchgeführt. Für diesen wurde das Kalb von der Herde separiert und mittels Kopfstrick im Kälberschlupf angebunden. Währenddessen bestand Sichtkontakt zur Herde.

Der Handler, in den Jahren 1998 und 1999 sowie in den Jahren 2000 und 2001 je eine Person, vergab nach zweiminütiger Anbindezeit einen Score für das Verhalten des Kalbes. Der Score reichte von 1 = „ruhig stehend mit locker durchhängendem Strick“ bis 5 = „wild und kräftig gegen die Fixierung kämpfend, versucht sich zu befreien“ und wurde als MIN2AT bezeichnet (Mathiak 2002; Urban 2007). Die Heritabilität dieses Scores lag bei $0,070 \pm 0,030$. Eine Darstellung der vergebenen Scores über die vier Jahrgänge ist in Tabelle 2 zu finden.

Dieser Score lag insgesamt für 93,5 % der Kälber vor.

Tabelle 2: Bewertung der Kälber der Jahrgänge 1998 – 2001 für den Score MIN2AT.

MIN2AT	1	2	3	4	5	Gesamt
Beschreibung	Ruhig, Strick hängend	Ruhig, Strick gespannt	Unruhig, nervös	Nervös, kräftiges Ziehen	Befreiungs- versuche	
n	339	339	111	104	7	900
%	37,67	37,67	12,33	11,55	0,78	100

3.1.3.2 Wiegetest

Im Alter von ca. fünf Monaten (im Mittel 152 Tage) wurde mit den Tieren ein Wiegetest (modifiziert nach Tulloh, 1961a) durchgeführt. Die Tiere wurden einzeln durch einen Treibgang zur Waage geschickt. Für das Verhalten beim Eintreten in die Waage und sowie während des Wiegevorgangs wurden Scores vergeben.

Der Score während des Eintretens (SCEINWT) wurden in den Jahrgängen 1998 und 1999 mit einer Skala von eins bis vier bewertet (Mathiak 2002) und in den darauf folgenden beiden Jahrgängen mit einer Skala von eins bis drei (Urban 2007). Aufgrund der Beschreibungen

wurden die Scores aneinander angepasst. Nach Analysen jeweils innerhalb der entsprechenden Jahrgänge und über alle vier Jahre wurden aufgrund vergleichbarer Ergebnisse die statistischen Auswertungen auch für dieses Merkmal über alle vier Jahrgänge mit den so entstandenen fünf Bewertungsstufen durchgeführt. Somit bestehen folgende Definitionen:

Score 1,0 = „Eintreten ohne Hilfe“ (1998, 1999, 2000 und 2001),

Score 2,0 = „Eintreten nach verbaler Aufforderung“ (nur 1998 und 1999),

Score 2,5 = „Eintreten mit verbaler oder taktiler Aufforderung“ (nur 2000 und 2001),

Score 3,0 = „Eintreten nach Aufforderung mit Tierkontakt“ (nur 1998 und 1999),

Score 4,0 = „Eintreten mit massiven Schwierigkeiten“ (1998, 1999, 2000 und 2001).

Der Score während des Wiegevorgangs (SCWGWT) wurde über alle vier Jahrgänge mit einer Skala von eins bis fünf bewertet, wobei Score 1 = „ruhiges Stehen ohne Bewegung“ und Score 5 = „massiver Widerstand gegen die Fixierung, versucht sich zu befreien“ mit entsprechenden Abstufungen der Scores 2, 3 und 4 bedeuten. Der Score SCEINWT ist für 95,3 % der Kälber und der Score SCWGWT für 95,0 % der Kälber erfasst worden. Die Heritabilitäten sind für SCEINWT $0,152 \pm 0,037$ und für SCWGWT $0,279 \pm 0,051$. Die Verteilung der Scores über die vier Jahrgänge ist in Tabelle 3 für SCEINWT und in Tabelle 4 für SCWGWT aufgeführt.

Tabelle 3: Bewertung der Kälber der Jahrgänge 1998 – 2001 für den Score SCEINWT.

SCEINWT	1,0	2,0	2,5	3,0	4,0	Gesamt
Beschreibung	Ohne Hilfe	Verbale Aufforderung	Verbale/taktile Aufforderung	Tierkontakt	Massive Schwierigkeiten	
n	499	146	107	144	21	917
%	54,42	15,92	11,67	15,70	2,29	100

Tabelle 4: Bewertung der Kälber der Jahrgänge 1998 – 2001 für den Score SCWGWT

SCWGWT	1	2	3	4	5	Gesamt
Beschreibung	Ruhig Stehen	Gelegentlich Bewegen	Unruhig nervös	Rütteln	Befreiungsversuche	
n	128	346	321	102	17	914
%	14,00	37,86	35,12	11,16	1,86	100

3.1.3.3 Separier- und Rückhaltetest

Als dritter Test wurde ein Separier- und Rückhaltetest (modifiziert nach Le Neindre *et al.*, 1995) im Alter von sieben bis acht Monaten (im Mittel 228 Tage) durchgeführt.

Bei diesem zusammengesetzten Test wurde zuerst der Separiertest und in direktem Anschluss der Rückhaltetest durchgeführt. Aus einem abgegrenzten Separierpaddock versuchte der Handler, das Kalb ohne Berührung aus einer Gruppe von zehn Tieren in den angrenzenden Rückhaltepaddock zu separieren. Für diesen Separiertest standen maximal 180 Sekunden zur Verfügung. Anschließend wurde das Kalb zur Gewöhnung im Rückhaltepaddock alleine gelassen und nach 30 Sekunden stellte sich der Handler für 30 Sekunden mit hinein. Dann begann die eigentliche Handlingperiode des Rückhaltetestes und der Handler versuchte, das Kalb innerhalb von 120 Sekunden in eine definierte Ecke des Paddocks zu treiben, in der es zurückgehalten werden sollte. Geling das Zurückhalten für 30 Sekunden, wurde versucht, sich dem Kalb zu nähern und es zu streicheln. Nach weiteren maximal 30 Sekunden wurde der Test beendet.

Hierbei vergab der Handler einen Score für das Kalb während des Handlings (SCAST). Dieser hat fünf Bewertungsstufen hat mit Score 1 = „Ruhiges Tier“ und Score 5 = „Extrem aufgeregtes Tier“ und entsprechenden Abstufungen (Mathiak 2002; Urban 2007). Die Heritabilität für diesen Score lag bei $0,310 \pm 0,055$.

Eine Aufschlüsselung der Bewertung der Kälber für den Score SCAST ist Tabelle 5 zu entnehmen. Für 94,9% der Kälber war dieser Score vorliegend.

Tabelle 5: Bewertung der Kälber der Jahrgänge 1998 – 2001 für den Score SCAST.

SCAST	1	2	3	4	5	Gesamt
Beschreibung	Ruhig	Unruhig	Nervös	Aufgeregt	Extrem aufgeregt	
n	157	414	255	76	11	913
%	17,20	45,35	27,93	8,32	1,20	100

3.1.4 Geräte

Abdeckmatte für Thermoblock

*Perkin Elmer Applied Biosystems GmbH,
Weiterstadt*

Analysewaage AC211S

Satorius AG, Göttingen

Autoklav Webeco Modell C

Webeco, Bad Schwartau

Bidestanlage Bi-Dest 2302

*Gesellschaft für Labortechnik mbH,
Burgwedel*

Brutschrank

Heraeus Instruments GmbH, Hanau

Centrifuge 5804 mit Rotor A-2-DWP

Eppendorf AG, Hamburg

Centrifuge 5810R mit Rotor A-4-62

Eppendorf AG, Hamburg

Centrifuge/Vortex Combi-spin FVL 2400	<i>Peqlab</i> , Erlangen
Digital Graphic Printer UP-D895	<i>Sony</i> , Tokyo, Japan, Vertrieb in Deutschland über <i>Biometra</i> , Göttingen
Distriman	<i>Gilson International B.V.</i> , Bad Camberg
DNA-Sequenzierautomat ALFexpress mit Gelkassette bestehend aus Standard Thermo Platte, Standard Glasplatte, Kamm und Spacer je 0,5 mm stark	<i>Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH</i> , Freiburg (jetzt <i>GE Healthcare Europe GmbH</i> , Freiburg)
DNA-Sequenzierautomat ABI PRISM® 377 DNA Sequencer mit Borosilikat-Glasplatten (36 cm und 12 cm Länge), mylaren Spacern (0,2 mm stark), 36-well und 48-well Haifisch zahnkamm (mylar, 0,2 mm stark)	<i>Applied Biosystems</i> , Darmstadt
Eisflockenbereiter SPR80AS	<i>NordCap GmbH</i> , Bremen
Eismaschine Scotsman AF10	<i>Kälte Mack</i> , Maintal
Elektrophoresekammer Modell HRH	<i>International Biotechnologies Inc.</i> , New Haven, Connecticut, USA
Gelkämme und Gelschlitten diverser Größen	<i>Von Keutz Labortechnik GmbH</i> , Reiskirchen
HLC Blockthermostat BT 1301	<i>MAGV Massanalytische Glas- und Laborgerätevertriebsgesellschaft mbH</i> , Rabenau-Londorf
Horizontalelektrophoresekammern mini und midi, ungekühlt	<i>Von Keutz Labortechnik GmbH</i> , Reiskirchen
iCycler 96well Thermocycler	<i>Bio-Rad</i> , München
Inkubator Certomat® H	<i>B. Braun Melsungen AG</i>
Magnetrührer MR2002	<i>Heidolph</i> , Kelkheim
Microprocessor pH-Meter pH 537	<i>Wissenschaftlich technische Werkstätten</i> , Weilheim
Mikrowelle	<i>Siemens-Electrogeräte GmbH</i> , München
Minichiller	<i>Peter Huber Kältemaschinenbau GmbH</i> , Offenburg
Multipette	<i>Eppendorf AG</i> , Hamburg

Netzgerät ConsortE425 für die Elektrophorese	<i>MAGV Massanalytische Glas- und Laborgerätevertriebsgesellschaft mbH, Rabenau-Londorf</i>
Netzgeräte Power Pac 1000 und 3000 für die Elektrophorese	<i>Bio-Rad, München</i>
Pipetten Pipetman P10, P20, P100, P200, P1000	<i>Gilson International B.V., Bad Camberg</i>
Pipetten Research pro 0,5-10 µl, 50-1200 µl	<i>Eppendorf AG, Hamburg</i>
Pipettier-Roboter CAS-1200™	<i>Corbett Life Science, Sydney, Australia:</i>
Repro Set (UV-Licht)	<i>Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg (jetzt GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg)</i>
Schüttelplatte KS10	<i>Edmund Bühler, Tübingen</i>
submarine/horizontal Gel Unit	<i>CBS Sientific CO, Del Mar, California</i>
Thermocycler PE 9600	<i>Perkin Elmer Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt</i>
Transferpette®-8 von 2,5 bis 25 ml	<i>Brand GmbH + Co KG, Wertheim</i>
Transilluminator Biometra Ti5	<i>Biometra, Göttingen</i>
Vortex Reax 2000	<i>Heidolph, Kelkheim</i>
Waage E1B120	<i>OHAUS, Schweiz</i>
Waage KERN EW2200	<i>Kern & Sohn, Balingen</i>
Wasserbad	<i>Köttermann Labortechnik, Uetze-Hänigsen</i>
Wasserbad GFL	<i>MAGV Massanalytische Glas- und Laborgerätevertriebsgesellschaft mbH, Rabenau-Londorf</i>
Wasserbad Julabo 22A	<i>Julabo Labortechnik, Saalbach</i>
Zentrifuge Biofuge 13R	<i>Heraeus Instruments GmbH, Hanau</i>

3.1.5 Verbrauchsmaterialien

Biosphere® Filter Tips 100 µl	<i>Sarstedt AG&Co., Nümbrecht</i>
Combitips 0,05 ml	<i>Eppendorf AG, Hamburg</i>

Distritips Micro, Mini, Maxi	<i>Gilson International B.V.</i> , Bad Camberg
Filter Tips 10 µl, 1000 µl	<i>nerbe plus GmbH</i> , Winsen/Luhe
Filter Tips 20 µl, 200 µl	<i>Peqlab</i> , Erlangen
K-EDTA Monovetten 9 ml	<i>Sarstedt AG&Co.</i> , Nümbrecht
Kimwipes®	<i>Kimberly-Clark</i> , Roswell, USA
Latexhandschuhe	<i>G. Kisker GbR</i> , Steinfurt
Membranfilter ME25 (Porengröße 0,45 µm)	<i>Whatman GmbH</i> , Dassel
Multiply®-µ Strips 0,2 ml 8er Kette mit	<i>Sarstedt AG&Co.</i> , Nümbrecht
Multiply® Deckelkette 8er Kette	
Nitrilhandschuhe latexfrei	<i>MAGV Massanalytische Glas- und</i> <i>Laborgerätevertriebsgesellschaft mbH</i> , Rabenau-Londorf
PCR-Cups Soft Tubes® mit Deckel Soft	<i>Biozym Scientific GmbH</i> , Hess. Olden-
Strips®	dorf
PCR-Gefäße in Streifen mit 0,2 ml Kappen	<i>VWR International GmbH</i> , Darmstadt
streifen	
PCR-Platte PP 96well mit Kappenstreifen	<i>nerbe plus GmbH</i> , Winsen/Luhe
Petrischalen	<i>Sarstedt AG&Co.</i> , Nümbrecht
Photopapier Type V UPP-110HG	<i>Sony</i> , Tokyo, Japan, Vertrieb in Deutsch-
	land über <i>MS Laborgeräte Schröder</i> , Wiesloch
Reagiergefäße 1,5 ml (Cups)	<i>Sarstedt AG&Co.</i> , Nümbrecht
Röhrchen 13 ml	<i>Sarstedt AG&Co.</i> , Nümbrecht
Quali PCR-Platten 96well mit Quali PCR-	<i>G. Kisker GbR</i> , Steinfurt
Tube-Cups	
96well Thermowellplatten	<i>Corning Inc.</i> , Corning, New York, USA
595 ½ Faltenfilter Ø 240 mm	<i>Whatman GmbH</i> , Dassel

3.1.6 Chemikalien und Reaktionskits

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

ABI PRISM® BigDye® Terminator v1.1 Cycle *Applied Biosystems*, Darmstadt
Sequencing Kit

ABsolute™ QPCR Mix	<i>ABgene House</i> , Surrey, UK
Acrylamid/Bisacrylamid 29:1 (30 %ig w/v)	<i>Bio-Rad</i> , München
Agar-Agar	<i>Carl Roth GmbH</i> , Karlsruhe
Agarose NEEO Ultra Qualität, Rotiphorese®	<i>Carl Roth GmbH</i> , Karlsruhe
alpha-D-Glucose	<i>Serva Feinbiochemica GmbH & Co.</i> , Heidelberg
Ammoniumchlorid	<i>Merck KGaA</i> , Darmstadt
Ammoniumpersulfat (APS)	<i>Amresco</i> , Ohio, USA
Ampicillin-Natriumsalz	<i>AppliChem</i> , Darmstadt
Bind-Silane	<i>Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH</i> , Freiburg (jetzt <i>GE Healthcare Europe GmbH</i> , Freiburg)
BlueDextran 2000	<i>GE Healthcare Europe GmbH</i> , Freiburg
Borsäure	<i>AppliChem</i> , Darmstadt
Bromphenolblau	<i>United States Biomedical Corp.</i> , Ohio, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	<i>Carl Roth GmbH</i> , Karlsruhe
Dodecylsulfat-Na-Salz (SDS)	<i>Serva Feinbiochemica GmbH & Co.</i> , Heidelberg
EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat	<i>AppliChem</i> , Darmstadt
Essigsäure	<i>Carl Roth GmbH</i> , Karlsruhe
Ethanol	<i>Carl Roth GmbH</i> , Karlsruhe
Ethidiumbromid	<i>Serva Feinbiochemica GmbH & Co.</i> , Heidelberg
Formamid	<i>Carl Roth GmbH</i> , Karlsruhe
GFX Micro Plasmid Prep Kit	<i>GE Healthcare Europe GmbH</i> , Freiburg
Glycerol Rotipuran®	<i>Carl Roth GmbH</i> , Karlsruhe
Hefeextrakt BioChemica	<i>AppliChem</i> , Darmstadt
Isopropyl-Thio-β-D-Galactopyranosid (IPTG)	<i>Biomol Feinchemikalien GmbH</i> , Hamburg
Kaliumchlorid	<i>AppliChem</i> , Darmstadt
Long Ranger® Gel Solution	<i>Biozym Scientific GmbH</i> , Hess. Olden- dorf

Magnesium Solution (25 mM Mg(OAc) ₂)	<i>Eppendorf AG, Hamburg</i>
Magnesiumchlorid-Hexahydrat reinst	<i>Merck KGaA, Darmstadt</i>
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	<i>Merck KGaA, Darmstadt</i>
Natriumazetat	<i>Merck KGaA, Darmstadt</i>
Natriumchlorid	<i>AppliChem, Darmstadt</i>
Natriumhydroxid	<i>Merck KGaA, Darmstadt</i>
NuSieve® GTG® Agarose	<i>Cambrex Bio Science Rockland, Inc., Rockland, Maine, USA (Vertrieb über Biozym Scientific GmbH, Hess. Olden- dorf)</i>
pGEM®-T Easy Vector Systems	<i>Promega GmbH, Mannheim</i>
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	<i>Amresco, Ohio, USA und AppliChem, Darmstadt</i>
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	<i>MP Biomedicals, LLC, Eschwege</i>
Trypton/Pepton aus Casein	<i>Carl Roth GmbH, Karlsruhe</i>
Urea	<i>AppliChem, Darmstadt</i>
Wasser für die Molekularbiologie	<i>Carl Roth GmbH, Karlsruhe</i>
Wasser für HPLC	<i>KMF Laborchemie Handels GmbH, Sankt Augustin</i>
Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System	<i>Promega GmbH, Mannheim</i>
Xylencyanol FF	<i>United States Biomedical Corp., Ohio, USA</i>
10x Buffer Tango™ (33 mM Tris-Azetat (pH 7,9), 10 mM Magnesiumazetat, 66 mM Kaliumazetat, 0,1 mg/ml BSA)	<i>Fermentas, St. Leon-Rot</i>
10x Puffer B (10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM Magnesiumchlorid, 0,1 mg/ml BSA)	<i>Fermentas, St. Leon-Rot</i>
10x Puffer G3 (10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM Magnesiumchlorid, 50 mM Natriumchlorid, 0,1 mg/ml BSA)	<i>Fermentas, St. Leon-Rot</i>
10x Taq Buffer advanced (selbstregulierend, maximale Magnesium-Konzentration: 2 mM Mg ²⁺)	<i>Eppendorf AG, Hamburg</i>

10xTBE Puffer (1 M TRIS-Borat (pH 8,3), 20 mM EDTA, destilliertes deionisiertes Wasser)	<i>Carl Roth GmbH, Karlsruhe</i>
5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galactopyranosid (X-Gal)	<i>Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg</i>

3.1.7 Größenstandards

3.1.7.1 Größenstandards für die Polyacrylamidgelelektrophorese mit dem halbautomatischen Sequenziersystem ALFexpress

Als externe Marker in Geltasche 10, 20, 30 und 40 und interne Marker bei jeder Probe zur Größenbestimmung der Fragmente bei der Mikrosatellitentypisierung am ALFexpress dienten PCR-Produkte bekannter Größe (siehe Tabelle 6), die aus dem Cytochrom b-Gen der ovinen mitochondrialen DNA (Hiendleder *et al.* 1998) amplifiziert wurden. Je 50 μ l des PCR-Produktes wurden mit 150 μ l sterilfiltriertem 1xTE und 150 μ l Loading Dye versetzt.

Zum Vergleich der Gele untereinander sowie mit anderen Arbeitsgruppen wurden die Standardproben „DAgelb803“ sowie „Giessen2000“ (= DAblau25) mit analysiert.

Tabelle 6: Größen der verwendeten externen und internen Marker zur Größenbestimmung am ALFexpress in Basenpaaren.

Externe Marker	Interne Marker
74	74/170
124	74/202
170	74/266
202	124/202
266	124/202/266

3.1.7.2 Größenstandards für die Polyacrylamidgelelektrophorese mit dem ABI PRISM® 377 DNA Sequencer

Zur Größenbestimmung der Mikrosatelliten bei Typisierung am ABI PRISM® 377 DNA Sequencer wurde ein Pool von PCR-Fragmenten verwendet, der sich aus neun Fragmenten mit 74bp, 105bp, 124bp, 156bp, 170bp, 202bp, 233bp, 266bp und 315bp zusammensetzte. Diese wurden durch PCR aus dem Cytochrom b-Gen der ovinen mitochondrialen DNA amplifiziert (Hiendleder *et al.* 1998). Auch hier wurden die Standardproben „DAgelb803“ und „Giessen2000“ eingesetzt.

3.1.7.3 Größenstandards zur Agarosegelelektrophorese

GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus	<i>Fermentas</i> , St. Leon-Rot
pUC19 DNA/ <i>Msp</i> I (<i>Hpa</i> II) Marker, 23	<i>Fermentas</i> , St. Leon-Rot

3.1.8 Bakterienstamm und Vektor

JM109 Competent Cells (high efficiency)	<i>Promega</i> , Mannheim
pGEM®-T Easy Vector	<i>Promega</i> , Mannheim

3.1.9 Enzyme

Proteinase K	<i>Invitek</i> , Berlin
Restriktionsenzym <i>Alw</i> 26I	<i>Fermentas</i> , St. Leon-Rot
Restriktionsenzym <i>Bse</i> NI	<i>Fermentas</i> , St. Leon-Rot
Restriktionsenzym <i>Mn</i> II	<i>Fermentas</i> , St. Leon-Rot
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	<i>Eppendorf AG</i> , Hamburg
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	<i>5Prime GmbH</i> , Hamburg

3.1.10 Oligonukleotide

Oligonukleotide, Cy5-markiert	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH</i> , München
Oligonukleotide, NED-markiert	<i>Applied Biosystems</i> , Darmstadt
Oligonukleotide, unmarkiert	<i>biomers.net GmbH</i> , Ulm
Oligonukleotide, 6FAM-markiert	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH</i> , München
Vektorprimer M13 forward und reverse	<i>Invitrogen GmbH</i> , Karlsruhe

3.1.11 Computerprogramme

AlleleLocator Version 1.03	<i>Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH</i> , Freiburg
BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)	National Center for Biotechnology Information
CERVUS Version 3.0.3	Field Genetics Ltd., T. Marshall
ChromasPro Version 1.32	<i>Technelysium Pty Ltd</i>
Cri-Map Version 5	<i>Washington University School of Medicine</i> , St. Louis, P. Green

Genotyper V3.7	<i>Applied Biosystems</i> , Darmstadt
NEBCutter V2.0	<i>New England Biolabs</i> , Ipswich, Massachusetts, U.S.A
POPGENE V 1.32	Yeh <i>et al.</i> 1997
Primer3 (http://primer3.sourceforge.net/)	<i>Whitehead Institute for Biomedical Research</i> , Cambridge, S. Rozen & H. Skaletsky
QTLexpress (http://qtl.cap.ed.ac.uk/)	<i>Roslin Institute und University of Edinburgh</i> , Edinburgh, UK
SAS® 8.01	<i>SAS Institute Inc.</i> , Cary, NC, USA
Tetra-Primer (http://cedar.genetics.soton.ac.uk/ public_html/primer1.html)	Ye <i>et al.</i> 2001
Transcription Factor Search (http://www.cbrc. jp/research/db/TFSEARCH.html)	<i>TRC Laboratory</i> , RWCP , Japan

3.1.12 Gentechnische Arbeiten

Die gentechnischen Arbeiten wurden nach dem Gesetz zur Regelung der Gentechnik (Gentechnikgesetz, GenTG) vom 16.12.93, zuletzt geändert 17. März 2006, §7, in Labors der Sicherheitsstufe 1 des Institutes für Tierzucht und Haustiergenetik der Justus-Liebig-Universität Gießen (Ludwigstr. 21 b, 35390 Gießen) durchgeführt (Reg. Bescheid Nr. AI3/19/1/1374/90 sowie Reg. Bescheid Nr. AI3-25/1/1492/90).

3.2 Methoden

3.2.1 Blutentnahme und Aufbereitung der Blutproben

Die Blutproben der Kälber wurden der *Vena jugularis* mit Injektionskanülen und 9 ml EDTA Monovetten entnommen. Der Transport und die kurzzeitige Lagerung der Proben erfolgte gekühlt. Die Monovetten wurden anschließend bei 4°C und 3000 rpm für 15 min zentrifugiert. Über dem roten Sediment der Erythrocyten mit dem höchsten spezifischen Gewicht aller Blutbestandteile befinden sich in einer hellen Schicht die sedimentierten weißen

Blutkörperchen mit geringerem spezifischen Gewicht (Löhner 1939); dieser so genannte Buffy Coat wurde abgenommen und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

3.2.2 DNA-Extraktion

Die genomische DNA wurde mit einer modifizierten Methode nach Montgomery und Sise (1990), die auf Aussalzung beruht, aus Buffy Coat isoliert. Die Methode wurde wie bei Weimann (2000) beschrieben verwendet, allerdings wurden 80 µl Proteinase K (10 mg/ml) statt der dort angegebenen 50 µl eingesetzt.

3.2.3 Etablierung der Polymerasekettenreaktion zur Amplifizierung von Genabschnitten

3.2.3.1 Auswahl der Primer

Die Primer zur Untersuchung der Kandidatengene wurden anhand bekannter Regeln (Mülhardt 2006) aus den in der Genbank veröffentlichten Sequenzen oder den eigenen Sequenzierungsergebnissen abgeleitet. Dies wurde mithilfe des Programmes Primer3 durchgeführt (Rozen und Skaletsky 2000).

Zur Darstellung der Mikrosatelliten wurde auf bekannte Primersequenzen (<http://www.marc.usda.gov/genome/cattle/cattle.html>) zurückgegriffen. Die Rückwärtsprimer zur Analyse am ALF*express* wurden „Cy5-markiert“, d.h. am 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff Indodicarbocyanin markiert. Für die Darstellung der Mikrosatelliten am ABI PRISM® 377 DNA Sequencer wurden die Farbstoffe 6-FAM (6-Carboxylfluorescein) und NED verwendet. Stellten sich die Mikrosatelliten mit vielen Vorpeaks (Stotterbanden) dar, wurde der Vorwärtsprimer am 5'-Ende mit einer PIGtail-Markierung (5'- gtt tct t -3') versehen (Brownstein *et al.* 1996).

3.2.3.2 Etablierung der PCR mit Taq-Polymerase

Zur Etablierung einer PCR (Mullis *et al.* 1992) mit Taq-Polymerase diente zunächst das folgende Testprotokoll:

In 15 µl Gesamtvolumen wurden zu 1-2 µl DNA

0,6 µM je Primer

0,2 mM je Base Didesoxynucleotidtriphosphate

und 0,5 U Taq-Polymerase mit 1x konzentriertem Buffer advanced (entspricht 2 mM Mg²⁺) eingesetzt.

Während der Etablierungsphase der PCR wurde ein Temperaturgradient der Annealingtemperatur angelegt, da die Affinitäten der Primer zur Hybridisierung mit der DNA stark temperaturabhängig sind und bei höherer Annealingtemperatur ein spezifischeres Hybridisieren stattfindet (Mülhardt 2006). Parallel dazu wurden Konzentrationsgradienten mit Magnesium, DMSO und/oder Formamid angewendet, um ein optimales PCR-Produkt zu erhalten.

Folgendes Cyclerprogramm wurde standardmäßig getestet und entsprechend modifiziert:

Denaturierung	• 94°C, 90 s
35 Zyklen (Denaturierung, Annealing und Elongation)	• 94°C, 30 s
	• Temperaturgradient 50°C bis 65°C, 40 s
	• 72°C für eine von der Größe des PCR-Produktes abhängige Zeitdauer (~ 60 s je 1000bp)
Abschließende Elongation	• 72°C, 300 s

3.2.3.3 Etablierung der Multiplex-PCR zur Amplifizierung von Mikrosatelliten

Für die Multiplex-PCR (Ziegle *et al.* 1992) zur Amplifizierung von Mikrosatelliten wurde in einem Gesamtvolumen von 12 µl 0,06 µM je Primer und 1x konzentrierter ABSolute™ QPCR Mix eingesetzt. Zunächst erfolgte im Cycler eine Enzymaktivierung bei 95°C für 15 min, anschließend 30 Zyklen zu je 30 s mit 95°C, Gradient von 50°C-65°C und 72°C mit abschließender Elongation bei 72°C für 20 min. Der Gradient der Annealingtemperatur wurde anhand der Ergebnisse entsprechend eingengt und nach Kontrolle der Fragmente am ALFexpress bzw. ABI PRISM® 377 DNA Sequencer die Temperatur, bei der sich die Allele aller im Ansatz befindlicher Mikrosatelliten am Besten darstellten, ausgewählt.

3.2.4 Amplifikation bestimmter Abschnitte der Kandidatengene

Die zur PCR-Amplifizierung der Kandidatengenabschnitte eingesetzten Primer sind in Tabelle 7 mit Sequenzen, Produktgrößen, Größe und Position des amplifiziertem Genbereiches und Einsatzzweck aufgeführt. In Tabelle 8 sind die PCR-Bedingungen für die Amplifikation der Kandidatengenabschnitte mit Taq-Polymerase aufgelistet.

3.2.4.1 *CCKBR*

Die transmembranären Domänen III bis V sowie ein Teil des dritten intrazellulären Loop des Cholecystokininrezeptors B werden durch die Exone III und IV des *CCKBR*-Gens codiert (Noble und Roques 1999). Zur Identifizierung von Polymorphismen wurde zunächst ein Fragment von Exon III bis Exon IV reichend mit den Primern CCKBR_BT_Ex3_F und CCKBR_BT_Ex4_R amplifiziert. Diese Primer fanden auch in der Kolonie-PCR Verwendung.

Für die Typisierung des im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Nukleotidaustausches an Position 131 in Intron 3 wurde ein kleineres Fragment mit 198bp gewählt. Zur Amplifizierung desselben wurde das Primerpaar CCKBR_BT_In3_F und CCKBR_BT_In3_R eingesetzt (siehe Tabelle 7).

Ein Teil der 3'UTR des *CCKBR* (Yamada *et al.* 2001) mit 840bp wurde mit den Primern BT_CCKBR_Ex5f und BT_CCKBR_Ex5r analysiert.

3.2.4.2 *DRD4*

Im humanen *DRD4* sind verschiedene Polymorphismen mit unterschiedlicher Bedeutung beschrieben, die über das gesamte Gen verteilt vorkommen (Jönsson *et al.* 2003).

Zunächst wurde eine PCR für die Primer rDRD4_f1 und rDRD4_r1 etabliert (E.-M. Prinzenberg, persönliche Mitteilung). Durch Sequenzierung dieses PCR-Produktes wurde ein Nukleotidaustausch in Intron 1, 32 Basenpaare vor Exon II, identifiziert, der mit dem Primerpaar DRD4_bovin_f3 und DRD4_bovin_r2 näher eingegrenzt wurde. In einem Gesamtvolumen von 25 µl wurden je Primer 0,4 pmol mit 1fach konzentriertem Absolute™ QPCR Mix und 2 µl DNA eingesetzt. Zur Aktivierung der DNA-Polymerase wurde zunächst 15 min bei 95°C denaturiert, dann folgten 35 Zyklen mit je 30 s Denaturierung bei 95°C, Annealing bei 56°C und Elongation bei 72°C und eine abschließende Elongation bei ebenfalls 72°C für 5 min.

3.2.4.3 *MAOA*

Zur Identifizierung von Polymorphismen wurde ein PCR-Produkt von 563bp mit den Primern BT_MAOA_Ex14(f) und BT_MAOA_Ex15(r) amplifiziert und sequenziert (G. Lühken, persönliche Mitteilung). Darauf erfolgte die Etablierung einer PCR eines kleineren Fragmentes mit 429 Basenpaaren aus Intron 14 und Exon XV des bovinen *MAOA*-Gens, welches einen Nukleotidaustausch in Exon XV an Position 26 beinhaltetete, mit dem

Vorwärtsprimer BT_MAOA_In14_f und dem Rückwärtsprimer BT_MAOA_Ex15_r2 unter den in Tabelle 8 genannten Bedingungen.

3.2.4.4 *SERT*

Im *SERT*-Gen ist bei verschiedenen Spezies (Mensch, Orang-Utan, Gorilla, Schimpanse) ein VNTR im Promotorbereich identifiziert worden (Heils *et al.* 1995; Lesch *et al.* 1997). Durch Sequenzvergleiche konnten Übereinstimmungen zwischen der Basensequenz des humanen Promotor (Genbank-Nr. EF179203 und DQ885907) und des bovinen Intron 13 festgestellt werden und diese Sequenz wurde mit dem Primerpaar BT_SERT_F und BT_SERT_R näher analysiert. Der in diesem Fragment identifiziert SNP an Position 1113 in Intron 13 wurde mittels Tetra-Primer ARMS-PCR nachgewiesen.

Weiterhin wurde die bovine 5'UTR des *SERT* mit den Primern BT_SERT_UTR1 und BT_SERT_UTR2 untersucht.

Tabelle 7: Die zur Analyse der Kandidatengene verwendeten Primer mit Sequenzen, den Größen und Genbereichen der amplifizierten Produkte sowie der Einsatz der Primer.

Gen	Primersequenz forward (5' → 3')	Primersequenz reverse (5' → 3')	Größe	Genbereich	Einsatz
CCKBR	CCKBR_BT_Ex3_F ggg tgt ctg tga ggc tgt c	CCKBR_BT_Ex4_R gea gcc ctc cct gac ttc	688bp	Exon III Pos. 1 bis Exon IV Pos. 157	Sequenzierung und Kolonie-PCR
	CCKBR_BT_In3_F acc cag aat ctt gct cca ac	CCKBR_BT_In3_R agt cag tgc gga tcc ctg t	198bp	Intron 3 Pos. 62 - 260	PCR-RFLP
	BT_CCKBR_Ex5f tca ctg tcc agg ctg agc ta	BT_CCKBR_Ex5r geg tat tcc acc cct aac ct	840bp	Exon V Pos. 498 bis 3'UTR Pos. 790	Sequenzierung
	CCKBR_3'UTR_Out_F gta tag cag ggg cat tga atc ttt cag g	CCKBR_3'UTR_Out_R aaa aag gaa att gag ggg gaa acc aag t	266bp	3'UTR Pos. 312 - 578	Tetra-Primer ARMS-PCR (Kontrolle)
	CCKBR_3'UTR_Out_F gta tag cag ggg cat tga atc ttt cag g	CCKBR_3'UTR_In_R tct tag tgc aaa aca gct cgt tgg tac g	174bp	3'UTR Pos. 312 - 486	Tetra-Primer ARMS-PCR (Allel C)
	CCKBR_3'UTR_In_F cac caa cct gcc taa tct cac act cac t	CCKBR_3'UTR_Out_R aaa aag gaa att gag ggg gaa acc aag t	148bp	3'UTR Pos. 430 - 578	Tetra-Primer ARMS-PCR (Allel T)
DRD4	rDRD4_f1 tga tgg gca cag gtt gaa ta	rDRD4_r1 ggc gtt tcc cag ttc taa ca	311bp	Intron 1 201 bp vor Exon II bis Exon II Pos. 104	Sequenzierung
	DRD4_bovin_f3 gag cgc cag caa cag tag t	DRD4_bovin_r2 cgg ctc ctc tgt tat tca gc	113bp	Intron 1 124 bp bis 11 bp vor Exon II	PCR-RFLP
MAOA	BT_MAOA_Ex14(f) ttt tga atg ctt tgg gga ag	BT_MAOA_Ex15(r) aga tgg agc ttg atc ttc gtc	563bp	Exon XIV Pos. 1 bis Exon XV Pos. 315	Sequenzierung
	BT_MAOA_In14_f cct gaa gct gaa gta agt ttg g	BT_MAOA_Ex15_r2 ctg att gca cgg ctg ttc ta	429bp	Exon XIV Pos. 50 bis Exon XV Pos. 231	PCR-RFLP
SERT	BT_SERT_F tgc tca tga agg acc tga ca	BT_SERT_R tga tcc aga cca acc ctc tc	796bp	Intron 13 Pos. 705 - 1501	Sequenzierung
	BT_SERT_Out_F aac atc cca agt gtg ctc tga ggt ag	BT_SERT_Out_R aag gag ggc ttc tgt ggt aga gag ag	375bp	Intron 13 Pos. 945 - 1320	Tetra-Primer ARMS-PCR (Kontrolle)
	BT_SERT_Out_F aac atc cca agt gtg ctc tga ggt ag	BT_SERT_In_R gcg aaa gag ttg ttt tga aag aat gc	232bp	Intron 13 Pos. 1088 - 1320	Tetra-Primer ARMS-PCR (Allel G)
	BT_SERT_In_F tcc tca gag gac gat aca gct tia	BT_SERT_Out_R aag gag ggc ttc tgt ggt aga gag ag	196bp	Intron 13 Pos. 945 - 1141	Tetra-Primer ARMS-PCR (Allel A)
	BT_SERT_Utr1 egg gat gaa gtt ctg gag ag	BT_SERT_Utr2 ctg ctc aaa gtg acg caa aa	250bp	5'UTR	Sequenzierung

Tabelle 8: PCR-Bedingungen mit *Taq*-Polymerase der Kandidatengene *CCKBR*, *DRD4*, *MAOA* und *SERT* mit je 0,2 mM je Base Didesoxynucleotidtriphosphaten und Angabe der vom Testprotokoll (siehe 3.2.3.2) abweichenden Zyklendauern, Annealingtemperatur und Elongationszeit.

	Primerpaar	Gesamt- volumen Ansatz	Dauer der Zyklusab- schnitte (s)	Annealing- temperatur	Elongations- zeit	Primer- konzentration	<i>Taq</i> - Polymerase	DNA (µl)	Weitere Modifikation
<i>CCKBR</i>	CCKBR_BT_Ex3_F	50 µl	15 - 20 - 60	64°C	60 s	0,4 µM	1,5 U	3	
	CCKBR_BT_Ex4_R								
	CCKBR_BT_In3_F	25 µl	15 - 20 - 30	60°C	30 s	0,8 µM	1 U	2	
	CCKBR_BT_In3_R								
	BT_CCKBR_Ex5f	50 µl	30 - 30 - 50	64°C	50 s	0,4 µM	1,5 U	3	
	BT_CCKBR_Ex5r								
<i>DRD4</i>	rDRD4_f1	50 µl	30 - 30 - 30	55°C	30 s	0,4µM	1,5 U	3	2,5 mM Mg ²⁺
	rDRD4_r1								
<i>MAOA</i>	BT_MAOA_Ex14(f)	50 µl	15 - 30 - 45	58°C	45 s	0,4 µM		3	
	BT_MAOA_Ex15(r)								
	BT_MAOA_In14_f	25 µl	15 - 20 - 30	58°C	30 s	0,8 µM	1 U	1	
	BT_MAOA_Ex15_r2								
<i>SERT</i>	BT_SERT_F	50 µl	20 - 30 - 60	64°C	60 s	0,4 µM	1,5 U	3	2,5 mM Mg ²⁺
	BT_SERT_R								
	BT_SERT_UTR1	50 µl	20 - 20 - 20	59°C	20 s	0,4 µM	1,5 U	3	4%DMSO
	BT_SERT_UTR2								

3.2.5 Amplifikation der Mikrosatelliten auf BTA1 und BTA29

Für den Nachweis und die Feinkartierung eines QTL für Temperament (Schmutz *et al.* 2001) im eigenen Tiermaterial wurden je zwei Mikrosatelliten proximal und distal von *BMS574* auf BTA1 ausgewählt. Die genauen Lokalisationen der Mikrosatelliten mit den in dieser Arbeit verwendeten laufenden Nummern sind in Tabelle 9 dargestellt. Zur Darstellung aller fünf Mikrosatelliten wurden drei Einzel-PCR mit *Taq*-Polymerase (siehe Tabelle 10) sowie eine Duplex-PCR (siehe Tabelle 11) durchgeführt.

Für die Durchführung einer QTL-Studie auf BTA29 und die Kartierung des *DRD4*-Gens auf BTA29 wurden zunächst zehn (29-1 – 29-10) und zur anschließenden Feinkartierung des *DRD4*-Gens vier (29-11 – 29-14) zusätzliche Mikrosatelliten distal auf BTA29 ausgewählt. Die exakten Lokalisationsangaben dieser Mikrosatelliten mit Allelgrößen und Allelanzahlen laut Literatur (<http://www.marc.usda.gov/genome/htmls>) sind in Tabelle 9 wiedergegeben. Diese wurden mit einer Einzel-PCR und fünf Multiplex-PCR amplifiziert (siehe Tabelle 10 und Tabelle 11).

Tabelle 9: Alle analysierten Mikrosatelliten mit Angabe ihrer Lokalisation auf dem jeweiligen Chromosom sowie den Literaturangaben zu Allelgrößen und Anzahl der Allele nach MARC USDA (<http://www.marc.usda.gov/genome/htmls>).

Lfd. Nr.	Mikrosatellit	Chromosom	Lokalisation	Allelgrößen	Allelanzahl
1-1	<i>BMS1928</i>	BTA1	8,47 cM	138 – 178 bp	19
1-2	<i>DIK634</i>	BTA1	10,01 cM	224 – 236 bp	5
1-3	<i>BMS574</i>	BTA1	15,42 cM	129 – 151 bp	12
1-4	<i>BMS4020</i>	BTA1	18,37 cM	114 – 116 bp	2
1-5	<i>DIK4957</i>	BTA1	20,70 cM	180 – 190 bp	3
29-1	<i>BMS1857</i>	BTA29	1,81 cM	149 – 175 bp	15
29-2	<i>BMS764</i>	BTA29	11,29 cM	92 – 108 bp	8
29-3	<i>BMS1787</i>	BTA29	19,58 cM	140 – 172 bp	15
29-4	<i>ILSTS089</i>	BTA29	24,15 cM	127 – 151 bp	7
29-5	<i>MNB-127</i>	BTA29	32,84 cM	219 – 238 bp	9
29-6	<i>MNB-145</i>	BTA29	34,17 cM	164 – 178 bp	5
29-7	<i>MNB-109</i>	BTA29	37,15 cM	180 – 206 bp	9
29-8	<i>OarHH22</i>	BTA29	41,57 cM	103 – 126 bp	10
29-9	<i>BMC1206</i>	BTA29	62,53 cM	130 – 140 bp	5
29-10	<i>ILSTS081</i>	BTA29	69,00 cM	88 – 122 bp	15
29-11	<i>BMS1948</i>	BTA29	65,64 cM	97 – 125 bp	12
29-12	<i>DIK4499</i>	BTA29	67,54 cM	199 – 211 bp	6
29-13	<i>DIK5057</i>	BTA29	69,70 cM	220 – 230 bp	5
29-14	<i>MNB-101</i>	BTA29	69,70 cM	148 – 164 bp	7

Tabelle 10: Bedingungen für die PCR-Reaktionen mit *Taq*-Polymerase der Mikrosatelliten *BMS574*, *BMS1928*, *DIK634* und *BMS1787* nach dem angepassten Testprotokoll (siehe 3.2.3.2) mit 30 Zyklen zu je 30 Sekunden und den geänderten Bedingungen.

	<i>BMS1928</i>	<i>DIK 634</i>	<i>BMS574</i>	<i>BMS1787</i>
Chromosom	BTA1	BTA1	BTA1	BTA29
Gesamtvolumen	15	15	12	15
Primerkonz. (µM)	0,04 je Primer	0,04 je Primer	0,06 for., 0,03 rev.	0,04 je Primer
dNTP (mM je Base)	0,2 mM	0,2 mM	0,25 mM	0,2 mM
Mg ²⁺	2 mM	2 mM	2 mM	3 mM
<i>Taq</i> -Polymerase	0,5 U	0,5 U	0,5 U	0,3 U
Erste Denaturierung	3 min	1,5 min	1,5 min	2 min
Annealingtemperatur	51°C	58°C	61,5°C	58°C
Elongation	5 min	5 min	3 min	5 min

Tabelle 11: Zusammenstellung der Mikrosatelliten der Multiplex (MP) PCR-Reaktionen für BTA1 und BTA29 mit Angabe der Abweichungen des Standardprotokolls (siehe 3.2.3.3) bei Primerkonzentrationen, Annealingtemperaturen und Dauer der einzelnen Abschnitte der Zyklen sowie der abschließenden Elongation.

	Mikro-satelliten	Chromosom	Primer-konzentration (µM)	Annealing temperatur	Dauer der Zyklenabschnitte (s)	Elongation
BTA1 Duplex	<i>BMS4020</i> <i>DIK4957</i>	BTA1	<i>BMS4020</i> : 0,04 je Primer <i>DIK4957</i> : 0,05 je Primer	64°C	30-30-30	20 min 72°C
BTA29 MP1	<i>ILSTS089</i> <i>MNB-109</i>	BTA29	0,06 je Primer	62°C	30-30-30	20 min 72°C
BTA29 MP2	<i>MNB-145</i> <i>MNB-127</i>	BTA29	0,06 je Primer	53°C	30-30-30	20 min 72°C
BTA29 Duplex	<i>OarHH22</i> <i>BMS1857</i>	BTA29	0,1 je Primer	56°C	30-90-60	60 min 60°C
Triplex-PCR	<i>ILSTS081</i> <i>BMC1206</i> <i>BMS764</i>	BTA29	<i>ILSTS081</i> : 0,1 je Primer <i>BMC1206</i> : 0,1 je Primer <i>BMS764</i> : 0,05 for. 0,025 rev.	61°C	30-90-60	30 min 60°C
BTA29 4-Plex	<i>BMS1948</i> <i>DIK4499</i> <i>MNB101</i> <i>DIK5057</i>	BTA29	0,025 je Primer	62°C	30-30-30	20 min 72°C

Die Primer, die zur Analyse dieser Mikrosatelliten auf BTA1 und BTA29 Verwendung gefunden haben, sind in Tabelle 12 mit den jeweiligen Sequenzen und Bezeichnung des Farbstofflabels angegeben.

Tabelle 12: Primer mit Sequenzen und Farbstoff zur Analyse der Mikrosatelliten auf BTA1 und BTA29.

Lfd. Nr.	Primernamen	Primersequenz (5'→ 3')	Farbstoff	Literatur
1-1	BTA1_BMS1928_PIGtail_F BTA1_BMS1928_Cy5_R	ggt tct t ttt gcc aat ctc caa aat tac g cag aca tga ctt ggc acc tg	Cy5	http://www.marc.usda.gov/genome/htmls/MarkerSearch.jsp?Species=bos
1-2	BTA1_DIK634_F BTA1_DIK634_Cy5_R	agg gta cat tcc aag gca ca ttt gga aag gga gag cat tg	Cy5	
1-3	BTA1_BMS574#1 BTA1_BMS574#2	atg ttc ttt gac cac atg gat t gaa caa gca ttc tga cca tag c	Cy5	
1-4	BTA1_BMS4020_F BTA1_BMS4020_Cy5_R	gag cag tct gat ggg cta ca tgc ctt ctt ttc tgt ctg ca	Cy5	
1-5	BTA1_DIK4957_F BTA1_DIK4957_Cy5_R	aat tgc caa ggt gtg aaa gc gga tac gac tga gcg aat ga	Cy5	
29-1	BTA29_BMS1857#1 BTA29_BMS1857#2	taa ttg atc aca aag agg agc c gat ccc aga gaa tca ctc acc	6-FAM	
29-2	BTA29_BMS764#1 BTA29_BMS764#2	ttt tcc cag att ggc ttg tc agc cgg aca caa ctg agt g	6-FAM	
29-3	BTA29_BMS1787#1 BTA29_BMS1787#2	acc aca ggg gtc tct ttg c aag gag agc agg tac aga ggc	Cy5	
29-4	BTA29_ILSTS089#1 BTA29_ILSTS089#2	aat tcc gtg gac tga gga gc aag gaa ctt tca acc tga gg	Cy5	
29-5	BTA29_MNB127_F BTA29_MNB127_R	gag aat gtg gct gga ggt tta c ggg gat gta aat gga ctg g	Cy5	
29-6	BTA29_MNB145#1 BTA29_MNB145#2	cta gct gac gtg cag aat cac gaa gtc ctc ctc aga gtc cag	Cy5	
29-7	BTA29_MNB109_F BTA29_MNB109_R	gta acg tga ttt agg gaa ctg g tgg aat tta agc tct gac agt tg	Cy5	
29-8	BTA29_OarHH22#1 BTA29_OarHH22#2	caa cag gac ctt gaa aac cac acc ctc agt tta att cca tag acc aac agg	6-FAM	
29-9	BTA29_BMC1206#1 BTA29_BMC1206#2	ggg tgg cta tga ctc cag tg ggt cca gcc ttc cac cac	6-FAM	
29-10	BTA29_ILSTS081#1 BTA29_ILSTS081#2	agt cag aca acg act gtg cg ttt cga aca ggc ttt tgg gg	NED	
29-11	BTA29_BMS1948_F BTA29_BMS1948_VIC_R	aac aca ggg aag tgt gtt ttt aa gac agt ttg tgg tgt gga gac	VIC	
29-12	BTA29_DIK4499_F BTA29_DIK4499_VIC_R	agg acc agc cgg gtt agt at ctg aag aac ccc atg gac a	VIC	
29-13	BTA29_DIK5057_F BTA29_DIK5057_6FAM_R	agg tcc aca cag gac tct gc cat ggg gtc aca aga aca ga	6-FAM	
29-14	BTA29_MNB101_F BTA29_MNB101_NED_R	ttt aag aag tat cct gcg ttt gg aag aat gaa tgg tgc cag aaa g	NED	

3.2.6 Aufreinigung der PCR-Produkte

Die zur Sequenzierung und zum Klonieren verwendeten PCR-Produkte wurden mit dem Promega Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System nach modifizierten Herstellerangaben aufgereinigt.

Die Modifikationen betrafen die Zentrifugationszeiten, die statt 1 Minute 2 Minuten bei der ersten und letzten Zentrifugation sowie beim Entfernen der Ethanolrückstände betrug und je 5 Minuten bei beiden Waschschritten.

3.2.7 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten zur quantitativen und qualitativen Analyse erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese (Sambrook *et al.* 1989).

Die Gele hatten je nach Größe der zu trennenden Fragmente unterschiedliche Agarosekonzentrationen, die zwischen 1% und 3,5% Agarose variierten. Zur eigentlichen Auftrennung standen verschiedene Horizontalelektrophoresekammern zur Verfügung, in denen sich 1xTBE als Laufpuffer befand. Als Längenstandards wurden die kommerziell erhältlichen Größenmarker GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus und pUC19 DNA/*MspI* (*HpaII*) Marker, 23 eingesetzt. Je 5 µl der Probe wurden mit 2 µl Ladepuffer (0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol FF, 30% Glycerol, 69,5% Wasser) versetzt zur optischen Kontrolle des Fortschreitens der Elektrophorese. Zur Visualisierung der aufgetrennten DNA-Fragmente wurden diese in Ethidiumbromid gefärbt (Kemp *et al.* 1989; Nicholl 1995). Die Dokumentation wurde mithilfe des Transilluminators und Repro Sets durch Fotografieren unter UV-Belichtung durchgeführt.

3.2.8 Klonierung

Die Klonierung wurde mithilfe des pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega, Mannheim) durchgeführt.

3.2.8.1 Ligation

Zunächst wurde das aufgereinigte PCR-Produkt (siehe 3.2.6) mit dem pGEM®-T Easy Vector ligiert, um ein rekombinantes Plasmid zu erhalten. Der Vector besitzt polyT-Überhänge. Diese dienen zur Verbindung des Vectors mit den bei Verwendung der *Taq*-Polymerase an den PCR-Produkten entstehenden polyA-Überhänge.

Die Menge des einzusetzenden PCR-Produktes wird nach Herstellerangaben mit folgender Formel bestimmt:

$$\frac{\text{ng des Vektors} \times \text{kb des PCR-Produktes}}{\text{kb des Vektors}} \times 3 = \text{ng PCR-Produkt}$$

Das PCR-Produkt wird mit 1 µl der vom Hersteller mitgelieferten T4-Ligase und 1 µl des pGEM®-T Easy Vector sowie 5 µl 2xRapid Ligation Buffer versetzt und ad 10 µl mit Wasser für die Molekularbiologie aufgefüllt. Dieser Ansatz wird nach Durchmischen für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

3.2.8.2 Transformation

Anschließend erfolgte die Transformation des rekombinanten Plasmids in chemokompetente JM 109 Zellen, wobei 2 µl Ligationsansatz mit 50 µl JM 109 Zellen vorsichtig gemischt wurden. Die thermochemische Aktivierung der Zellen erfolgte durch 20minütiges Temperieren auf Eis, dann für 45-50 Sekunden in ein 42°C-Wasserbad und abschließend wieder 2 Minuten auf Eis. Dann wurden 950 µl SOC-Medium (2% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 10 mM KCl, 20 mM Magnesium (MgCl₂•6H₂O und MgSO₄•7H₂O), 20 mM alpha-D-Glucose) zugegeben und der Ansatz bei 37°C und 150 rpm auf der Schüttelplatte für 1,5 Stunden inkubiert.

3.2.8.3 Anzüchtung von Einzelkolonien

Zur Herstellung der Agarplatten wurde Luria-Bertani-Medium (LB-Medium, low salt, pH = 7) mit 11 g/l Agar-Agar versetzt und autoklaviert (124°C, 1,2 bar für 30 min). Nach Abkühlen auf 50°C wurden Ampicillin (0,1%; 100 mg Ampicillin-Natriumsalz in 1 ml autoklaviertem Wasser für die Molekularbiologie gelöst), Isopropyl-Thio-β-D-Galactopyranosid (IPTG; 0,5%; 23,8 mg IPTG in 1 ml autoklaviertem Wasser für die Molekularbiologie gelöst) und 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-Galactopyranosid (X-Gal, Substrat für β-Galactosidase; 0,2%; 40 mg in 1 ml Dimethylformamid gelöst) zugegeben und das Selektionsmedium unter sterilen Arbeitsbedingungen in Petrischalen gegossen. Sobald der Agar verfestigt war, wurden je Probe drei Platten mit dem inkubierten Transformationsansatz ausgestrichen. Nach Oberflächentrocknung erfolgte die Inkubation der Platten bei 37°C im Brutschrank über Nacht.

3.2.8.4 Auswahl geeigneter Kolonien

Die Auswahl geeigneter Kolonien erfolgte unter zu Hilfenahme der Blau-Weiß-Selektion an der Sterilwerkbank.

Die ausgewählten weißen Kolonien wurden mit einer Pipettenspitze berührt, diese in ein 1,5 ml Reagiergefäß mit 50 µl Wasser für die Molekularbiologie getaucht und anschließend in ein 13 ml Röhrchen mit 3 ml LB-Medium (mit 0,1% Ampicillin; 100 mg Ampicillin-Natriumsalz

in 1 ml autoklaviertem Wasser für die Molekularbiologie gelöst) überführt. Die so hergestellten Flüssigkulturen wurden bei 37°C für eine Stunde auf der Schüttelplatte inkubiert und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

Die Cups mit Wasser und der Kolonie wurden für 5 – 10 Minuten auf 95°C zur Abtötung der Bakterien erhitzt und dann 20 µl als Template für die Kolonie-PCR eingesetzt.

3.2.8.5 Kolonie-PCR

Das Vorliegen des Inserts wurde mittels Kolonie-PCR überprüft (Ohno *et al.* 1991).

Diese PCR wurde mit denselben Primern, mit denen das Insert amplifiziert wurde, durchgeführt. In einem Gesamtvolumen von 50 µl befanden sich 20 µl Template (siehe 3.2.8.4), 0,4 µM je Primer (CCKBR_BT_Ex3_F und CCKBR_BT_Ex4_R), 0,2 mM je Base Didesoxynucleotidtriphosphate sowie 1,5 U *Taq*-Polymerase mit 1x konzentriertem Buffer advanced und ad 50 µl Wasser für die Molekularbiologie. Die PCR wurde mit dem Standardcyclerprogramm (siehe 3.2.3.2) durchgeführt, wobei eine Annealingtemperatur von 64°C über 20 Sekunden eingehalten wurde und die Elongationszeit betrug 60 Sekunden.

3.2.8.6 Isolation von Plasmid-DNA

Bei erfolgreicher Kolonie-PCR mit Nachweis des Inserts wurde aus den entsprechenden Flüssigkulturen nach Inkubation bei 37°C über Nacht eine Säulenpräparation zur Gewinnung und Aufreinigung rekombinanter Plasmid-DNA durchgeführt. Hierzu wurde das GFX Micro Plasmid Prep Kit verwendet und nach Herstellerangaben verfahren.

Die hierdurch gewonnen Plasmide wurden mit den Vektorprimern „M13f“ und „M13r“ sequenziert, um die Sequenz der Klone überprüfen zu können.

3.2.8.7 Glycerolstocks zur Aufbewahrung

Die zur Lagerung vorgesehenen rekombinanten Bakterienklone (siehe 3.2.8.5) wurden über Nacht auf der Schüttelplatte bei 250 rpm und 37°C als Flüssigkultur inkubiert. Zur Herstellung von 1,5 ml Glycerolstocks wurden Flüssigkultur und Glycerol im Verhältnis 3:1 auf Eiswasser gut durchmischt und dann bei -70°C gelagert.

3.2.9 Sequenzierung mit dem halbautomatischen Sequenziersystem ABI PRISM® 377 DNA Sequencer

3.2.9.1 Durchführung der Sequenzierreaktion

Um die Sequenzen der PCR-Produkte zu ermitteln und nach Polymorphismen zu screenen sowie die Sequenzen der klonierten PCR-Produkte zu ermitteln, wurden Sequenzierreaktionen mit dem ABI PRISM® BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit durchgeführt.

Die Primer für die Reaktionen waren bei allen in dieser Arbeit durchgeführten Reaktionen die ursprünglichen Amplifikationsprimer. Zur Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde der Vektorprimer M13 verwendet.

Die einzusetzende Menge des aufgereinigten PCR-Produktes wurde mittels eines Mengenschätzgels (1%iges Agarosegel) mit Hilfe des Größenstandards GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus Markers durch visuellen Vergleich mit dessen 500bp-Bande bekannter Konzentration ermittelt.

Der Reaktionsansatz betrug 20 µl und setzte sich folgendermaßen zusammen:

4 µl	Premix Sequencing RR-100
2 µl	5xSequencing Buffer
0,5 µl	Primer 10 pmol/µl
X µl	Aufgereinigtes PCR-Produkt
13,5 µl – X µl	HPLC-Wasser

Das PCR-Programm beinhaltete eine einminütige Denaturierung bei 96°C, dann 25 Zyklen mit 10 Sekunden 96°C, eine von der Primerlänge abhängige Annealingtemperatur für fünf Sekunden und vier Minuten bei 60°C. Die Annealingtemperatur beträgt für Primer mit weniger als 20 Basenpaaren 50°C, mit mehr als 23 Basenpaaren 60°C und bei 20-23 Basenpaaren 55°C.

Nach Durchführung der Reaktion erfolgte eine Fällung mit 2 µl 3M Natriumacetat und 50 µl absolutem unvergälltem Ethanol. Die pelletierten DNA-Fragmente wurden zweimal in 70% Ethanol bei 11900 rpm für fünf Minuten zentrifugiert. Nach den Waschschritten erfolgte die Trocknung bei 50°C und die anschließende Lagerung bei -20°C.

3.2.9.2 Sequenzierreaktion der Plasmid-DNA

Für die Sequenzierreaktion der Plasmid-DNA (siehe 3.2.8.6) wurde je 5 µl der Plasmidpräparation mit 5 pM Primer, 8 µl Premix Sequencing RR-100 und 6 µl Bidest angesetzt. Das Cyclerprogramm und die anschließende Fällung sind wie oben (siehe 3.2.9.1)

beschrieben. Die eingesetzten Primer M13f und M13r binden innerhalb der Vektorsequenz und haben folgende Sequenzen:

M13f: 5'- gta aaa cga cgg cca g -3'

M13r: 5'- cag gaa aca gct atg ac -3'

3.2.9.3 Sequenzanalyse mit dem ABI PRISM® 377 DNA Sequencer

Die Sequenzanalyse wurde mit einem 5%-Polyacrylamidgel mit 7 M Urea wie bei Lühken (2007) beschrieben durchgeführt.

Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mithilfe des Programmes ChromasPro Version 1.32.

3.2.10 Nachweismethoden der Polymorphismen

Die durch Sequenzierung von fünf Müttern je Rasse als Test-DNAs identifizierten Polymorphismen wurden zunächst bei den 14 Vätern der Kälber auf ihr Vorkommen und die Häufigkeit überprüft. Bei erfolgreicher Kontrolle der Segregation des Polymorphismus in Familienmaterial wurden die Kälber mit PCR-RFLP oder Tetra-Primer ARMS-PCR typisiert.

3.2.10.1 PCR-RFLP

Zum Nachweis von Nukleotidaustauschen im Tiermaterial wurden PCR-Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (PCR-RFLP)-Analysen entwickelt (Saiki *et al.* 1985).

Der amplifizierte und sequenzierte Genabschnitt, der den Austausch beinhaltet, wurde mithilfe des Computerprogrammes NEBCutter auf das Vorhandensein von Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme, die durch diesen verändert werden, analysiert (Vincze *et al.* 2003). Nach Möglichkeit wurde das für die PCR-RFLP-Analyse auszuwählende Fragment so festgelegt, dass neben der Schnittstelle des SNP auch noch eine weitere bei allen Varianten vorkommende unvariable Schnittstelle für das Enzym, die dann als Kontrollschnitt genutzt werden kann, vorkam (Newton und Graham 1994).

Für die Durchführung der PCR-RFLP-Analysen wurde jeweils ein Ansatz aus PCR-Produkt, Enzym und entsprechendem Puffer über Nacht bei der enzymespezifischen Temperatur im Wasserbad inkubiert. Die eingesetzten Primer zur Amplifizierung des PCR-Produktes sowie die verwendeten Ansätze zur restriktionsenzymatischen Spaltung sind in Tabelle 13 aufgeführt.

Tabelle 13: Ansätze zur restriktionsenzymatischen Spaltung der PCR-Produkte mit Nukleotidaustauschen der Kandidatengene *CCKBR*, *DRD4* und *MAOA* sowie die Inkubationstemperaturen.

Gen	Primer	Eingesetzte Menge PCR-Produkt	Menge des eingesetzten Enzyms (MBI Fermentas)	Menge des eingesetzten Puffer (MBI Fermentas)	Gesamt-volumen	Inkubations temperatur
<i>CCKBR</i>	CCKBR_BT_In3_F CCKBR_BT_In3_R	6µl	5 U <i>BseNI</i>	1µl Puffer B+	10µl	65°C
<i>DRD4</i>	DRD4_bovin_f3 DRD4_bovin_r2	10µl	5 U <i>Afw26I</i>	1,5µl Puffer Tango	15µl	37°C
<i>MAOA</i>	BT_MAOA_In14_f BT_MAOA_Ex15_r2	6µl	3 U <i>MnII</i>	1µl Puffer G3	10µl	37°C

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte mittels unterschiedlich konzentrierter Agarosegele bei spezifischen Laufbedingungen (siehe Tabelle 14).

Tabelle 14: Zur elektrophoretischen Auftrennung der Fragmente der PCR-RFLP-Analysen verwendete Agarosegelkonzentrationen und Laufbedingungen.

Gen	Agarosegelkonzentration	Angelegte Spannung	Dauer der Elektrophorese
<i>CCKBR</i>	3,5% (Mix)	280 Volt	150 – 180 Minuten
<i>DRD4</i>	2,5% (Mix)	300 Volt	120 – 150 Minuten
<i>MAOA</i>	2% Standardagarose	350 Volt	90 – 120 Minuten

Mix: Standardagarose und NuSieveagarose im Verhältnis 5:1 gemischt

3.2.10.2 Tetra-Primer ARMS-PCR

Zur Typisierung des SNP im *SERT*-Gen (Position 1113 in Intron 13) und eines SNP im *CCKBR*-Gen (Position 457 der 3'UTR) wurde je eine „Tetra-Primer Amplification Refractory Mutation System-PCR“ (Tetra-Primer ARMS-PCR) nach den Vorgaben von Sharma *et al.* (2006) und Ye *et al.* (2001) entwickelt. Hierbei erfolgte eine PCR mit je zwei inneren und äußeren Primern (siehe Tabelle 7). Die beiden äußeren Primer amplifizieren ein unabhängig vom vorliegenden Allel immer vorhandenes Kontrollfragment. Je einer der äußeren amplifiziert mit einem der inneren Primer ein allelspezifisches Produkt, so dass bei einem heterozygoten Tier drei Produkte mit diesen vier Primern entstehen (siehe Abbildung 1).

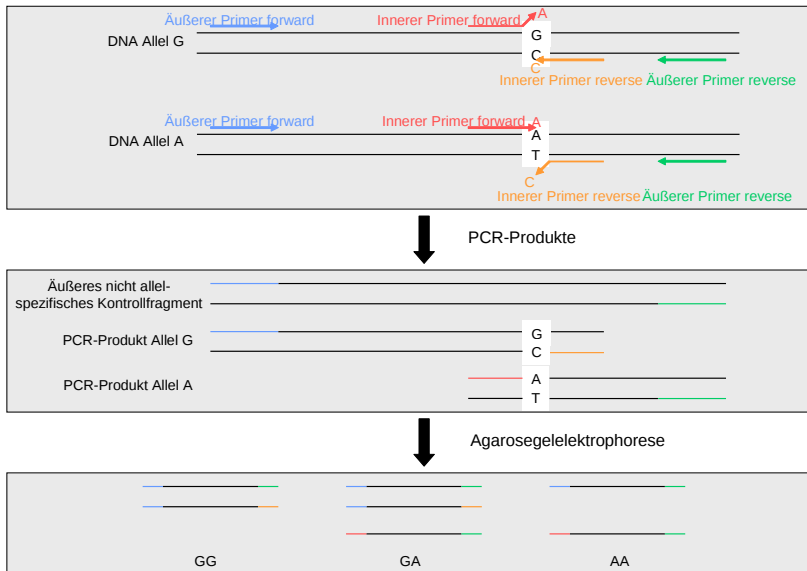


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Funktionsweise der Tetra-Primer ARMS-PCR modifiziert nach Ye *et al.* (2001) am Beispiel eines G/A-Nukleotidaustausches.

Die Amplifizierung der drei Fragmente aus Intron 13 des *SERT* erfolgte parallel in einem 15 μ l Ansatz, der 1 μ l DNA beinhaltet, mit je 0,16 μ M der äußeren Primer (BT_ SERT_OUT_F und BT_ SERT_OUT_R) und je 1 μ M der inneren Primer (BT_ SERT_IN_F und BT_ SERT_IN_R) sowie 0,5 U *Taq*-Polymerase mit 1fach konzentriertem Taq Buffer advanced und 0,2 mM je Base Didesoxynucleotidtriphosphate. Der Ansatz wurde zunächst für 1,5 min bei 94°C denaturiert, dann folgten 35 Zyklen mit 20 s 94°C, 30 s 53°C und 1 min 72°C und eine abschließende Elongation bei 72°C für 5 min.

Der Nachweis des SNP an Position 457 der 3'UTR im *CCKBR* wurde in einem 15 μ l Ansatz mit 1 μ l DNA mit 0,5 μ M des äußeren forward-Primers (CCKBR_3'UTR_Out_F), je 0,8 μ M des äußeren (CCKBR_3'UTR_Out_R) und inneren reverse-Primers (CCKBR_3'UTR_In_R) sowie 1,6 μ M des inneren forward-Primers (CCKBR_3'UTR_In_F) unter Verwendung einfach konzentrierten AbsoluteTM QPCR Mixes durchgeführt. Die Enzymaktivierung und Denaturierung erfolgte für 15 min bei 95°C, dann folgten 40 Zyklen mit 20 s 95°C, 30 s 67,5°C und 45 s 72°C sowie eine abschließende Elongation bei 72°C für fünf Minuten.

Die Reaktionsansätze wurden nach Durchlaufen des Cyclerprogrammes mit 3 μ l Loading Dye versetzt und die Hälfte dieses Gesamtansatzes in die Taschen eines 2%igen (*SERT*) bzw.

2,5%igen (CCKBR) Agarosegels pipettiert. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte bei 250-300 Volt in 120-150 Minuten in Abhängigkeit der optisch erkennbaren Verlaufsfront des Ladepuffers.

3.2.11 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Ermittlung der Fragmentlängen der Mikrosatelliten erfolgte lasergestützt im denaturierenden Polyacrylamidgel mittels vertikaler Gelelektrophorese am halbautomatischen Sequenziersystem ALF*express* und am ABI PRISM® 377 DNA Sequencer.

3.2.11.1 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese mit dem halb-automatischen Sequenziersystem ALF*express*

Die Vorgehensweise zur Herstellung eines denaturierenden Polyacrylamidgeles erfolgte in Anlehnung an die Beschreibung von Weimann (2000). Die Gelkonzentration betrug statt der dort beschriebenen 6 % nur 5,5 % und Urea ist 6 M statt 7 M konzentriert. Entsprechend wurden abweichend von der dortigen Beschreibung 21,7 g Urea, 6,6 ml Acrylamid (50 % Long Ranger Stocklösung) und 9 ml 10xTBE gelöst und mit bidestilliertem Wasser auf 60 ml aufgefüllt. Alle anderen Arbeitsschritte sind identisch ausgeführt worden.

Je 1 µl der PCR-Reaktion wurde mit 5 µl des internen Größenmarkers, der auf die erwarteten Fragmentlängen der Mikrosatelliten abgestimmt wurde, angesetzt. Von den externen Größenmarkern wurden je 6 µl eingesetzt. Die angesetzten Proben und Größenmarker wurden für 2,5 min bei 90°C denaturiert und dann in die Geltaschen pipettiert. Als Laufpuffer diente 0,5xTBE. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte bei 49°C, einer Spannung von 800 V und einer Stromstärke von 60 mA. Die Laufzeiten richteten sich nach der Größe der Fragmente und variierten zwischen 170 und 390 Minuten.

3.2.11.2 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese mit dem ABI PRISM® 377 DNA Sequencer

Die Fragmentlängenanalyse am ABI PRISM® 377 DNA Sequencer erfolgte wie von Peter (2005) dargestellt, allerdings wurde die Gelkonzentration von dem dort beschriebenen 4,5 % auf ein 6,85 %-Polyacrylamidgel mit 8,5 M Urea erhöht.

Die Elektrophorese erfolgte bei 48°C, 60 mA und 650 V und dauerte 180 Minuten.

3.2.11.3 Fragmentanalyse

Die Auswertung der Gele nach der Elektrophorese erfolgte bei Verwendung des ABI PRISM® 377 DNA Sequencers mit dem Programm Genotyper V3.7 (Applied Biosystems, Darmstadt)

und bei Verwendung des *ALFexpress* mit dem Programm *AlleleLocator* Version 1.03 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg). Bei diesen Computerprogrammen wird die Größe der Fragmente als Peaks sichtbar gemacht und eine Unterscheidung der Fragmentgrößen bis auf 1 bp genau ist möglich. Zur Standardisierung der Gele untereinander dienten die Größenmarker sowie die bei allen Elektrophoresen mitgeladene Standardprobe „Dagelb803“. Für die europaweite Standardisierung zu anderen Projekten wurde die Probe „Giessen2000“ aus dem EU-Projekt RESGEN CT98-118 als Standard analysiert.

3.2.12 Genetisch-statistische Methoden

3.2.12.1 Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht für die Nukleotidaustausche der Kandidatengene wurden mit folgender Formel geschätzt:

$$\chi^2 = \sum \frac{(\text{beobachtete Frequenz} - \text{erwartete Frequenz})^2}{\text{erwartete Frequenz}}$$

Als Nullhypothese wurde angenommen, dass sich die Population im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht befindet. Die Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% war bei einem Freiheitsgrad (Genorte mit 2 Allelen) bei einem χ^2 - Wert von 3,84 gegeben. War der errechnete χ^2 - Wert kleiner als 3,84, wurde die Nullhypothese angenommen.

Für die Mikrosatelliten erfolgte die Berechnung mit dem Programm POPGENE V 1.32 (Yeh *et al.* 1997).

3.2.12.2 Chi²-Test

Um Hinweise auf eine mögliche Assoziation zwischen den Genotyp- bzw. Allelfrequenzen der untersuchten Nukleotidaustausche und dem Temperament der Tiere feststellen zu können, wurden die Frequenzen innerhalb der Extremwerte (Darvasi und Soller 1994) der vergebenen Scores mittels Chi²-Test verglichen. Als Extremwerte dienten der Score 1 für die ruhigen Tiere und die zusammengefassten Scores 4 und 5 (bezeichnet als 5) für die nervösesten/aufgeregtesten Kälber. Diese Auswertung wurde innerhalb der Rassen durchgeführt.

Für das Kandidatengen *MAOA* erfolgte die Auswertung aufgrund der X-chromosomalen Lokalisation zudem auch innerhalb der Geschlechter.

3.2.12.3 Varianzanalyse

Zur Berechnung der Assoziation zwischen den Genotypen der einzelnen Kandidatengene und den Verhaltensscores „MIN2AT“, „SCEINWT“, „SCWGW“ und „SCAST“ unter

Berücksichtigung aller beeinflussenden Effekte wurden Varianzanalysen mit einem gemischten linearen Modell durchgeführt.

3.2.12.3.1 Varianzanalysen der Kandidatengene *CCKBR*, *DRD4* und *SERT*

Für die Nukleotidaustausche der drei Kandidatengene *CCKBR*, *DRD4* und *SERT* wurden die Untersuchungen mit Varianzanalyse auf ihre Assoziation mit den erfassten Verhaltensdaten jeweils innerhalb der Rassen mit folgendem Modell durchgeführt:

$$Y_{ijklm} = \mu + \text{Jahr}_i + \text{Geschlecht}_j + \text{Genotyp}_k + \text{Vater}_l + \text{Alter}_{ijklm} + e_{ijklm}$$

Y_{ijklm} = Beobachtungswert des Einzeltieres

μ = Mittelwert im jeweiligen Merkmal

Mit den fixen Effekten:

Jahr_i mit $i = 1-4$ (1998, 1999, 2000, 2001)

Geschlecht_j mit $j = 1-2$ (männlich, weiblich)

Genotyp_k *CCKBR*, Intron3:

mit $k = 1-3$ (CC, CT, TT) bei DA bzw. $k = 1-2$ (CC, CT) bei FV

CCKBR, 3'UTR:

mit $k = 1-3$ (CC, CT, TT)

DRD4:

mit $k = 1-3$ (GG, GT, TT)

SERT:

mit $k = 1-3$ (GG, GA, AA)

Mit den zufälligen Effekten:

Vater_l mit $l = 1-6$ bei DA bzw. $l = 1-8$ bei FV

e_{ijklm} = zufälliger Resteffekt

Mit der Kovariablen

Alter_{ijklm} MIN2AT: Alter zum Zeitpunkt des Anbindetests: 8-56 Tage

SCEINWT + SCWGWT: Alter zum Zeitpunkt des Wiegetests: 53-277 Tage

SCAST: Alter zum Zeitpunkt des Separier- und Rückhaltetests: 145-283 Tage

3.2.12.3.2 Varianzanalyse des Kandidatengens *MAOA*

Die Analyse der Assoziation des Nukleotidaustausches im *MAOA* erfolgte innerhalb der Rassen und aufgrund der X-chromosomalen Lage nach Geschlechtern getrennt:

$$Y_{ijkl} = \mu + \text{Jahr}_i + \text{Genotyp}_j + \text{Vater}_k + \text{Alter}_{ijkl} + e_{ijkl}$$

Y_{ijkl} = Beobachtungswert des Einzeltieres

μ = Mittelwert im jeweiligen Merkmal

Mit den fixen Effekten:

Jahr_i mit $i = 1-4$ (1998, 1999, 2000, 2001)

Genotyp_j mit $j = 1-3$ (CC, CT, TT) bei weiblichen Kälbern bzw. $j = 1-2$ (C,T) bei männlichen Kälbern

Mit den zufälligen Effekten:

Vater_k mit $k = 1-6$ bei DA bzw. $k = 1-8$ bei FV

e_{ijkl} = zufälliger Resteffekt

Mit der Kovariablen

Alter_{ijkl} MIN2AT: Alter zum Zeitpunkt des Anbindetests: 8-56 Tage

SCEINWT + SCWGWT: Alter zum Zeitpunkt des Wiegetests: 53-277 Tage

SCAST: Alter zum Zeitpunkt des Separier- und Rückhaltetests: 145-283 Tage

3.2.12.3 Varianzanalysen der Mikrosatelliten auf BTA1

Für die Assoziationsanalyse wurde von allen fünf Mikrosatelliten (*BMS1928*, *DIK634*, *BMS574*, *BMS4020*, *DIK4957*) das häufigste Allel jeder Rasse für diese als Populationsstandard postuliert. Alle anderen Allele mit >5 % prozentualer Häufigkeit wurden in der Varianzanalyse als Kovariable (Häufigkeit des jeweiligen Allels; 0,1,2) berücksichtigt um deren Einfluss zu berechnen (Hoh und Ott 2001).

Die nach Rassen getrennte Varianzanalyse wurde mittels eines linearen Modells mit den fixen Effekten Jahr und Geschlecht des Kalbes sowie dem Vater als zufälligen Effekt durchgeführt. Das Alter des Kalbes beim Test sowie die oben erwähnten Allele wurden als Kovariablen berücksichtigt.

Die Signifikanzgrenze von 5 % wurde mit der Bonferroni-Korrektur, entsprechend der Anzahl getesteter Allele je Mikrosatellit (n), auf $0,05/n$ korrigiert.

3.2.12.4 Kartierung des *DRD4*-Gens auf BTA29

Die Kartierung des Kandidatengens *DRD4* (siehe 2.4.2.2) mit den Mikrosatelliten auf BTA29 über Kopplungsanalyse im vollständigen Familienmaterial erfolgte mit dem Programm Cri-

Map Version 5 (Goldgar *et al.* 1989; Green 1992) und den Funktion *build* und im Rahmen der Feinkartierung im zweiten Arbeitsschritt zusätzlich mit der Funktion *all*.

Im Rahmen dieser Kartierung wurde der Polymorphic Information Content (PIC) der einzelnen Mikrosatelliten bestimmt und anhand dessen über eine weitere Verwendung in der Analyse entschieden. Dies erfolgte mit dem Programm CERVUS Version 3.0.3 (Kalinowski *et al.* 2007; Marshall *et al.* 1998) nach der bei Botstein *et al.* (1980) entwickelten Formel.

3.2.12.5 QTL-Analysen für Temperament auf BTA1 und BTA29

Zur Überprüfung des Vorhandenseins eines Quantitative Trait Locus (QTL) auf BTA1 bzw. BTA29 im Bereich der untersuchten Mikrosatelliten (1-1 – 1-5 und 29-1 – 29-10) wurde das Programm QTLexpress (<http://qtl.cap.ed.ac.uk/>) (Seaton *et al.* 2002) verwendet. Es wurden folgende Grundeinstellung in einem 1QTL-Modell angewandt: der QTL sollte mit 1 cM Steps und 1000 Iterationen im Permutate Chromosom-wide Modell berechnet werden. Das Jahr und das Geschlecht flossen als fixe Faktoren und das Alter des Tieres bei Testdurchführung als Kovariable ein. Das Konfidenzintervall (CI95%) der QTL-Lokalisation wurde ebenfalls mit 1000 Iterationen und durch bootstrapping berechnet (Visscher *et al.* 1996). Die Analyse erfolgte für BTA1 mit der bekannten Reihenfolge und Abständen der Mikrosatelliten (<http://www.marc.usda.gov/genome/cattle/cattle.html>). Für BTA29 wurden die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten rassspezifischen Karten mit den zehn Mikrosatelliten 29-1 bis 29-10 als Grundlage für die QTL-Studie genutzt. Zunächst erfolgte die QTL-Analyse jeweils innerhalb der Rassen Dt. Angus und Dt. Fleckvieh, anschließend innerhalb der einzelnen 14 Halbgeschwisterfamilien.

4 Ergebnisse

4.1 Molekulargenetische Ergebnisse

4.1.1 Sequenzen und DNA-Varianten der Kandidatengene

Eine Zusammenstellung der untersuchten Genbereiche und identifizierten DNA-Varianten der Kandidatengene ist in Tabelle 15 zu finden.

4.1.1.1 Cholecystokininrezeptor B - Gen

Durch Vergleich der Sequenz des 688bp-Fragmentes, welches mit dem Primerpaar CCKBR_BT_Ex3_F und CCKBR_BT_Ex4_R amplifiziert wurde, mit der *CCKBR*-mRNA-Sequenz des Rindes (Genbank-Nr. BC112800) konnte die Amplifizierung der korrekten Sequenz bestätigt werden. Das Fragment beinhaltet das gesamte Intron 3 (279 bp) und 252 bp des Exon III sowie 157 bp des Exon IV. Im Intron 3 (Position 131) konnte anhand der Sequenz zweier Tiere ein heterozygoter Nukleotid austausch (Cytosin/Thymin) vermutet werden, der aufgrund der geringen Sequenzqualität durch Klonierung bestätigt werden musste und konnte. Dieser Austausch befindet sich anhand des Programmes TFSEARCH innerhalb einer potentiellen Bindestelle für den Transkriptionsfaktor MZF1 (Myeloid Zinc Finger 1). Der berechnete Wahrscheinlichkeitsscore für die Bindung ist für Allel C 92,2 und für Allel A nur 77,4.

Das Exon V des *CCKBR* umfasst 1426 Basenpaare, davon sind 538 bp codierend und 888 bp zur 3'UTR gehörend. Mit dem Primerpaar BT_CCKBR_Ex5f und BT_CCKBR_Ex5r wurde ein 840 bp-Fragment aus Exon V amplifiziert, welches 50 bp der codierenden Region und die ersten 790 bp der nicht codierenden Region beinhaltet. Durch Sequenzieren dieses Fragmentes konnte ein Cytosin-Thymin-Austausch an Position 457 der 3'UTR identifiziert werden.

4.1.1.2 Dopaminrezeptor D4 - Gen

Das mit dem Primerpaar rDRD4_f1 und rDRD4_r1 amplifizierte 311bp-PCR-Produkt konnte mit einer der beiden in der Genbank vorhandenen *Bos taurus DRD4*-Sequenzen aligned werden (Genbank-Nr. AY263349). Eine DNA-Variation mit einem Guanin-Thymin-Austausch konnte im Intron 1, 32 Basenpaare vor Beginn des Exon II, identifiziert werden. Durch weitere Vergleiche mit der humanen Sequenz und der anderer Tierarten stellte sich heraus, dass die Sequenz AY263349 revers-komplementär zu allen anderen Sequenzen ist und dieses

im Sequenzvergleich durch ein entsprechendes Plus/Minus-Alignment und Lokalisationsbeschreibung berücksichtigt werden muss (siehe Abbildung 2).

Eigene 1	ATGG-GCACAGGTTGAATATGGAGGCCGTGCACAGCATGACGTCCATGGCCATGAGCGCGT		
BT 17	ATGG-GCACAGGTTGAATATGGAGGCCGTGCACAGCATGACGTCCATGGCCATGAGCGCGT		
HS 2703	ATGGCGCACAGGTTGAAGATGGAGGCCGTGCACAGCATGACGTCCATGGCCATGAGGGCGT		
EC 1924	ATGGCGCACAGGTTGAAGATGGAGGCCGTGCACAGCATGACGTCCATGGCCATGAGCGCGT		
Eigene 61	CGCAGAGGCCCGGGCTCAGCAGCCACACGCCGCCCTGCACCTG	Exon II	Intron 1
BT 77	CG-AGAGGCCCGGGCTCAGCAGCCACACGCCGCCCTGCACCTG		AG-CACGGAGAGGAGCC
HS 2642	CGCACAGGCCGGGGCTCAGCAGCCACGCGCCACCTGGACCTG		
EC 1863	CGCAGAGGCCCGGGCTCAGCAGCCACACGCCGCCCTGGACCTG		
Eigene 120	G-CAG-CAACAGTAGTCTCGGGAAGCTGACCTTCCTCGGCCCGGCCCGAGGTGTCTTC		
BT 136	GTCAGTCAACAGTAGTCTCGGGAAGCTGACCTTCCTCGNCCCG-CCCCGAGATGTCTTC		
Eigene 178	CTGACCCCCCGCGTTGCTGGCAGCGAGGGGGCTGAATAACAGAGGAGCCGCTCCGCGGGA		
BT 195	CTGACCCCCCGCGTTGCTGGCAGCGA-GGGGCTGAATAACAGAGGAGCCGCTCC--GGA		
Eigene 238	AGCAGGGCGGTCTCTCCCTCCCCTCAGGCCGGGCGCCGAGAGACCTCCCATCTTCTCTGT		
BT 251	AGCAGGGC-GTCCTCCCTCCCCTCAGGCCGGGCGTC-CGAGACCT-CCATCTTCTCTGT		
Eigene 298	TAGAACTGGGAAAC		
BT 308	TAGAACTGGGAAAC		

Abbildung 2: Vergleich der eigenen Sequenz des amplifizierten *DRD4*-Fragmentes mit Sequenzen aus der Genbank für *Bos taurus* (BT, AY263349), *Homo sapiens* (HS, L12397) und *Equus caballus* (EC, EF561289) unter Angabe der Position der jeweiligen Gesamtsequenz und Hervorhebung des identifizierten SNP (G/T) durch graue Unterlegung. Identische Nukleotide zwischen den Sequenzen sind durch senkrechte Striche, Unterschiede durch Punkte und fehlende Nukleotide durch waagrechte Striche gekennzeichnet.

4.1.1.3 Monoaminoxidase A - Gen

Aus dem *MAOA*-Gen wurde ein Fragment von Exon XIV bis Exon XV amplifiziert, welches durch Vergleich mit der mRNA-Sequenz von *Bos taurus* (Genbank-Nr. X15609) und der

Whole Genome Sequence des X-Chromosoms von *Bos taurus* (Genbank-Nr. NW_001508811) bestätigt wurde. Ein nicht-synonymer Cytosin-Thymin-Austausch, der einen Aminosäureaustausch von Prolin zu Leucin induziert, konnte in Exon XV an Position 26 identifiziert werden. Die entsprechenden Nukleotid- und Aminosäuresequenzen sind in Abbildung 3 dargestellt.

Intron 14														Exon XV				
gca aga gtt ttt ttt gct aac gat cta tgt tca ttc atc cag														GAT GTT CCA GCT GTA GAG				
														<i>Asp Val Pro Ala Val Glu</i>				
26																		
ATC ACC CCC AGC TTC TGG GAG AGA AAC CTG CCT TCC GTA TCA GGC																		
<i>Ile Thr Pro Ser Phe Trp Glu Arg Asn Leu Pro Ser Val Ser Gly</i>																		
CTC																		
<i>Leu</i>																		

Abbildung 3: Ausschnitt aus der hier amplifizierten Nukleotidsequenz von *MAOA*, Intron 14 und Exon XV mit entsprechender Aminosäuresequenz; der Nukleotidaustausch (C/T) an Position 26 des Exons XV und der daraus resultierende Aminosäureaustausch sind grau unterlegt.

4.1.1.4 Serotonintransporter - Gen

Die Genbanksequenzen des humanen *SERT*-Promotor (Genbank-Nr. EF179203 und DQ885907) wurden mit der bovinen Whole Genome Shotgun Sequence von BTA19 (Genbank-Nr. NW_001493660) verglichen. Der Bereich mit der größten Übereinstimmung ist im Intron 13 der bovinen *SERT*-Sequenz lokalisiert. Abschnitte dieses Introns wurden mit dem Primerpaar BT_SERT_F und BT_SERT_R amplifiziert und durch Sequenzvergleiche ein Guanin-Adenin-Austausch an Position 1113 des Introns identifiziert.

Weiterhin wurde ein Abschnitt der bovinen 5'UTR mit den Primern BT_SERT_UTR1 und BT_SERT_UTR2 untersucht. Die Sequenzen der 5'UTR, die einen Ausschnitt von 250 Basenpaaren umfassten, waren bei allen Testtieren und den als Väter der Kälber eingesetzten Bullen monomorph und waren mit der Genbanksequenz (Genbank-Nr. NW_001493660) identisch.

Tabelle 15: Genbereiche und identifizierte Nukleotidaustausche, Lokalisationsbezeichnungen in Genbanksequenzen und Besonderheiten.

Gen	Chromosom	Sequenzierte Abschnitte	Nukleotid-austausch	Lokalisation im Gen	Genbank-Nr. (basierend auf Btau_3.1)	Position in Genbank-sequenz	Besonderheiten
<i>CCKBR</i>	BTA15	Ex III - Ex IV	C / T	Intron 3, Position 131	NW_001493314	311275	<i>CCKBR</i> in gegensträngiger Richtung auf BTA15 Austausch an Bindungsstelle für MZF1
		Ex V, nicht codierend	C / T	Position 457 in 3'UTR	NW_001493314	309831	<i>CCKBR</i> in gegensträngiger Richtung auf BTA15
<i>DRD4</i>	BTA29	Intron 1 und Ex II	G / T	Intron 1, 32 bp vor Ex II			Keine Genbanksequenz dieses Abschnittes für <i>Bos taurus</i> existent
<i>MAOA</i>	BTAX	Ex XIV - Ex XV	C / T	Exon XV Position 26	NW_001508811	404393	<i>MAOA</i> in gegensträngiger Richtung auf BTAX Aminosäureaustausch von Prolin zu Leucin
<i>SERT</i>	BTA19	Intron 13	G / A	Intron 13, Position 1113	NW_001493660	1417588	<i>SERT</i> in gegensträngiger Richtung auf BTA19
		5'UTR	-				

4.1.2 Darstellung von DNA-Varianten der Kandidatengene mittels der verschiedenen Nachweismethoden

4.1.2.1 PCR-RFLP-Analysen

Mittels PCR-RFLP-Analysen wurden die Nukleotidaustausche im *CCKBR* (Intron 3), im *DRD4* (Intron 1) und im *MAOA* (Exon XV) typisiert.

4.1.2.1.1 *CCKBR* (Intron 3)

An Position 67 des PCR-Fragmentes der Primer CCKBR_BT_In3_F und CCKBR_BT_In3_R befindet sich ein C/T-Austausch, der die Erkennungssequenz des Enzyms *Bse*NI (CCAGT) verändert. An Position 144 des Fragmentes befindet sich eine weitere Schnittstelle für *Bse*NI, die als Kontrollschnitt zur Überprüfung der Enzymtätigkeit genutzt wurde. Die Sequenz ist in Abbildung 4 dargestellt.

```

1
acc cag aat ctt gct cca acA ATT ATC ACG ACC CAC CAC CCT GGG ATC CCC ATT
                        67
CGG GGC TCC TCC YCA GTT CTC TAG CCC TTA CCA GCT GTA CCC CGA
                                     144
ATC CTA CCT CTA CCT CTA GGA CGT GGT CAC CAG CCC TAG ATA CAC ↓CAG
TTC AGT CTT CCT CCA TCA GTG ATT ATA GCT GGa cag gga tcc gca ctg
198
act

```

Abbildung 4: Sequenz des 198bp-Fragmentes aus *CCKBR* (Intron 3) mit Primersequenzen in Kleinbuchstaben, grau unterlegtem Nukleotidaustausch (Y=C/T) an Position 67, Markierung der Schnittstellen von *Bse*NI an den Positionen 67 und 144 durch ↓ und der Erkennungssequenz durch Unterstrich sowie der Transkriptionsfaktorenbindestelle für MZF1 in kursiver Schrift.

Die Auftrennung der Fragmente nach Inkubation des PCR-Fragmentes mit *Bse*NI erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese und ist in Abbildung 5 exemplarisch aufgezeigt. Ein Kontrollfragment mit 54 bp wird immer amplifiziert. Bei Vorliegen von Allel *T* entsteht kein zweiter Schnitt und ein Fragment von 144 bp bleibt bestehen, wohingegen dieses Fragment bei Vorliegen von Allel *C* in 67 bp und 77 bp geschnitten wird.

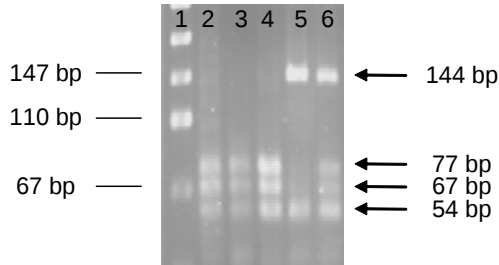


Abbildung 5: Genotypisierung des C/T-Austausches im *CCKBR* (Intron 3) durch PCR-RFLP-Analyse nach Inkubation mit *BseNI* und Auftrennung im Agarosegel.

Geltasche 1: Größenmarker pUC19 DNA/*MspI* (*HpaII*) Marker 23

Geltasche 2-4: Genotyp *CC*

Geltasche 5: Genotyp *TT*

Geltasche 6: Genotyp *CT*

4.1.2.1.2 *DRD4* (Intron 1)

Eine PCR zur Amplifizierung eines 113bp-Fragmentes aus Intron 1 des *DRD4* wurde mit den Primern *DRD4_bovin_f3* und *DRD4_bovin_r2* etabliert. An Position 21 dieses Fragmentes befindet sich der G/T-Austausch (siehe Abbildung 6). Das Enzym *Alw26I* erkennt die Sequenz GTCTC und führt ein Basenpaar weiter eine restriktionsenzymatische Spaltung durch.

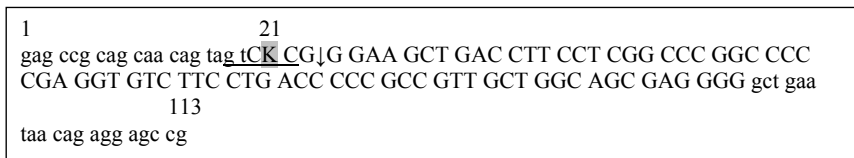


Abbildung 6: Sequenz des 113bp-Fragmentes aus *DRD4* (Intron 1) mit Primersequenzen in Kleinbuchstaben, grau unterlegtem Nukleotidaustausch (K=G/T) an Position 21 und Markierung der Schnittstelle von *Alw26I* durch ↓ sowie der Erkennungssequenz durch Unterstrich.

Die Auftrennung der nach Inkubation mit *Alw26I* entstehenden Fragmente mit Agarosegelelektrophorese und daraus folgende Genotypisierung ist in Abbildung 7 dargestellt. Bei Allel *G* wird kein Schnitt durchgeführt und das Fragment von 113 bp bleibt erhalten. Der Schnitt bei Allel *T* resultiert in zwei Fragmenten mit 90 bp und 23 bp, wobei das kleinere Fragment bei der Agarosegelelektrophorese nicht erkennbar ist.

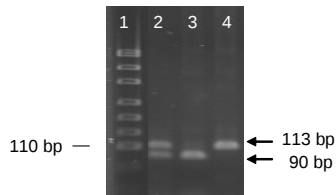


Abbildung 7: Genotypisierung des G/T-Austausches im *DRD4* (Intron 1) durch PCR-RFLP-Analyse nach Inkubation mit *Aha261* und Auftrennung im Agarosegel.

Geltasche 1: Größenmarker pUC19 DNA/*MspI* (*HpaII*) Marker 23

Geltasche 2: Genotyp *GT*

Geltasche 3: Genotyp *TT*

Geltasche 4: Genotyp *GG*

4.1.2.1.3 MAOA (Exon XV)

Die Genotypisierung des C/T-Austausches im Exon XV des *MAOA* erfolgte mithilfe eines 429bp-Fragmentes (siehe Abbildung 8), welches durch die Primer BT_MAOA_In14_f und BT_MAOA_Ex15_r2 amplifiziert wurde. An Position 224 des Fragmentes befindet sich der Austausch und von Position 74 bis 77 befindet sich eine weitere Erkennungssequenz für das verwendete Enzym *MnII*, welche als Kontrollschnitt (Fragment mit 84 Basenpaaren) für die Enzymfunktion mit einbezogen wurde.

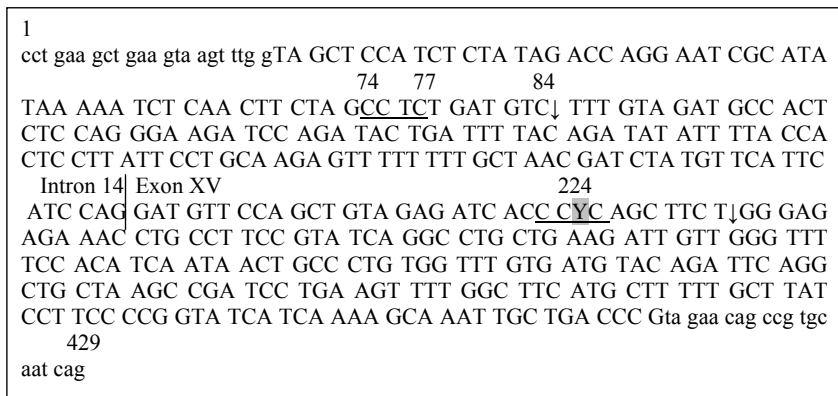


Abbildung 8: Sequenz des 429bp-Fragmentes aus *MAOA* (Intron 14 und Exon XV) mit Primersequenzen in Kleinbuchstaben, grau unterlegtem Nukleotidaustausch (Y=C/T) an Position 224 und Markierung der Schnittstellen von *MnII* durch ↓ sowie der Erkennungssequenz durch Unterstrich.

Die Genotypisierung erfolgte mit Agarosegelelektrophorese wie in Abbildung 9 dargestellt. Das Kontrollfragment mit 84 bp ist immer amplifiziert worden. Bei Allel *C* bleibt ein 345 bp Fragment bestehen. Dieses Fragment wird bei Allel *T* in 148 bp und 197 bp geschnitten.

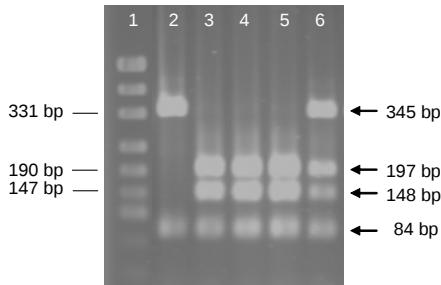


Abbildung 9: Genotypisierung des Nukleotidaustausches im *MAOA*, Exon XV durch PCR-RFLP-Analyse nach Inkubation mit *MnII* und Auftrennung im Agarosegel.

Geltasche 1: Größenmarker pUC19 DNA/*MspI* (*HpaII*) Marker 23

Geltasche 2: Genotyp *CC*

Geltasche 3-5: Genotyp *TT*

Geltasche 6: Genotyp *CT*

4.1.2.2 Tetra-Primer ARMS-PCR

Die Tetra-Primer ARMS-PCR wurde zur Typisierung der Nukleotidaustausche in der 3'UTR des *CCKBR* und im Intron 13 des *SERT* etabliert.

4.1.2.2.1 *CCKBR* (3'UTR)

Die Sequenz des in die Tetra-Primer ARMS-PCR einbezogenen Genabschnittes, von Position 312 – 578 der 3'UTR reichend, ist in Abbildung 10 dargestellt. Das Kontrollfragment mit 266 Basenpaaren wurde durch die beiden äußeren Primer *CCKBR_3'UTR_Out_F* und *CCKBR_3'UTR_Out_R* amplifiziert. Ein für das Allel *C* spezifisches Produkt mit 174bp wurde durch das Primerpaar *CCKBR_3'UTR_Out_F* und *CCKBR_3'UTR_In_R* dargestellt; das Allel *T* durch ein 148bp Produkt der Primer *CCKBR_3'UTR_In_F* und *CCKBR_3'UTR_Out_R*.

Die Auftrennung der Fragmente mit Agarosegelelektrophorese ist in Abbildung 11 zu erkennen.

1
gla tag cag ggg cat tga atc ttt cag gGC TCT GGA GCC TGG CAC AGG AAT GAC
TCC TGA GAT GCT CCG CTG TGC CCA TAG TTT GAC CTC ACA GTG CCC TTC
120 147
CCC ATC AGT GCT GCA AAc **acc aac ctg cct aat ctc aca ctc ccy** **gga cca acg agc tgt**
174
ttt gca cta aga AGT CCC TTC ATT CCT TTC CAG TTA AAT AAT CCC CTC ACC
266
GGA CTT TTT CAA GAA ATG ATA AAT Gac ttg gtt tcc ccc tca att tcc ttt tt

Abbildung 10: Sequenz des Kontrollfragmentes der äußeren Primer aus *CCKBR* (3'UTR) mit grau unterlegtem Nukleotidaustausch (Y=C/T) an Position 147 und Darstellung der Primerbindungsstellen in Kleinbuchstaben, wobei die der äußeren Primer kursiv und die der inneren Primer in fett dargestellt sind. Der Primer CCKBR_3'UTR_In_F bindet von Position 120 bis 147 und der Primer CCKBR_3'UTR_In_R von Position 147 bis 174.

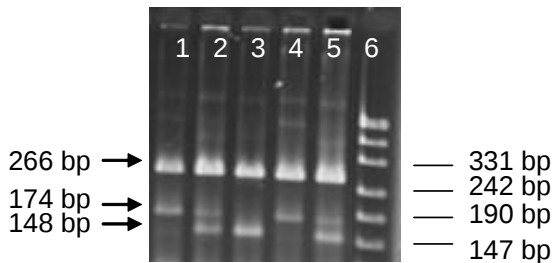


Abbildung 11: Genotypisierung des C/T-Austausches im *CCKBR* (3'UTR) durch Tetra-Primer ARMS-PCR mit Auftrennung der allelspezifischen PCR-Produkte und Kontrollfragment der äußeren Primer (266 bp) im Agarosegel.

Geltasche 1+4: Genotyp CC

Geltasche 2+5: Genotyp CT

Geltasche 3: Genotyp TT

Geltasche 6: Größenmarker pUC19 DNA/*MspI* (*HpaII*) Marker 23

4.1.2.2.2 *SERT* (Intron 13)

Durch die beiden äußeren Primer, BT_SERT_OUT_F und BT_SERT_OUT_R, wurde ein Kontrollfragment mit 375 Basenpaaren amplifiziert. Der Primer BT_SERT_IN_F amplifizierte mit dem Primer BT_SERT_OUT_R ein Produkt mit 196 bp, welches spezifisch für Allel A war. Das Allel G wurde durch das Produkt der Primer BT_SERT_IN_R und BT_SERT_OUT_F mit 232bp dargestellt. Die Sequenz mit entsprechenden Primeranlagerungen ist in Abbildung 12 gezeigt. Die Auftrennung der verschiedenen Fragmente und zugehörige Genotypen sind in Abbildung 13 dargestellt.

1
aac atc cca agt gtg ctc tga ggt agC CTG GGG TAA AGT GAC TCC GTG CAC ATC
 AGC AGG GAT TAC TCT CAC TTC TTT CAT TTA TCT GTA ACT AAT TTA GGG
 TGG AAG GAG CTT TTT GAT CTT CTA GAA CGA GAG ACA GTT CCT TCA
 181
 GTC CAG CTT ATT AGG CTA TCT GGG CCA TCC ATT **tcc tca gag gac atg gat aca**
 207 232
gct gtr cct tct ttc aaa aca act ctt tcg cAT TCT TTT TTA CTT TCC CAG GGC AGC
 CCT TTA TTT TTT GTG CTT TGT GTA CCT GCA TGT CTC GAT ATT CAT CTG
 TAA GAT GGC CAG CGT GCT CAT TCT TGC TTC TGT TCT GCT TCA *Tct ctc tct*
 375
acc aca gaa gcc ctc ctt

Abbildung 12: Sequenz des Kontrollfragmentes der äußeren Primer aus *SERT* (Intron 13) mit grau unterlegtem Nukleotidaustausch (R=A/G) an Position 207 und Darstellung der Primer-bindungsstellen in Kleinbuchstaben, wobei die der äußeren Primer kursiv und die der inneren Primer in fett dargestellt sind. Der Primer BT_SERTP_IN_F bindet von Position 181 bis 207 und der Primer BT_SERTP_IN_R von Position 207 bis 232.

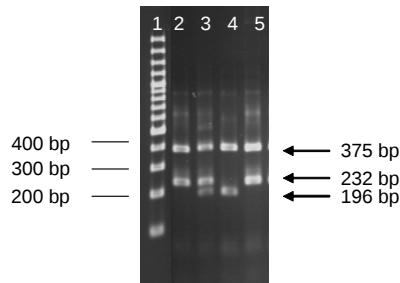


Abbildung 13: Genotypisierung des G/A-Austausches im *SERT* (Intron 13) durch Tetra-Primer ARMS-PCR mit Auftrennung der allelspezifischen PCR-Produkte und Kontrollfragment der äußeren Primer (375bp) im Agarosegel.

Geltasche 1: Größenmarker GeneRuler™ 100bp Ladder Plus

Geltasche 2+5: Genotyp *GG*

Geltasche 3: Genotyp *GA*

Geltasche 4: Genotyp *AA*

4.1.3 Mikrosatellitenanalyse mit dem ALFexpress

Die Mikrosatellitenanalyse mit dem Programm AlleleLocator am ALFexpress ist in Abbildung 14 exemplarisch für die parallel geladenen Marker *BMS1928* und *DIK634* dargestellt.

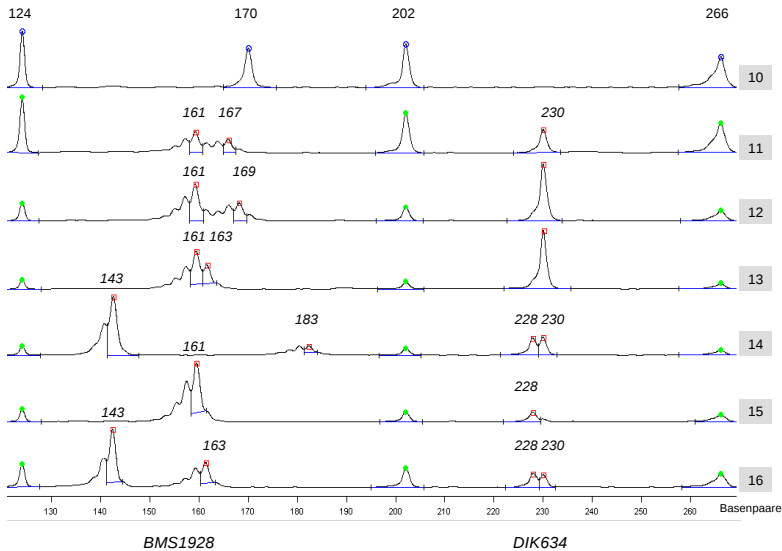


Abbildung 14: Darstellung von Mikrosatellitenallelen am ALFexpress der Mikrosatelliten *BMS1928* und *DIK634* bei sechs verschiedenen Tieren (Reihe 11 bis 16) mit externem Größenmarker in Reihe 10, dessen Allele durch blaue Kreise gekennzeichnet sind. Die Allele der Mikrosatelliten sind mit roten Quadraten gekennzeichnet und die entsprechenden Größen der Peaks in Basenpaaren manuell eingefügt. Die mit grünen Kreisen markierten Peaks in den Reihen 11 bis 16 stellen die internen Größenmarker (124/202/266) dar.

4.1.4 Mikrosatellitenanalyse mit dem ABI PRISM® 377 DNA Sequencer

Die Auswertung der Mikrosatelliten am ABI PRISM® 377 DNA Sequencer erfolgte mithilfe des Programms Genotyper V3.7, wobei jeder verwendete Farbstoff einzeln betrachtet werden kann. Die graphische Darstellung der Auswertung ist in Abbildung 15 exemplarisch für die beiden 6-FAM gelabelten Mikrosatelliten *OarHH22* und *BMS1857* (BTA29Duplex) aufgezeigt.

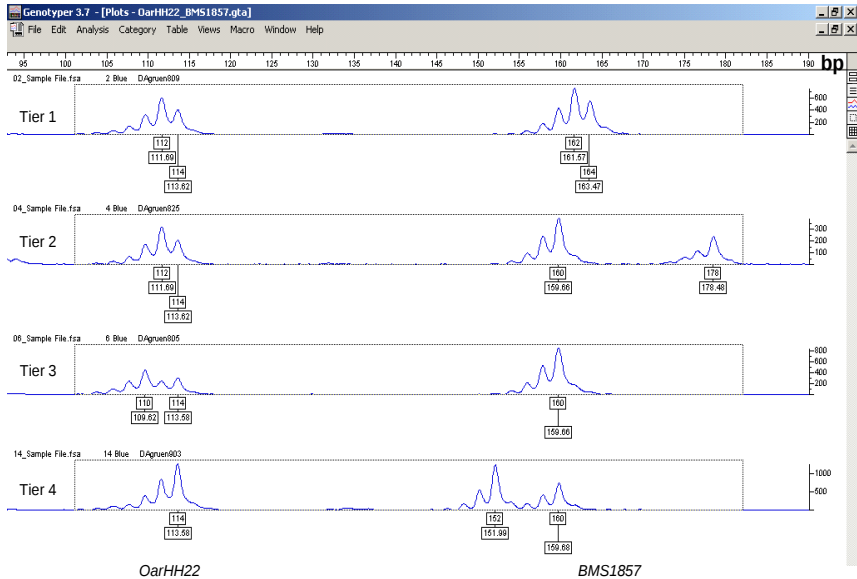


Abbildung 15: Darstellung von Mikrosatellitenallelen am ABI PRISM® 377 DNA Sequencer von *OarHH22* und *BMS1857* bei vier Tieren (Tier 1–4). Unterhalb jedes Allelpeaks befindet sich ein oberes Kästchen mit Angabe der definierten Allelgröße und ein unteres mit der effektiv gemessenen Größe.

4.2 Genetisch-statistische Ergebnisse

4.2.1 Signifikanzniveaus der untersuchten Einflussfaktoren des Grundmodells der Varianzanalysen und der QTL-Analysen

Die Signifikanzniveaus der in der Varianzanalyse und den QTL-Analysen einbezogenen Faktoren Jahr, Geschlecht und Alter der Tiere bei Testdurchführung auf die vier verschiedenen Scores sind in Tabelle 16 aufgeführt.

Tabelle 16: Signifikanzniveaus der untersuchten Einflussfaktoren des für die Varianzanalysen und QTL-Analysen verwendeten Grundmodells getrennt nach Rassen und den vier verschiedenen Scores.

	Rasse	Score des Anbindetestes (MIN2AT)	Score bei Eintritt in die Waage (SCEINWT)	Score während des Wiegens (SCWGWT)	Score des Separier- und Rückhaltetestes (SCAST)
Jahr	DA	***	***	***	***
	FV	***	***	**	***
Geschlecht	DA	n.s.	n.s.	*	**
	FV	*	n.s.	n.s.	***
Alter beim Test	DA	n.s.	n.s.	*	n.s.
	FV	n.s.	n.s.	n.s.	**

n.s. = nicht signifikant

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

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

*** = signifikant bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,1% = $p < 0,001$

Das Jahr der Testdurchführung hatte einen höchst signifikanten Einfluss auf die vergebenen Scores bei beiden Rassen. Bei der Rasse Dt. Fleckvieh und dem Score SCWGWT war der Einfluss des Jahres mit $p = 0,0029$ im hoch signifikanten Bereich gelegen. Da die Effekte des Jahres nicht von denen des Handlers zu differenzieren sind, sind diese signifikanten Einflüsse auch auf den Handler zu beziehen.

Das Geschlecht der Kälber hatte auf den Score SCAST bei den Dt. Fleckvieh einen höchst signifikanten und bei den Dt. Angus einen hoch signifikanten Effekt. Außerdem hatte das Geschlecht einen signifikanten Einfluss auf den Score SCWGWT bei den Dt. Angus ($p = 0,0326$) und den Score MIN2AT bei den Dt. Fleckvieh ($p = 0,0386$).

Das Alter der Kälber bei Testdurchführung hatte einen signifikanten Effekt mit $p = 0,0271$ bei den Dt. Angus und dem Score SCWGWT. Der Score SCAST wurde bei den Dt. Fleckvieh hoch signifikant ($p = 0,0042$) durch das Alter beeinflusst.

4.2.2 Allel- und Genotypfrequenzen des Nukleotidaustausches im *CCKBR* (Intron 3)

Die Allelfrequenzen des Nukleotidaustausches im *CCKBR* (Intron 3) unterscheiden sich signifikant bei den unverwandten Tieren beider Rassen. Bei Dt. Angus liegt das Allel *C* mit einer Frequenz von 0,84 und Allel *T* mit 0,16 vor und bei Dt. Fleckvieh hat das Allel *C* eine Frequenz von 0,95 und Allel *T* von 0,05.

Von insgesamt 954 der 962 Kälber konnte der Genotyp dieses Nukleotidaustausches ermittelt werden. Diese teilten sich auf in 542 Kälber der Rasse Dt. Angus und 412 Kälber der Rasse

Dt. Fleckvieh. Bei den Kälbern der Rasse Dt. Fleckvieh kam das Allel *T* nur in einer Frequenz von 0,03 vor. Dies spiegelt sich auch in den Genotypfrequenzen wieder. Der Genotyp *TT* wird bei den hier untersuchten Dt. Fleckvieh Tieren nicht nachgewiesen und bei den Dt. Angus in einer Frequenz von 0,10 (siehe Tabelle 17). Die Allelfrequenzen der Kälber beider Rassen unterscheiden sich höchst signifikant. Bei den eingesetzten Dt. Fleckvieh-Bullen haben alle den Genotyp *CC*, bei den Dt. Angus hatten drei Bullen *CC*, zwei Bullen *CT* und einer *TT*. Innerhalb der Dt. Angus konnten Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht festgestellt werden (siehe Tabelle 17).

Tabelle 17: Allel- und Genotypfrequenzen des Nukleotidaustausches in *CCKBR* (Intron 3) der Kälber beider Rassen sowie das Testergebnis über das Vorliegen des Hardy-Weinberg-Gleichgewichtes.

Rasse	n	Allelfrequenz		Genotypfrequenz		
		<i>C</i>	<i>T</i>	<i>CC</i>	<i>CT</i>	<i>TT</i>
DA **	542	0,73	0,27	0,55	0,35	0,10
FV	412	0,97	0,03	0,95	0,05	0,00

** = Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht signifikant mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1%

4.2.3 Einfluss des Nukleotidaustausches im *CCKBR* (Intron 3) auf Verhaltensscores mittels χ^2 -Test

Die Gegenüberstellung der Extremwerte der vergebenen Scores (1 = ruhiges Tier und 5 = extrem nervöses/aufgeregtes Tier) mit den jeweiligen Allelfrequenzen des Nukleotidaustausches im *CCKBR* (Intron 3) zeigt bei Dt. Angus eine tendenziell höhere Frequenz des Allels *C* bei Score 5 im Vergleich zu Score 1 bei allen vier Merkmalen. Dieser Trend ist bei Dt. Fleckvieh nicht zu erkennen (siehe Abbildung 16). Ein signifikanter Unterschied der Allelfrequenzen ergab sich nur für die Rasse Dt. Angus bei dem Score während des Wiegens (SCWGWT) bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% mit $p = 0,0431$. Bei allen anderen Scores bei Dt. Angus und bei Dt. Fleckvieh ließen sich mit p -Werten zwischen 0,0842 (SCAST bei FV) und 0,8395 (SCEINWT bei DA) keine weiteren signifikanten Unterschiede der Allelfrequenzen nachweisen.

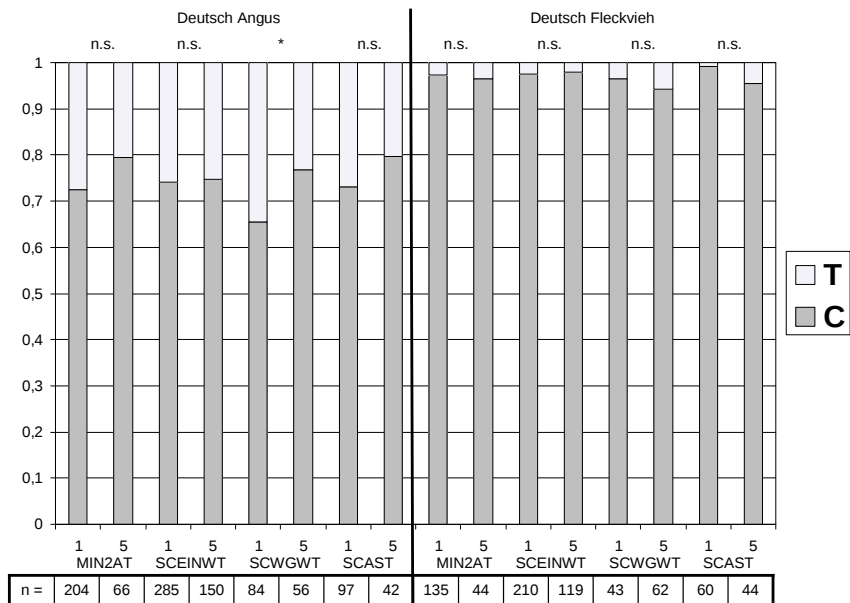


Abbildung 16: Gegenüberstellung der Allelfrequenzen des Nukleotidaustausches im *CCKBR* im Intron 3 bezüglich der Extremwerte der vergebenen Verhaltensscores (1 = ruhig und 5 = extrem nervös/aufgeregt) für die Kälber der Rassen Dt. Angus und Dt. Fleckvieh unter Angabe der Signifikanzen und der Anzahl (n) Kälber der jeweiligen Klassen.

n.s. = nicht signifikant

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

4.2.4 Einfluss des Nukleotidaustausches im *CCKBR* (Intron 3) auf Verhaltensscores mittels Varianzanalyse

Die berechneten LSQ-Mittelwerte und Standardfehler sind in Tabelle 18 angegeben. Hier ließen sich keine Tendenzen bezüglich der Mittelwerte der Scores in Verbindung mit den Genotypen erkennen. Bei Dt. Angus und dem Score SCEINWT sind die Mittelwerte bei allen Genotypen sogar annähernd identisch. Mittels der Varianzanalyse nach dem Grundmodell mit dem Genotyp im *CCKBR* im Intron 3 als fixem Effekt lies sich kein signifikanter Einfluss dessen auf die den Kälbern gegebenen Verhaltensscores darstellen (siehe Tabelle 19). Bei dem Score SCAST bei Dt. Angus ist eine Linearität der Mittelwerte im Zusammenhang mit den Genotypen erkennbar, allerdings in der Varianzanalyse nur mit $p = 0,3070$ versehen, was sich aus den hohen Standardfehlern begründet.

Tabelle 18: LSQ-Mittelwerte und Standardfehler (in Klammern) der Verhaltensscores für den Effekt des Genotyps im *CCKBR* (Intron 3) bei den Rassen Dt. Angus und Dt. Fleckvieh.

	MIN2AT		SCEINWT		SCWGW		SCAST	
	DA	FV	DA	FV	DA	FV	DA	FV
<i>CC</i>	1,94 (0,058)	1,98 (0,054)	1,67 (0,052)	1,74 (0,051)	2,39 (0,058)	2,57 (0,058)	2,18 (0,050)	2,38 (0,048)
<i>CT</i>	1,97 (0,073)	2,18 (0,201)	1,68 (0,067)	1,76 (0,181)	2,48 (0,075)	2,70 (0,205)	2,28 (0,064)	2,68 (0,172)
<i>TT</i>	1,84 (0,133)	-	1,67 (0,123)	-	2,49 (0,137)	-	2,37 (0,119)	-

- = Genotyp *TT* in der Rasse Dt. Fleckvieh nicht nachgewiesen

Tabelle 19: Signifikanzniveau des Einflusses des Genotyps im *CCKBR* (Intron 3) auf die Verhaltensscores unter Berücksichtigung der unter 4.2.1 Einflussfaktoren.

	Rasse	MIN2AT	SCEINWT	SCWGW	SCAST
Genotyp <i>CCKBR</i> (Intron 3)	DA	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	FV	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

n.s. = nicht signifikant

4.2.5 Allel- und Genotypfrequenzen des Nukleotidaustausches im *CCKBR* (3'UTR)

Bei den unverwandten Tieren beider Rassen liegt das Allel *C* dieses Nukleotidaustausches mit einer Frequenz von 0,88 bei Dt. Angus bzw. 0,81 bei Dt. Fleckvieh vor.

Eine Typisierung konnte für 960 Kälber (417 Dt. Angus und 543 Dt. Fleckvieh) durchgeführt werden. Bei den Dt. Angus war nur einer der Bullen heterozygot, die anderen hatten den Genotyp *CC*. Bei Dt. Fleckvieh lag bei sechs Bullen derselbe Genotyp vor, einer war heterozygot und einer hatte den Genotyp *TT*. Dies spiegelte sich in den Allelfrequenzen der Kälber wieder, wobei das Allel *C* eine Frequenz von 0,93 bzw. 0,78 bei DA bzw. FV entsprechend aufwies (siehe Tabelle 20) und eine höchst signifikanter Unterschied der Allelfrequenzen nachgewiesen werden konnte. Beide Populationen befanden sich im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

Tabelle 20: Allel- und Genotypfrequenzen des Nukleotidaustausches in *CCKBR* (3'UTR) der Kälber beider Rassen.

Rasse	n	Allelfrequenz		Genotypfrequenz		
		<i>C</i>	<i>T</i>	<i>CC</i>	<i>CT</i>	<i>TT</i>
DA	417	0,93	0,07	0,88	0,12	0,00
FV	543	0,78	0,22	0,60	0,35	0,05

4.2.6 Einfluss des Nukleotidaustausches im *CCKBR* (3'UTR) auf Verhaltensscores mittels χ^2 -Test

Für die Extremwerte der Verhaltensscores ist bei beiden Rassen keine einheitliche Tendenz in der Verteilung der Allelfrequenzen zu erkennen (siehe Abbildung 17). Dies spiegelt sich auch in den relativ hohen p-Werten der χ^2 -Tests wider, die zwischen 0,1580 und 0,9477 liegen und somit auch kein statistisch signifikanter Einfluss vorhanden ist.

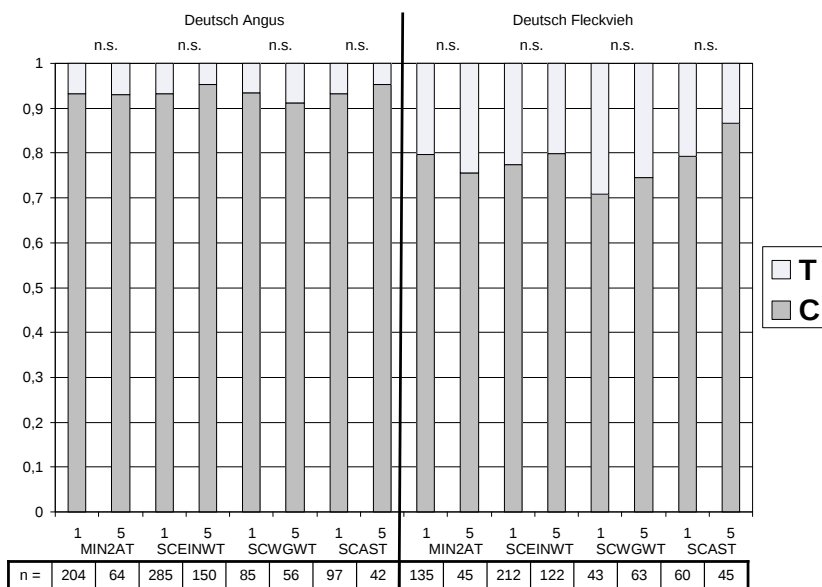


Abbildung 17: Gegenüberstellung der Allelfrequenzen des Nukleotidaustausches im *CCKBR* in der 3'UTR bezüglich der Extremwerte der vergebenen Verhaltensscores (1 = ruhig und 5 = extrem nervös/aufgeregt) für die Kälber der Rassen Dt. Angus und Dt. Fleckvieh unter Angabe der Signifikanz und der Anzahl (n) Kälber der jeweiligen Klassen.

n.s. = nicht signifikant

4.2.7 Einfluss des Nukleotidaustausches im *CCKBR* (3'UTR) auf Verhaltensscores mittels Varianzanalyse

Die bearbeiteten Mittelwerte der Verhaltensscores unter dem Einfluss des Genotyps des *CCKBR* in der 3'UTR sind in Tabelle 21 aufgezeigt. Bei MIN2AT bei Dt. Fleckvieh und SCWGWT sowie SCAST bei Dt. Angus scheint das Allel *T* mit einer Erhöhung des Scores in Verbindung zu sein. Im Gegensatz dazu lässt sich eine Reduktion des Scores im Zusammen-

hang mit Allel *T* bei MIN2AT und SCEINWT bei Dt. Angus beobachten. Die anderen drei Scores bei Dt. Fleckvieh lassen keine Tendenz erkennen und eine statistisch signifikante Beeinflussung der Scores durch diesen Austausch konnte in keinem Fall nachgewiesen werden (siehe Tabelle 22).

Tabelle 21: LSQ-Mittelwerte und Standardfehler (in Klammern) der Verhaltensscores für den Effekt des Genotyps im *CCKBR* (3'UTR) bei den Rassen Dt. Angus und Dt. Fleckvieh.

	MIN2AT		SCEINWT		SCWGWT		SCAST	
	DA	FV	DA	FV	DA	FV	DA	FV
<i>CC</i>	1,95 (0,047)	1,92 (0,068)	1,68 (0,042)	1,75 (0,063)	2,41 (0,046)	2,55 (0,072)	2,22 (0,041)	2,43 (0,060)
<i>CT</i>	1,87 (0,108)	2,10 (0,092)	1,65 (0,096)	1,75 (0,085)	2,48 (0,107)	2,66 (0,096)	2,27 (0,092)	2,33 (0,083)
<i>TT</i>	1,41 (0,871)	2,33 (0,244)	1,43 (0,779)	1,53 (0,224)	3,11 (0,871)	2,54 (0,253)	2,81 (0,758)	2,51 (0,210)

Tabelle 22: Signifikanzniveau des Einflusses des Genotyps im *CCKBR* (3'UTR) auf die Verhaltensscores unter Berücksichtigung der unter 4.2.1 genannten Einflussfaktoren.

	Rasse	MIN2AT	SCEINWT	SCWGWT	SCAST
Genotyp <i>CCKBR</i> (3'UTR)	DA	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	FV	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

n.s. = nicht signifikant

4.2.8 Allel- und Genotypfrequenzen des Nukleotidaustausches im *DRD4* (Intron 1)

Mittels der etablierten PCR-RFLP-Analyse konnten 953 Kälber bezüglich des Genotyps im *DRD4* (Intron 1) typisiert werden. Diese setzten sich aus 537 Dt. Angus Kälbern und 416 Dt. Fleckvieh Kälbern zusammen.

In der Rasse Dt. Fleckvieh fiel bei den Kälbern ein geringes Vorliegen des Allels *G* (Frequenz = 0,17) auf, was sich auch in den entsprechenden Genotypfrequenzen widerspiegelte (siehe Tabelle 23). Die Allelfrequenzen der Kälber unterscheiden sich zwischen beiden Rassen höchst signifikant voneinander. Auch bei den unverwandten Tieren lag die Allelfrequenz bei FV mit 0,28 für Allel *G* deutlich unter der von DA mit 0,59 für Allel *G* und lies sich als statistisch höchst signifikanter Rasseunterschied belegen. Bei FV war nur einer der eingesetzten Kälberväter heterozygot, die anderen hatten den Genotyp *TT*. Bei den Dt. Angus-Bullen hatte die eine Hälfte den Genotyp *GG*, die andere Hälfte *GT*. Bei den FV-Kälbern zeigte sich eine Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

Tabelle 23: Allel- und Genotypfrequenzen des Nukleotidaustausches in *DRD4* (Intron 1) der Kälber beider Rassen sowie das Testergebnis über das Vorliegen des Hardy-Weinberg-Gleichgewichtes.

Rasse	n	Allelfrequenz		Genotypfrequenz		
		G	T	GG	GT	TT
DA	537	0,65	0,35	0,41	0,48	0,11
FV **	416	0,17	0,83	0,01	0,33	0,66

** = Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht signifikant mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1%

4.2.9 Einfluss des Nukleotidaustausches im *DRD4* auf Verhaltensscores mittels Chi²-Test

Der Vergleich der Allelfrequenzen des Nukleotidaustausches im *DRD4* zwischen den Extremwerten der Verhaltensscores innerhalb der beiden Rassen zeigte nur bei den Dt. Fleckvieh einen signifikanten Unterschied ($p = 0,0158$) bei dem Score SCAST des Separier- und Rückhaltetestes (siehe Abbildung 18). Hier liegt das Allel G bei Score 5 häufiger als bei Score 1 vor. Bei Dt. Angus deutet sich rein optisch die gegenteilige Tendenz an, allerdings mit nicht signifikanten p-Werten zwischen 0,14776 (SCEINWT) bis 0,5693 (SCAST).

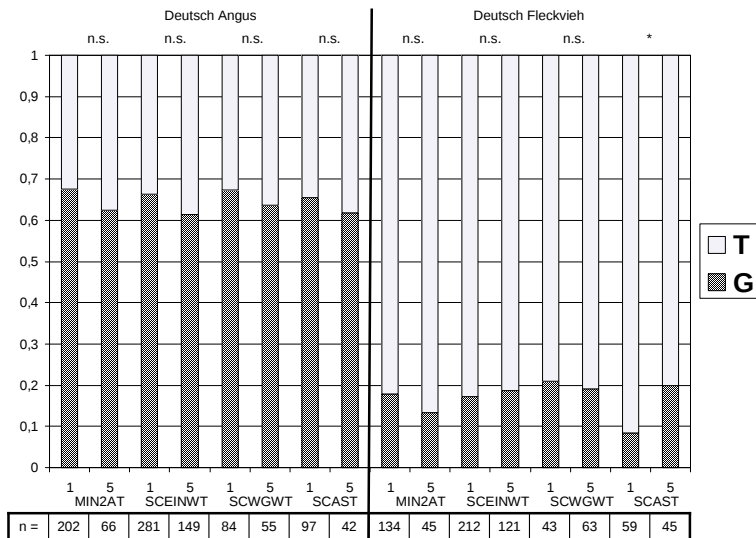


Abbildung 18: Gegenüberstellung der Allelfrequenzen des Nukleotidaustausches im *DRD4* bezüglich der Extremwerte der vergebenen Verhaltensscores (1 = ruhig und 5 = extrem nervös/aufgeregt) für die Kälber der Rassen Dt. Angus und Dt. Fleckvieh unter Angabe der Signifikanzen und der Anzahl (n) Kälber der jeweiligen Klassen.

n.s. = nicht signifikant

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

4.2.10 Einfluss des Nukleotidaustausches im *DRD4* auf Verhaltensscores mittels Varianzanalyse

In Tabelle 24 sind die LSQ-Mittelwerte und Standardfehler der Verhaltensscores unter dem Einfluss des Genotyps im *DRD4* in Intron 1 angegeben. Bei den beiden Scores des Wiegetestes bei Dt. Angus zeigten sich lineare Veränderungen im Bezug zu den Genotypen, wobei bei SCEINWT eine Erhöhung des Scores mit Allel *T* und bei SCWGWT eine Reduktion des Scores mit Allel *T* einhergeht. Ein signifikanter Einfluss des Genotypes auf den Score war allerdings nur für den Score des Separier- und Rückhaltetestes mit $p = 0,0376$ nachweisbar (siehe Tabelle 25). Bei der Rasse Dt. Fleckvieh ist eine Veränderung des Scores mit dem Genotyp bei SCAST augenscheinlich, aber nicht signifikant ($p = 0,2738$). Ein signifikanter Einfluss konnte für den Genotyp im *DRD4* auf den Score des Anbindetestes nachgewiesen werden ($p = 0,0384$). Auf die jeweils verbleibenden drei Scores je Rasse hatte der hier untersuchte Genotyp im *DRD4* keinen signifikanten Einfluss (siehe Tabelle 25).

Tabelle 24: LSQ-Mittelwerte und Standardfehler (in Klammern) der Verhaltensscores für den Effekt des Genotyps im *DRD4* (Intron 1) bei den Rassen Dt. Angus und Dt. Fleckvieh.

	MIN2AT		SCEINWT		SCWGWT		SCAST	
	DA	FV	DA	FV	DA	FV	DA	FV
<i>GG</i>	1,94 (0,058)	2,53 (0,437)	1,66 (0,105)	1,51 (0,408)	2,47 (0,126)	2,27 (0,469)	2,21 (0,094)	2,99 (0,406)
<i>GT</i>	1,93 (0,054)	1,84 (0,105)	1,68 (0,103)	1,78 (0,093)	2,42 (0,123)	2,59 (0,129)	2,31 (0,092)	2,42 (0,134)
<i>TT</i>	2,04 (0,114)	2,04 (0,090)	1,71 (0,106)	1,71 (0,078)	2,38 (0,164)	2,56 (0,114)	2,03 (0,129)	2,38 (0,124)

Tabelle 25: Signifikanzniveau des Einflusses des Genotyps im *DRD4* (Intron 1) auf die Verhaltensscores unter Berücksichtigung der unter 4.2.1 genannten Einflussfaktoren.

	Rasse	MIN2AT	SCEINWT	SCWGWT	SCAST
Genotyp <i>DRD4</i>	DA	n.s.	n.s.	n.s.	*
	FV	*	n.s.	n.s.	n.s.

n.s. = nicht signifikant

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

4.2.11 Allel- und Genotypfrequenzen des Nukleotidaustausches im *MAOA* (Exon XV)

Die Allelfrequenzen für Allel *C* der unverwandten Tiere sind bei Dt. Angus 0,21 und bei Dt. Fleckvieh 0,55 und für Allel *T* entsprechend 0,79 bzw. 0,45. Diese Unterschiede in der

Allelverteilung bei beiden Rassen sind statistisch höchst signifikant. Von 960 Kälbern konnte dieser Genotyp im *MAOA* im Exon XV ermittelt werden. Hiervon waren je 50 % männliche und weibliche Kälber. Innerhalb der Dt. Fleckvieh ($n = 416$) lagen die Allelfrequenzen bei 0,49 für Allel *C* und 0,51 für Allel *T* und bei den Dt. Angus ($n = 544$) bei 0,39 für *C* und 0,61 für *T*. Auch bei den Kälbern sind die Allelfrequenzen zwischen den Rassen höchst signifikant verschieden. Die prozentualen Häufigkeiten der Genotypen der Kälber nach Rassen und Geschlecht getrennt sind Tabelle 26 zu entnehmen.

Tabelle 26: Allel- und Genotypfrequenzen des Nukleotidaustausches in *MAOA* (Exon XV) bei Dt. Angus und Dt. Fleckvieh nach Geschlechtern getrennt.

	Rasse	n	<i>C</i>	<i>T</i>	<i>CC</i>	<i>CT</i>	<i>TT</i>
Männliche Kälber	DA	275	0,29	0,71	-	-	-
	FV	205	0,57	0,43	-	-	-
Weibliche Kälber	DA	269	0,45	0,55	0,16	0,58	0,26
	FV	211	0,45	0,55	0,19	0,53	0,28

4.2.12 Einfluss des Nukleotidaustausches im *MAOA* auf Verhaltensscores mittels χ^2 -Test

Durch den χ^2 -Test mit den Extremwerten der Scores ergaben sich signifikante Einflüsse der Allelfrequenz des Nukleotidaustausches im *MAOA* auf beide Verhaltensscores des Wiegetestes bei Dt. Angus und auf den Score des Separier- und Rückhaltetestes bei Dt. Fleckvieh (siehe Abbildung 19). Die ermittelten p-Werte betrugen 0,0140 bei SCEINWT bzw. 0,0302 bei SCWGWT der Dt. Angus und 0,0357 bei Score SCAST der Dt. Fleckvieh. Der p-Wert für den Score MIN2AT bei Dt. Fleckvieh lag knapp oberhalb der Signifikanzgrenze von 5% mit $p = 0,0541$. Alle anderen Werte befanden sich zwischen 0,2873 und 0,9310. Anhand der graphischen Darstellung lassen sich keine Allelverteilungstendenzen zwischen den Extremwerten erkennen. Auffällig sind die gegensätzlichen Allelfrequenzen der beiden als signifikant ermittelten Wiegescores bei Dt. Angus. Dies erscheint bei Dt. Fleckvieh einheitlicher; hier liegt das Allel *C* bei Score 5 sowohl des signifikanten SCAST als auch des nahe der Signifikanzgrenze gelegenen MIN2AT in geringerer Frequenz als bei Score 1 vor.

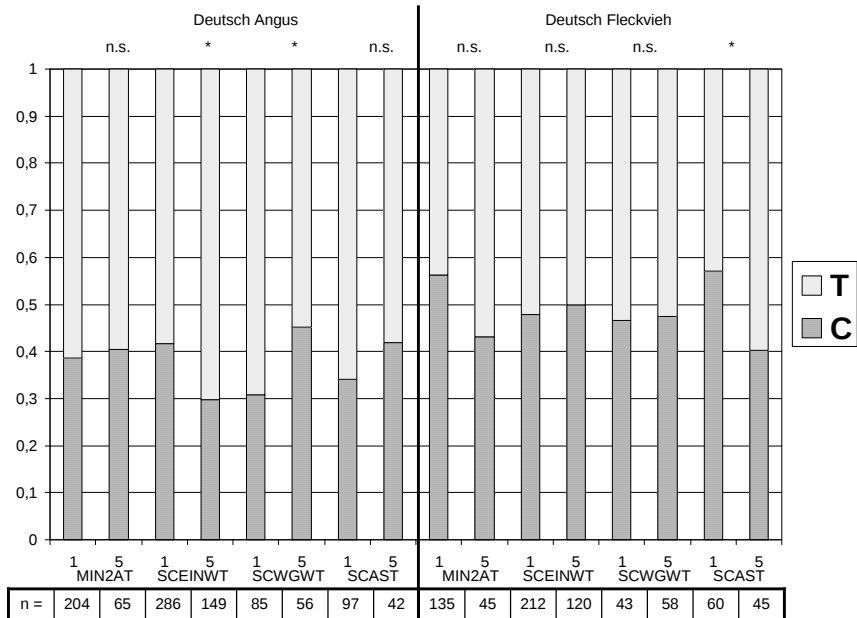


Abbildung 19: Gegenüberstellung der Allelfrequenzen des Nukleotidaustausches im *MAOA* bezüglich der Extremwerte der vergebenen Verhaltensscores (1 = ruhig und 5 = extrem nervös/aufgeregt) für die Kälber der Rassen Dt. Angus und Dt. Fleckvieh unter Angabe der Signifikanzen und der Anzahl (n) Kälber der jeweiligen Klassen.

n.s. = nicht signifikant

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

4.2.13 Einfluss des Nukleotidaustausches im *MAOA* auf Verhaltensscores mittels Varianzanalyse

Der Effekt des Genotyps im *MAOA* auf die Verhaltensscores wurde innerhalb der Rassen und innerhalb der Geschlechter mit den in 4.2.1 genannten Einflussfaktoren getestet. Für keinen der untersuchten Scores konnte ein signifikanter Effekt dargestellt werden (siehe Tabelle 27). Bei den männlichen Kälbern der Rasse Dt. Angus war der p-Wert für Score MIN2AT 0,0783 und für Score SCWGWT bei 0,0648. Die LSQ-Mittelwerte und Standardfehler aller Scores sind in Tabelle 28 aufgeführt.

Tabelle 27: Signifikanzniveau des Einflusses des Genotyps im *MAOA* (Exon XV) auf die Verhaltensscores unter Berücksichtigung der in 4.2.1 genannten Einflussfaktoren.

		MIN2AT		SCEINWT		SCWGWT		SCAST	
		♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
Genotyp <i>MAOA</i>	DA	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	FV	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

n.s. = nicht signifikant

Tabelle 28: LSQ-Mittelwerte und Standardfehler (in Klammern) der Verhaltensscores für den Effekt des Genotyps im *MAOA* bei den bei den Rassen Dt. Angus und Dt. Fleckvieh nach Geschlechtern getrennt.

		MIN2AT		SCEINWT		SCWGWT		SCAST	
		DA	FV	DA	FV	DA	FV	DA	FV
Männliche Kälber	<i>C</i>	2,05	1,93	1,64	1,69	2,49	2,59	2,06	2,20
		(0,100)	(0,135)	(0,128)	(0,113)	(0,135)	(0,153)	(0,120)	(0,138)
	<i>T</i>	1,84	1,80	1,71	1,77	2,31	2,45	2,14	2,25
		(0,066)	(0,144)	(0,107)	(0,121)	(0,112)	(0,160)	(0,097)	(0,145)
Weibliche Kälber	<i>CC</i>	1,94	1,91	1,65	1,68	2,63	2,47	2,48	2,46
		(0,141)	(0,158)	(0,146)	(0,129)	(0,182)	(0,188)	(0,147)	(0,198)
	<i>CT</i>	2,00	2,12	1,63	1,62	2,47	2,49	2,39	2,65
		(0,073)	(0,087)	(0,099)	(0,076)	(0,132)	(0,122)	(0,105)	(0,140)
	<i>TT</i>	2,04	2,13	1,83	1,78	2,47	2,79	2,13	2,53
		(0,113)	(0,128)	(0,138)	(0,105)	(0,176)	(0,148)	(0,143)	(0,159)

4.2.14 Allel- und Genotypfrequenzen des Nukleotidaustausches im *SERT* (Intron 13)

Innerhalb der Rassen sind die Allelfrequenzen des Adenin-Guanin-Austausches in Intron 13 des *SERT*-Gen bei den unverwandten Tieren 0,34 für Allel *G* und 0,66 für Allel *A* bei Dt. Angus und 0,51 für Allel *G* und 0,49 für Allel *A* bei Dt. Fleckvieh. Dieser Rasseunterschied liegt im signifikanten Bereich.

Der Genotyp konnte für 954 Kälber typisiert werden. Hierbei handelte es sich um 538 Tiere der Rasse Dt. Angus und 416 Tiere der Rasse Dt. Fleckvieh. Der Genotyp *AA* kam bei zwei Dt. Angus- und bei drei Dt. Fleckvieh-Bullen vor, Genotyp *GA* bei vier DA-Bullen und zwei FV-Bullen und Genotyp *GG* bei drei FV-Bullen. Die sich höchst signifikant unterscheidenden Allelfrequenzen der Kälber sind in der Rasse Dt. Angus 0,69 für Allel *A* und 0,31 für Allel *G*; bei der Rasse Dt. Fleckvieh 0,43 für das Allel *A* und für das Allel *G* 0,57. Die Genotypfrequenzen sind in Tabelle 29 aufgeführt. Die Populationen befinden sich im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

Tabelle 29: Allel- und Genotypfrequenzen des Nukleotidaustausches im *SERT* (Intron 13) beider Rassen.

Rasse	n	Allelfrequenz		Genotypfrequenz		
		<i>G</i>	<i>A</i>	<i>GG</i>	<i>GA</i>	<i>AA</i>
DA	538	0,31	0,69	0,09	0,44	0,47
FV	416	0,57	0,43	0,32	0,51	0,17

4.2.15 Einfluss des Nukleotidaustausches im *SERT* auf Verhaltensscores mittels Chi²-Test

Bei beiden Rassen liegt das Allel *A* nur bei dem Merkmal SCEINWT bei Score 5 häufiger als bei Score 1 vor. Ein Effekt der Allelfrequenzen des Nukleotidaustausches im *SERT* auf die Extremwerte der Verhaltensscores lies sich mittels Chi² - Test nur auf den Score SCEINWT bei Dt. Angus mit einem p-Wert von 0,0457 nachweisen (siehe Abbildung 20). Bei der Rasse Dt. Fleckvieh war der Score MIN2AT mit $p = 0,0502$ nahe der Signifikanzgrenze. Alle anderen p-Werte lagen zwischen 0,1245 (SCWGWT bei FV) und 0,8907 (SCAST bei DA).

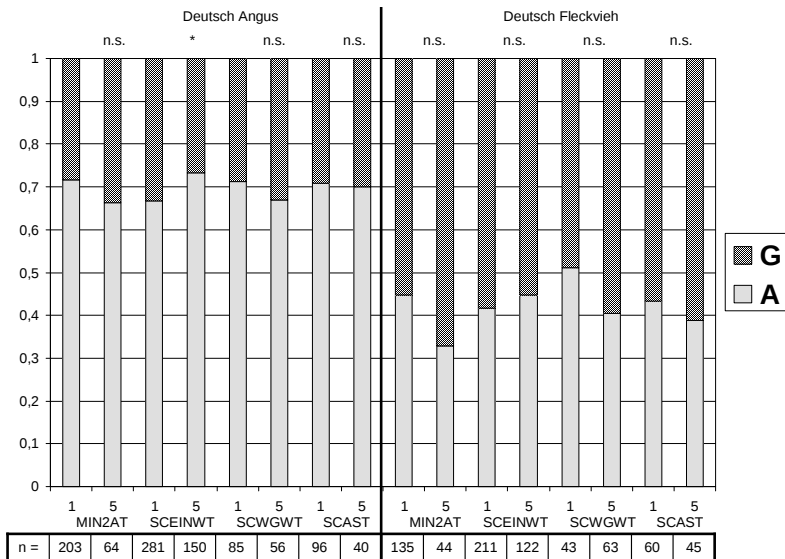


Abbildung 20: Gegenüberstellung der Allelfrequenzen des Nukleotidaustausches im *SERT* bezüglich der Extremwerte der vergebenen Verhaltensscores (1 = ruhig und 5 = extrem nervös/aufgeregt) für die Kälber der Rassen Dt. Angus und Dt. Fleckvieh unter Angabe der Signifikanzen und der Anzahl (n) Kälber der jeweiligen Klassen.

n.s. = nicht signifikant

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

4.2.16 Einfluss des Nukleotidaustausches im *SERT* auf Verhaltensscores mittels Varianzanalyse

Die LSQ-Mittelwerte und Standardfehler der Verhaltensscores unter Einfluss des Genotyps im *SERT* sind in Tabelle 30 aufgeführt. Eine Beeinflussung der Mittelwerte der Scores lässt sich nur für MIN2AT bei Dt. Fleckvieh mit einer Erhöhung des Scores bei Vorliegen von Allel *G* vermuten und ist mit $p = 0,0131$ als signifikant abzusichern. Für alle anderen Scores konnten keine signifikanten Effekte nachgewiesen werden (siehe Tabelle 31).

Tabelle 30: LSQ-Mittelwerte und Standardfehler (in Klammern) der Verhaltensscores für den Effekt des Genotyps im *SERT* (Intron 13) bei den Rassen Dt. Angus und Dt. Fleckvieh.

	MIN2AT		SCEINWT		SCWGWT		SCAST	
	DA	FV	DA	FV	DA	FV	DA	FV
<i>AA</i>	1,90 (0,056)	1,79 (0,124)	1,72 (0,101)	1,79 (0,116)	2,44 (0,122)	2,61 (0,157)	2,27 (0,088)	2,30 (0,152)
<i>GA</i>	2,03 (0,056)	1,94 (0,085)	1,66 (0,101)	1,71 (0,078)	2,45 (0,121)	2,56 (0,120)	2,19 (0,088)	2,44 (0,125)
<i>GG</i>	1,87 (0,128)	2,19 (0,104)	1,67 (0,148)	1,73 (0,096)	2,28 (0,171)	2,57 (0,138)	2,20 (0,134)	2,40 (0,137)

Tabelle 31: Signifikanzniveau des Einflusses des Genotyps im *SERT* auf die Verhaltensscores unter Berücksichtigung der in 4.2.1 genannten Einflussfaktoren.

	Rasse	MIN2AT	SCEINWT	SCWGWT	SCAST
Genotyp <i>SERT</i>	DA	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	FV	*	n.s.	n.s.	n.s.

n.s. = nicht signifikant

* = signifikant bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $5\% = p < 0,05$

4.2.17 Analyse der Mikrosatelliten auf BTA1

Für *BMS1928* wurden die Typisierungsergebnisse für 930 Kälber, das entspricht 96% aller Kälber, ermittelt. Bei *DIK634* wurden 956 Kälber (99%) und bei *BMS574* 944 Kälber (98%) typisiert. Für die Mikrosatelliten *BMS4020* und *DIK4957* konnten jeweils alle 962 Kälber typisiert werden.

Bei den fünf untersuchten Mikrosatelliten zeigten sich bei den Kälbern beider Rassen verschiedene Allele in unterschiedlichen prozentualen Häufigkeiten (siehe Tabelle 32). Dies zeigt sich besonders bei dem Allel 145 von *BMS1928* sowie Allel 234 von *DIK634*, die beide bei Dt. Fleckvieh nicht vorkommen und bei Dt. Angus mit 15,7% bzw. 12,48%. Ähnliches zeigt sich bei Allel 181 von *BMS1928*, welches bei Dt. Fleckvieh mit weniger als 1% vorliegt und bei Dt. Angus mit 10,21%. Umgekehrt verhalten sich die Allelfrequenzen bei Allel 163 von *BMS1928* und Allel 119 bei *BMS4020*. Diese Allele kommen bei FV 10fach (Allel 163, *BMS1928*) bzw. 24fach (Allel 119, *BMS4020*) häufiger als bei DA vor.

Für *BMS1928* zeigt sich bei DA eine Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ($p = 0,025$) und bei FV weicht *BMS4020* mit $p = 0,004$ ab. Bei den anderen Mikrosatelliten befinden sich die Populationen im HWG.

Das Allel mit dem jeweils höchsten prozentualen Anteil wurde als Populationsstandard postuliert, die bei beiden Rassen identisch sind: für *BMS1928* das Allel 161, für *DIK634* das Allel 230, für *BMS574* das Allel 149, für *BMS4020* das Allel 121 und für *DIK4957* das Allel 186.

Tabelle 32: Prozentuale Häufigkeiten der Mikrosatellitenallele von *BMS1928*, *DIK634*, *BMS574*, *BMS4020* und *DIK4957* auf BTA1 für die beiden Rassen und die jeweiligen Standardallele.

Mikrosatellit	Allel	Prozentuale Häufigkeit bei der Rasse	
		DA	FV
<i>BMS1928</i>	143	0,77	0
	145	15,70	0
	151	1,16	0,24
	153	0	0,85
	155	0,29	0
	157	5,11	0,24
	159	8,19	1,22
	161	48,75	40,88
	163	2,89	29,08
	165	0,10	0,97
	167	2,22	13,63
	169	1,06	11,44
	171	0	0,24
	173	0	0,24
	175	0,19	0
	177	0,29	0
	179	0,10	0
	181	10,21	0,85
	183	2,99	0,12
<i>DIK634</i>	226	0,09	0
	228	16,73	3,37
	230	70,70	96,63
	234	12,48	0
<i>BMS574</i>	133	0,19	0
	143	7,72	11,02
	145	2,07	0
	147	22,69	11,14
	149	29,66	58,96
	151	8,10	9,44
	153	29,38	9,44
<i>BMS4020</i>	155	0,19	0
	119	0,83	20,74
	121	99,17	79,26
<i>DIK4957</i>	184	0,09	0
	186	84,86	73,38
	188	14,68	25,90
	190	0,37	0,72

4.2.17.1 Varianzanalyse des Einflusses der Allele der Mikrosatelliten auf BTA1 auf die Verhaltensscores

Bei dieser Analyse zeigten sich insgesamt nur drei Allele von zwei Mikrosatelliten mit einem Einfluss auf die untersuchten Merkmale, alle anderen hatten keinen signifikanten Effekt.

Das Allel 169 des Mikrosatelliten *BMS1928* hatte bei den Tieren der Rasse Dt. Fleckvieh einen signifikanten Einfluss auf den Score während des Wiegens (SCWGWT).

Der Einfluss des Allels 153 des Mikrosatelliten *BMS574* lag sowohl für den Score SCWGWT bei der Rasse Dt. Angus als auch für den vom Handler vergebenen Score des Separier- und Rückhaltetestes (SCAST) bei der Rasse Dt. Fleckvieh nahe der Signifikanzgrenze von 5% (siehe Tabelle 33).

Tabelle 33: Signifikanzniveau der in der Varianzanalyse gegen das Standardallel untersuchten Substitutionseffekte der Allele mit >5% prozentualer Häufigkeit der Mikrosatelliten auf BTA1.

	Allel	MIN2AT		SCEINWT		SCWGWT		SCAST	
		DA	FV	DA	FV	DA	FV	DA	FV
<i>BMS1928</i>	145	n.s.	-	n.s.	-	n.s.	-	n.s.	-
	157	n.s.	-	n.s.	-	n.s.	-	n.s.	-
	159	n.s.	-	n.s.	-	n.s.	-	n.s.	-
	163	-	n.s.	-	n.s.	-	n.s.	-	n.s.
	167	-	n.s.	-	n.s.	-	n.s.	-	n.s.
	169	-	n.s.	-	n.s.	-	0,0099*	-	n.s.
	183	n.s.	-	n.s.	-	n.s.	-	n.s.	-
<i>DIK634</i>	228	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	234	n.s.	-	n.s.	-	n.s.	-	n.s.	-
<i>BMS574</i>	143	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	147	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	151	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	153	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,0127 ^a	n.s.	n.s.	0,0128 ^a
<i>BMS4020</i>	119	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>DIK4957</i>	188	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

- = Allele in dieser Rasse mit <5 % prozentualer Häufigkeit und deswegen nicht separat berücksichtigt

n.s. = nicht signifikant nach Bonferroni-Korrektur (0,05/Anzahl getesteter Allele)

* = signifikant bei einem Signifikanzniveau von 5% nach Bonferroni-Korrektur (0,05/3 = 0,017)

a = nahe Signifikanzgrenze von 5% nach Bonferroni-Korrektur (0,05/4 = 0,0125)

Die Allelsubstitutionseffekte mit Standardfehlern für diese Allele auf die entsprechenden Merkmale sind in Tabelle 34 aufgeführt.

Tabelle 34: Allelsubstitutionseffekte mit Standardfehlern der Allele nahe der Signifikanzgrenze mit dem entsprechenden Merkmal und der Rasse.

Rasse	Marker	Allel	Merkmal	Allelsubstitutionseffekt	Standardfehler
FV	<i>BMS1928</i>	169	SCWGWT	- 0,3013	0,1162
FV	<i>BMS574</i>	153	SCAST	0,2751	0,1106
DA	<i>BMS574</i>	153	SCWGWT	0,2179	0,08717

4.2.18 Analyse der Mikrosatelliten auf BTA29

Die Typisierbarkeit der Mikrosatelliten auf BTA29 lag zwischen 88 und 99% aller analysierten Kälber (siehe Tabelle 35). Das Vorkommen und die Häufigkeiten der Allele unterschieden sich zwischen beiden Rassen. Bei den Mikrosatelliten *BMS1787*, *MNB-127*, *MNB-109*, *OarHH22*, *BMC1206*, *ILSTS081*, *BMS1948* und *MNB-101* differierten auch die in jeder Rasse am häufigsten vorkommenden Allele (siehe Tabelle 35).

Nur einer der eingesetzten Bullen war in allen zuerst analysierten zehn Markern heterozygot, die anderen Bullen hatten zwischen fünf und acht heterozygote Marker. Bei den vier später typisierten Mikrosatelliten gab es zwei Bullen ohne weitere heterozygote Marker und die anderen Bullen hatten zwischen einem und drei Marker heterozygot. Der Mikrosatellit *DIK5057* fiel durch das primäre homozygote Vorliegen von Allel 226 auf. Nur ein Bulle war bei diesem Marker heterozygot, was sich auch in den Allelfrequenzen der Kälber widerspiegelt (siehe Tabelle 35).

Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht lag bei einem Großteil der Mikrosatelliten bei den Kälbern beider Rassen vor. Abweichungen hiervon zeigten sich bei Deutsch Angus bei *BMS764* ($p = 0,006$) und bei *ILSTS081* ($p = 0,0001$). Bei Deutsch Fleckvieh konnten für *BMS1787* ($p = 0,016$), *MNB-109* ($p = 0,005$), *BMS1948* ($p = 0,026$), *DIK4499* ($p = 0,019$) und *DIK5057* ($p = 0,029$) Abweichungen von dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht detektiert werden.

Tabelle 35: Prozentuale Häufigkeiten der Mikrosatellitenallele von BTA29 innerhalb der beiden Rassen mit prozentualer Angabe der erfolgreichen Typisierungen für jeden Mikrosatellit über beide Rassen hinweg.

Mikrosatellit (erfolgreiche Typisierungen)	Allel	Prozentuale Häufigkeit bei der Rasse		Mikrosatellit (erfolgreiche Typisierungen)	Allel	Prozentuale Häufigkeit bei der Rasse	
		DA	FV			DA	FV
<i>BMS1857</i> (88%)	146	0	0,82	<i>MNB-127</i> (99%)	217	0	1,69
	150	0	1,50		219	9,96	23,12
	152	15,59	4,63		227	61,15	27,00
	154	5,57	2,32		229	25,23	43,22
	156	0,71	4,22		231	3,38	4,60
	158	2,73	13,62		233	0,27	0,36
	160	45,65	48,50	<i>MNB-145</i> (99%)	164	0	0,36
	162	6,78	6,68		166	61,60	71,58
	164	20,24	5,18		168	0,09	0
	166	0,51	5,45		172	20,99	11,51
	168	0,10	0,68		174	8,84	12,59
	170	0,10	0,68		176	0,83	0,72
	172	0,40	0,14		178	7,37	3,24
	176	0,20	4,50		180	0,28	0
	178	1,32	1,09		178	20,82	30,54
	180	0,10	0		180	0,19	0
<i>BMS764</i> (98%)	096	18,70	5,34	<i>MNB-109</i> (97%)	188	3,25	4,80
	100	19,26	19,05		190	2,70	28,82
	102	5,28	0,61		192	44,80	21,80
	104	22,13	15,17		194	3,07	0
	106	26,57	46,48		196	0,09	3,20
	108	6,20	7,16		198	18,22	0,12
	110	1,85	4,85		200	6,41	10,71
	112	0	1,33		208	0,46	0
<i>BMS1787</i> (96%)	148	0	4,52	<i>OarHH22</i> (94%)	105	6,03	0,13
	156	0,66	15,20		107	0,09	0
	158	4,14	14,32		109	0,38	0
	160	50,56	17,96		111	7,34	10,76
	162	15,98	10,93		113	33,71	49,48
	164	2,91	30,40		115	49,15	30,58
	166	6,02	0,50		119	0,09	0,26
	168	14,76	1,01	<i>BMC1206</i> (98%)	121	3,2	8,79
	170	0,28	4,27		126	0,55	0,98
	172	4,51	0,13		128	6,15	3,66
<i>ILSTS089</i> (99%)	174	0,19	0,75		130	28,81	55,24
	135	0	0,24		132	62,75	35,98
	137	0	0,48		134	0,55	0
	139	62,11	76,27		136	1,19	4,02
	141	12,75	0,24		138	0	0,12
	145	0,28	0	<i>ILSTS081</i> (96%)	090	0	0,12
	147	22,75	11,26		094	0	0,12
	149	0,09	4,72		098	11,24	17,73
	151	0,83	1,21		100	17,33	38,79
	153	0	1,82		102	18,48	6,16
	155	0	3,75		104	36,95	27,96
	157	0,37	0		106	5,43	6,77
	159	0,18	0		108	8,67	0,12
	165	0,64	0		110	1,71	0
<i>BMS1948</i> (93%)	099	4,25	13,91		112	0	0,37
	111	0,29	1,97	<i>MNB-101</i>	118	0	1,35
	115	20,66	32,41		149	0,46	0,62
	117	1,83	4,07		151	66,61	30,79

Fortsetzung Tabelle 35:

Mikrosatellit (erfolgreiche Typisierungen)	Allel	Prozentuale Häufigkeit bei der Rasse		Mikrosatellit (erfolgreiche Typisierungen)	Allel	Prozentuale Häufigkeit bei der Rasse	
		DA	FV			DA	FV
<i>BMS1948</i> (93%)	119	28,09	13,39	<i>MNB-101</i> (98%)	157	0	0,99
	121	1,06	13,39		159	0	0,12
	123	43,24	20,21		161	19,19	66,26
	125	0,58	0,66		163	1,85	0,74
<i>DIK4499</i> (96%)	207	2,06	22,83		165	11,62	0,37
	209	70,65	42,47		167	0,28	0,12
	211	21,03	34,44	<i>DIK5057</i> (93%)	226	99,90	94,42
	213	6,26	0		228	0,10	5,45
	215	0	0,26		236	0	0,13

4.2.19 Kartierung des *DRD4*-Gens auf BTA29

In die genetische Kartierung des *DRD4* wurden die Typisierungen aller Kälber mit Müttern und Vätern der ersten zehn Mikrosatelliten auf BTA29 (29-1 bis 29-10) und des Guanin-Thymin-Austausches im *DRD4* einbezogen. Die mithilfe dieser Mikrosatelliten errechnete Lokalisation wurde durch die weiteren Mikrosatelliten (29-11 bis 29-14) in einem anschließenden Arbeitsschritt näher beschrieben.

Wie Tabelle 36 zu entnehmen ist, differierte der Anteil informativer Meiosen aller Mikrosatelliten auf BTA29 zwischen 3 und 927. Der Polymorphic Information Content (PIC) der Mikrosatelliten variierte bei DA von 0,002 (*DIK5057*) bis 0,777 (*ILSTS081*) und bei FV von 0,100 (*DIK5057*) bis 0,792 (*BMS1787*). Aufgrund des geringen PIC wurde der Marker *DIK5057* in den weiteren Analysen nicht berücksichtigt.

Tabelle 36: Anteil der informativen Meiosen der Mikrosatelliten auf BTA29 bei beiden Rassen und der Polymorphic Information Content (PIC) der einzelnen Marker.

Lfd. Nr.	Mikrosatellit	Dt. Angus		Dt. Fleckvieh	
		Informative Meiosen	PIC	Informative Meiosen	PIC
29-1	<i>BMS1857</i>	660	0,684	501	0,711
29-2	<i>BMS764</i>	927	0,772	525	0,681
29-3	<i>BMS1787</i>	613	0,689	621	0,792
29-4	<i>ILSTS089</i>	540	0,492	266	0,382
29-5	<i>MNB-127</i>	714	0,494	530	0,628
29-6	<i>MNB-145</i>	606	0,518	359	0,425
29-7	<i>MNB-109</i>	597	0,679	506	0,723
29-8	<i>OarHH22</i>	886	0,635	341	0,583
29-9	<i>BMC1206</i>	372	0,520	419	0,481
29-10	<i>ILSTS081</i>	789	0,777	653	0,689
29-11	<i>BMS1948</i>	543	0,690	525	0,769
29-12	<i>DIK4499</i>	346	0,403	376	0,575
29-13	<i>DIK5057</i>	3	0,002	64	0,100
29-14	<i>MNB-101</i>	373	0,506	392	0,383

Mit Hilfe der zehn Mikrosatelliten 29-1 bis 29-10 konnte *DRD4* in der Karte über beide Rassen und in jeder Rasse am distalen Ende von BTA29 kartiert werden. (siehe Abbildung 21).

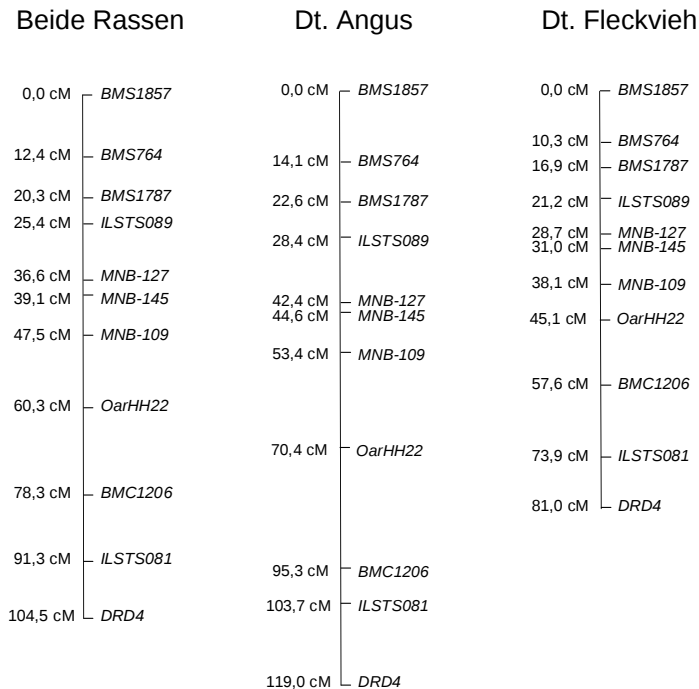


Abbildung 21: Kartierung von *DRD4* mittels zehn Mikrosatellitenmarkern auf BTA29 (29-1 – 29-10) in beiden Rassen getrennt und über beide Rassen hinweg. Die Lokalisationsangaben sind in centiMorgan (cM) auf der jeweils linken Seite angegeben, davon ausgehend, dass *BMS1857* der proximalste Marker bei 0 cM ist und die Markernamen sind auf der jeweils rechten Seite angeschrieben.

In der weiteren Analyse wurde der distale Abschnitt von Chromosom 29 mit insgesamt fünf Mikrosatelliten für die detailliertere *DRD4*-Lokalisationsbeschreibung untersucht. Dies waren *BMC1206* (29-9), *BMS1948* (29-11), *DIK4499* (29-12), *ILSTS081* (29-10) und *MNB-101* (29-14), die auch in dieser Reihenfolge auf BTA29 angeordnet sind. Mittels der Funktion *all* wurde *DRD4* bei der Rasse Dt. Angus hinter *MNB-101* angeordnet. Bei der Rasse Dt. Fleckvieh dagegen vor *MNB-101*. Entsprechend konnte über beide Rassen hinweg keine exakte Lokalisation berechnet werden und die log10-likelihood-Werte lagen sehr dicht beieinander. Für die Lokalisation vor *MNB-101* ergab sich ein Wert von -298,907 und für die

Lokalisation hinter *MNB-101* ein Wert von $-296,832$. Die danach berechneten Karten für das gesamte Chromosom mit allen 14 Markern wurden dementsprechend nur innerhalb der Rassen durchgeführt und sind in Abbildung 22 dargestellt. Aufgrund des insgesamt höheren Informationsgehaltes des deutlich vergrößerten Datenmaterials im Vergleich zu den Karten mit zehn Markern sind geringgradige Änderungen in den Gesamtkartenlängen und in den Abständen einiger Marker zu erkennen.

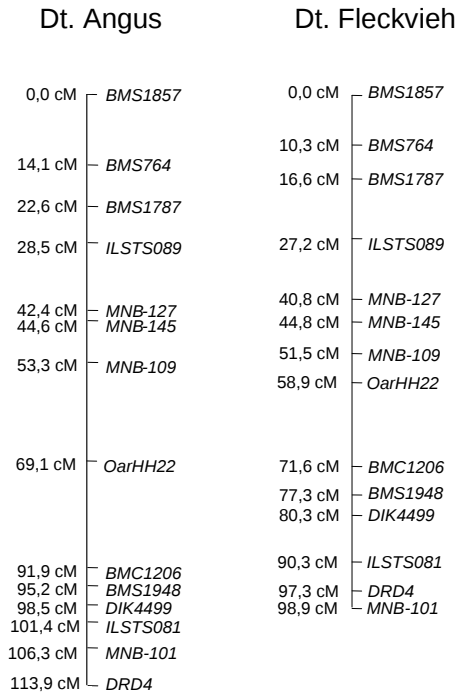


Abbildung 22: Kartierung von *DRD4* mittels 14 Mikrosatellitenmarkern auf BTA29 (29-1 – 29-14) mit einer detaillierteren Auftrennung des distalen Abschnittes in beiden Rassen getrennt. Die Lokalisationsangaben sind in centiMorgan (cM) auf der jeweils linken Seite angegeben, davon ausgehend, dass *BMS1857* der proximalste Marker bei 0 cM ist und die Markernamen sind auf der jeweils rechten Seite angeschrieben.

4.2.20 QTL-Analysen für Verhaltensscores auf BTA1 und BTA29

Die QTL-Analysen auf BTA1 (*BMS1928*, *DIK634*, *BMS574*, *BMS4020*, *DIK4957*) für die vier Verhaltensscores ergaben bei Deutsch Fleckvieh als Signifikanzgrenze mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % geltende F-Werte zwischen 1,95 und 2,41. Bei Deutsch Angus lagen diese Grenzwerte zwischen 2,29 und 2,41. In keiner der durchgeführten Analysen erreichte der ermittelte F-Wert für eine QTL-Position den Grenzwert und somit konnten auf BTA1 in beiden Rassen keine QTL für die Verhaltensscores detektiert werden. Dennoch wurden zur vollständigen Analyse die Berechnungen auch innerhalb der 14 einzelnen Familien durchgeführt. Auch hier konnte kein QTL identifiziert werden. Eine graphische Darstellung der errechneten F-Werte der einzelnen Positionen von BTA1 für die vier Scores ist in Abbildung 23 bei Dt. Angus und in Abbildung 24 bei Dt. Fleckvieh dargestellt. Zur besseren Übersichtlichkeit wurde als Signifikanzgrenze von $p = 0,05$ der Durchschnittswert aller vier F-Werte angegeben.

Für die QTL-Analysen auf BTA29 mit den zehn Mikrosatelliten (29-1 bis 29-10) ergaben sich als Signifikanzgrenze mit $p = 0,05$ F-Werte von 2,56 bis 2,80 bei Deutsch Angus und 2,30 bis 2,86 bei Deutsch Fleckvieh. Bei Durchführung der Analyse in den 14 Halbgeschwisterfamilien variierten die als signifikant geltenden F-Werte zwischen 5,08 und 12,78. Bei der Analyse innerhalb der einzelnen Familien konnten keine signifikanten QTL nachgewiesen werden.

Bei der QTL-Analyse auf BTA29 innerhalb der Rasse Dt. Angus wurde für das Merkmal SCEINWT des Wiegetestes die Signifikanzgrenze von 2,56 bei 14 cM (entspricht der Lokalisation von *BMS764*) mit einem F-Wert von 2,54 fast erreicht (Abbildung 25). Das Konfidenzintervall (CI95%) für diese Lokalisation ist 0 – 95 cM.

Bei FV konnte ebenfalls bei *BMS764* (in der FV-Karte bei 10 cM) bei dem Merkmal SCWGWT der höchste F-Werte ($F = 2,22$) errechnet werden, der jedoch deutlicher unterhalb der Signifikanzgrenze ($F = 2,33$) blieb. Hier ergibt sich ein CI95% von 0 – 74 cM. Am distalen Ende der Karte, bei ca 74 cM, steigen die F-Werte desselben Merkmales auch wieder auf 2,16 an (Abbildung 26).

Die errechneten F-Werte für die einzelnen Positionen von BTA29 sind in Abbildung 25 bei DA und Abbildung 26 bei FV als Diagramme beispielhaft für die Berechnung innerhalb der beiden Rassen dargestellt. In Abbildung 25 wurde als Signifikanzgrenze der als signifikant geltende F-Wert des Scores SCEINWT für den dort detektierten putativen QTL eingezeichnet. Bei FV wurde in Abbildung 26 aufgrund nicht nachweisbarer QTL und zur besseren Übersichtlichkeit der Durchschnittswert der als signifikant geltenden F-Werte angegeben.

Die Signifikanzen der in das Model eingeflossenen Faktoren sind in Kapitel 4.2.1 dargestellt.

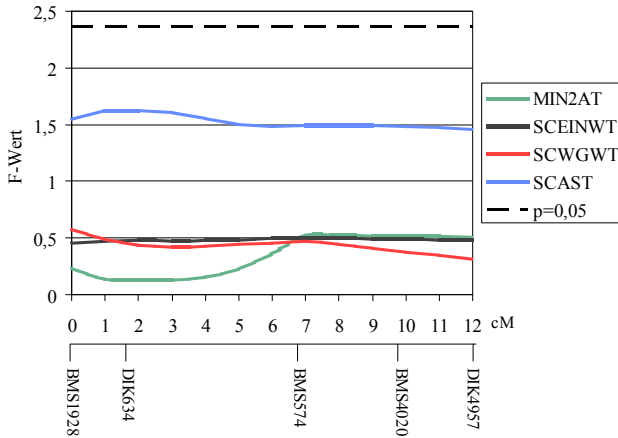


Abbildung 23: Graphische Darstellung der Ergebnisse der QTL-Analyse der Mikrosatelliten auf BTA1 mit relativen Lokalisationsangaben auf der X-Achse und Angabe des erreichten F-Wertes auf der Y-Achse für jeden Mikrosatelliten und die Verhaltensscores MIN2AT, SCEINWT, SCWGWT und SCAST sowie Kennzeichnung des 5%-Signifikanzniveaus für die Rasse Dt. Angus.

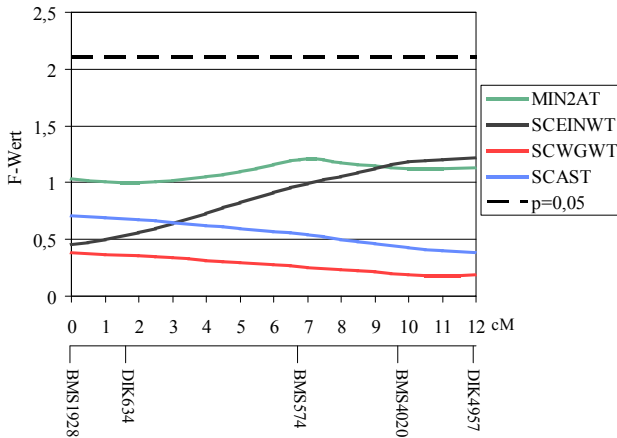


Abbildung 24: Graphische Darstellung der Ergebnisse der QTL-Analyse der Mikrosatelliten auf BTA1 mit relativen Lokalisationsangaben auf der X-Achse und Angabe des erreichten F-Wertes auf der Y-Achse für jeden Mikrosatelliten und die Verhaltensscores MIN2AT, SCEINWT, SCWGWT und SCAST sowie Kennzeichnung des 5%-Signifikanzniveaus für die Rasse Dt. Fleckvieh.

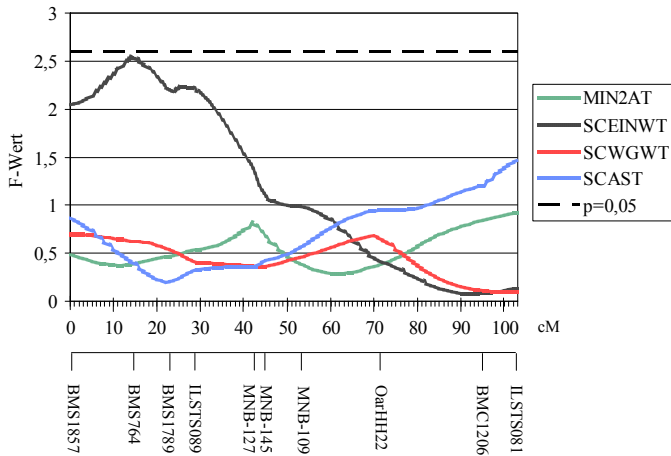


Abbildung 25: Graphische Darstellung der Ergebnisse der QTL-Analyse der Mikrosatelliten 29-1 bis 29-10 auf BTA29 mit relativen Lokalisationsangaben der eigenen Karte (Abbildung 21) auf der X-Achse und Angabe des erreichten F-Wertes auf der Y-Achse für jeden Mikrosatelliten und die Verhaltensscores MIN2AT, SCEINWT, SCWGWT und SCAST sowie Kennzeichnung des 5%-Signifikanzniveaus für die Rasse Dt. Angus.

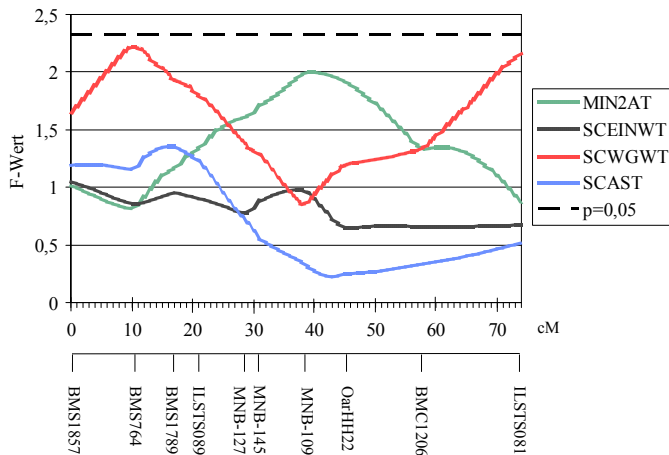


Abbildung 26: Graphische Darstellung der Ergebnisse der QTL-Analyse der Mikrosatelliten auf BTA29 mit relativen Lokalisationsangaben der eigenen Karte (Abbildung 21) auf der X-Achse und Angabe des erreichten F-Wertes auf der Y-Achse für jeden Mikrosatelliten und die Verhaltensscores MIN2AT, SCEINWT, SCWGWT und SCAST sowie Kennzeichnung des 5%-Signifikanzniveaus für die Rasse Dt. Fleckvieh.

5 Diskussion

Zur molekulargenetischen Charakterisierung des Verhaltens von Kälbern wurden in dieser Arbeit zwei verschiedene Ansätze parallel verfolgt. Zum Einen die Analyse funktioneller Kandidatengene hinsichtlich einzelner Nukleotidaustausche und zum anderen die Analyse von Mikrosatelliten mit Assoziationsstudien und QTL-Analysen. Zusätzlich wurde das bis dato beim Rind nicht kartierte Gen des Dopaminrezeptors D4 genetisch kartiert.

Die Auswahl geeigneter Kandidatengene für Verhaltensmerkmale bei Kälbern gestaltete sich schwierig, da das Verhalten ein multifaktorielles Merkmal darstellt (Andersson und Georges 2004) und sowohl durch Gene und Umweltfaktoren als auch verschiedene Interaktionen der Faktoren beeinflusst wird (Mormède 2005). Beim Menschen wird vermutet, dass ca. 250 Gene in irgendeiner Weise eine Auswirkung auf Verhalten haben (Fuchs 2003). Bei Tieren gibt es keine diesbezüglichen Angaben.

Das Verhalten bzw. das dem Verhalten zugrunde liegende Temperament bei Tieren hat eine genetische Komponente bzw. ist rasseabhängig (Gauly *et al.* 2001; Niimi *et al.* 1999), was auch in den vorhergehenden und hier zugrundeliegenden Arbeiten im Rahmen der Testdurchführungen festgestellt wurde (Mathiak 2002; Urban 2007). In diesen Arbeiten wurden auch Geschlechtsunterschiede im Verhalten nachgewiesen, die auch bei Pferden bestätigt sind (Oki *et al.* 2007). Aber auch Umwelteinflüsse und Erfahrungen beeinflussen das Verhalten stark (Caspi *et al.* 2002; Newman *et al.* 2005). Beim Menschen konnte nachgewiesen werden, dass das aus negativen Erfahrungen resultierende Verhalten abhängig davon ist, in welchem Alter diese Erfahrungen gemacht wurden (Caspi *et al.* 2002). Dies ist mit großer Wahrscheinlichkeit beim Tier ähnlich und bei Rindern auch für reguläre Verhaltensweisen (nicht unbedingt negative Erfahrungen) nachgewiesen (Becker und Lobato 1997; Boissy und Bouissou 1988). Bei vielen Verhaltensweisen von Tieren lässt sich auch nicht genau sagen, aus welcher Grundintention oder Motivation heraus diese geschehen (Grandin 2005), was die Auswahl der physiologischen und biochemischen Vorgänge zur Eingrenzung der Kandidatengene in dieser Arbeit erschwerte. Ein klassisches Beispiel dafür ist der beißende Hund, der sowohl aus Aggression als auch aus Dominanzgehab oder aus Angst heraus beißen kann (Zimen 1997). Das augenscheinliche Verhalten ist in jedem Falle dasselbe, aber mit unterschiedlicher Motivation und verschiedenen biochemischen Vorgängen im Hintergrund. Auch ist die objektive Beurteilung von Verhalten und das Vergeben von neutralen Scores oft nicht möglich, da jeder Handler andere Erfahrungen und andere Grenzen beim Umgang mit Tieren hat (Andersson 2001). Die in der Literatur primär auffindbaren

Verhaltensstudien beschäftigen sich in der Regel mit Labortieren und klar strukturierten Aufgaben bzw. eindeutigen Testsituationen für die Tiere (Flint 2003; Mormède *et al.* 2002). Bei anderen Spezies wie Pferd (Oki *et al.* 2007) und Hund (Niimi *et al.* 2001; Niimi *et al.* 1999) erfolgt die Verhaltenserfassung durch Mithilfe der Besitzer und Trainer, wobei dann auch wieder eine gewisse Subjektivität eine Rolle spielt. Für Rinder in der Mutterkuhhaltung gibt es diesbezüglich nicht sehr viele aktuelle Untersuchungen. Allerdings wurden für Kälber verschiedene Verhaltenstests mit Scorevergabe durch den Handler etabliert (Gauly *et al.* 2002; Gauly *et al.* 2001; Mathiak 2002; Urban 2007), deren Ergebnisse auch in dieser Arbeit genutzt wurden. Allerdings konnte in diesen Studien nicht geklärt werden, aus welcher Motivation heraus sich Kälber wie verhalten. Allerdings zeigten sich Korrelationen im höheren Bereich (0,49 bis 0,89) zwischen den Scores der Tests (Urban 2007), obwohl die verschiedenen Tests unterschiedliche Situationen simulieren. Diese in der Forschung mit Rindern noch nicht geklärten Aspekte erschwerten die für diese Arbeit notwendige Auswahl funktioneller Kandidatengene. Aufgrund dessen wurden die Gene anhand der humanen Genforschung ausgewählt. Es wurden Gene ausgewählt, die mit Erkrankungen, die Verhaltensänderungen auslösen und/oder mit Ergebnissen psychologischer Verhaltenstests in Verbindung stehen. Dies waren das Gen des Cholecystokininrezeptors B (*CCKBR*), des Dopaminrezeptors D4 (*DRD4*), der Monoaminoxidase A (*MAOA*) und des Serotonintransporters (*SERT*). Jedes der vier Gene spielt in einer der humanen Temperamentdimensionen (Cloninger 1987; Keltikangas-Jarvinen *et al.* 2003) eine Rolle, um die gesamte Bandbreite abzudecken und eine funktionell sinnvolle Grundlage zu schaffen.

In den vier Kandidatengenen wurden ausgewählte Exon- und Intron- sowie UTR-Abschnitte analysiert, die aufgrund der Literatur bei andern Spezies vielversprechend waren. Die Analyse hinsichtlich des Auftretens von Polymorphismen geschah mittels Sequenzanalyse.

Die Darstellung der identifizierten Polymorphismen im Tiermaterial erfolgte mit zwei verschiedenen Methoden. Zum Einen die häufig angewandte PCR-RFLP-Analyse, eine gängige und relativ schnell durchführbare Methode (Saiki *et al.* 1985), die aus zwei Arbeitsschritten besteht. Als erstes die Durchführung der PCR mit Kontrolle durch Agarosegelelektrophorese und daran anschließend die Inkubation der PCR mit einem Enzym und erneute Agarosegelelektrophorese der Fragmente mit Genotypisierung anhand dieser. Zum Anderen wurden Tetra-Primer ARMS-PCR-Analysen entwickelt. Diese neuere Abwandlung der PCR und bisher seltener angewandte Methode (Sharma *et al.* 2006; Ye *et al.* 2001) stellt sich noch effizienter als die PCR-RFLP-Analyse dar, da nur ein Arbeitsschritt

nötig ist und mit der Agarosegelelektrophorese der PCR sofort die Genotypisierung möglich ist, was diese Methode auch kostengünstiger macht. Zudem ist es eine schnellere Methode, da die Inkubationszeit des Enzymes wegfällt. Allerdings kann die Etablierungsphase einer solchen PCR, in der sich mit vier Primern insgesamt drei Paare bilden können, langwieriger sein als die einer regulären PCR mit nur einem Primerpaar. Es konnte jedoch in dieser Arbeit an zwei Beispielen gezeigt werden, dass die Etablierung einer solchen Analyse durchaus möglich ist und somit auch schnell verfügbare Typisierungen der Tiere vorlagen. Aufgrund des besseren Kosten- und Zeitfaktors sollte diese Methode durchaus öfter angewandt werden. In dieser Arbeit konnte für zwei Nukleotidaustausche eine Tetra-Primer ARMS-PCR für die routinemässige Typisierung etabliert werden und die drei weiteren Nukleotidaustausche wurden mittels PCR-RFLP typisiert.

Das Gen des CCKBR ist beim Rind bisher sehr wenig untersucht. In der Genbank finden sich nur zwei mRNA-Sequenzen (Genbank-Nr. BC112800 und NM_174262) und 21 SNPs ohne weitere Beschreibung über das gesamte Gen verteilt. Im *CCKBR* wurden in humanen Studien in vielen verschiedenen Abschnitten Polymorphismen nachgewiesen, ohne dass einer besonders hervorgehoben wurde (Hattori *et al.* 2001). Aufgrund der bekannten Transkriptionsprodukte wurde in dieser Arbeit das Exon III bis Exon IV analysiert, da diese für insgesamt drei transmembranäre Domänen und einen Teil des intraplasmatischen Loops codieren. Zusätzlich erfolgte eine Analyse der 3'UTR, da zu dieser auch eine humane Untersuchung vorlag (Yamada *et al.* 2001) und die Gensequenz beim Rind eindeutig zuordbar war. So konnten in diesem Tiermaterial zwei neue SNPs mit Cytosin-Thymin-Austauschen dargestellt werden. Einer befindet sich an Position 131 in Intron 3 und ein weiterer an Position 457 der 3'UTR.

Die Amplifikation des *DRD4* beim Rind stellte sich aus bisher ungeklärten Gründen als sehr schwierig dar, was auch durch die geringe Anzahl der in der Genbank veröffentlichten Sequenzen (Genbank-Nr. AB069666 und AY263349) deutlich wird. Auch das Exon III, der im humanen *DRD4* am häufigsten untersuchte Bereich, welcher sogar in der bovinen Genbanksequenz AB069666 veröffentlicht ist, ließ sich nicht amplifizieren. In diese Versuche wurden auch DNA-Proben anderer Rinderrassen, um eventuelle Besonderheiten bei Dt. Angus und Dt. Fleckvieh auszuschließen, einbezogen. Die Ursachen für diese eigenen Fehlschläge sind bisher ungeklärt. In der SNP-Datenbank finden sich keinerlei Einträge anderer Arbeitsgruppen zum Rind und *DRD4*. Eventuell spielen hier in der Entwicklungs-

geschichte zurückliegende Robertson'sche Translokationen eine Rolle, da diese in den meisten Fällen BTA1 und BTA29 betreffen (Brem *et al.* 1991). Der hier identifizierte Nukleotidaustausch konnte auch nur über Sequenzvergleiche mit anderen Spezies (*Homo sapiens* und *Equus caballus*) und nicht mit *Bos taurus* zugeordnet werden (siehe Abbildung 2). Für die Zuordnung wurde im Rahmen dieser Arbeit eine genetische Kartierung des detektierten SNP durchgeführt und dieses *DRD4*-Fragment auf BTA29 lokalisiert.

Das bovine *MAOA* liegt in der Genbank mit zwei identischen mRNA Sequenzen (NM_181014 und BC122682) vor und ist in der WGS lokalisiert (NW_001508811). In der SNP-Datenbank des NCBI sind sieben Einträge vorhanden. Davon beschreiben fünf SNPs in Intron 1 und 3 und der 3'UTR und zwei Einträge beziehen sich auf SNPs im Exon XV. Einer dieser (rs41626734) ist der auch hier untersuchte. Allerdings wurde dieser im Rahmen der standardmäßigen Genomsequenzierung und nicht im Zusammenhang mit einem bestimmten Projekt identifiziert und durch das Human Genome Sequencing Center in die Datenbank eingestellt.

Für den bovinen Serotonintransporter ist die Situation eine andere, hier sind keine SNPs in der Datenbank zu finden und nur zwei mRNA-Sequenzen veröffentlicht (Genbank-Nr. AF119122 und NM_174609), die allerdings aus derselben Arbeitsgruppe (Mortensen *et al.* 1999) stammen und identisch sind. Die eigene Analyse wurde aufgrund dessen über den Weg des Sequenzvergleiches zwischen humanen *SERT*-Sequenzen und Gesamtsequenz des Rindes durchgeführt. Aufgrund der Literatur ist der humane Promotorbereich der am vielversprechendste Abschnitt für die Analyse hinsichtlich Polymorphismen für Verhaltensmerkmale. Bei diesen Vergleichen zeigte sich eine Übereinstimmung des humanen Promotors mit Intron 13 des bovinen *SERT*, woraufhin dieser Abschnitt analysiert wurde. Da die tatsächliche Lokalisation des Promotors beim Rind unbekannt ist, aber die Lage im Intron 13 unwahrscheinlich erschien, wurde zusätzlich aus der 5'UTR ein Abschnitt analysiert, da sich beim regulären Genaufbau der Promotor vor der codierenden Region befinden würde (Geldermann 2005). Dieser Abschnitt stellte sich in unserem Tiermaterial aber monomorph dar.

Zur Assoziationsanalyse wurden bei allen SNPs zunächst die Allelfrequenzen zwischen den Tieren mit den Extremwerten der vergebenen Scores mittels Chi²-Test verglichen. Die Verwendung der Extremwerte ist schon bei Darvasi und Soller (1994) beschrieben und diente dazu, eine mögliche Assoziation bei offensichtlich sich stark unterschiedlich verhaltenden

Tieren darzustellen. Dieser Vorteil der Gegenüberstellung der extremen Verhaltensweisen führt allerdings auch zu einer Reduktion der Tierzahlen, wie Tabelle 37 zu entnehmen ist. Dies kann eine verringerte Aussagefähigkeit nach sich ziehen.

Tabelle 37: In der χ^2 -Analyse berücksichtigte Tierzahlen der jeweiligen Extremwerte der Scores.

Score	Extreme	Dt. Angus		Dt. Fleckvieh	
		n	% der Gesamtanzahl	n	% der Gesamtanzahl
MIN2AT	1	204	37	135	32
	4+5	66	12	45	11
SCEINWT	1,0	287	53	212	51
	2,5+3,0+4,0	150	28	122	29
SCWGWT	1	85	16	43	10
	4+5	56	10	63	15
SCAST	1	97	18	60	14
	4+5	42	7	45	11

Weiterhin stellt sich das Problem, dass in den χ^2 -Test keinerlei weitere das Verhalten oder die Bewertung beeinflussenden Faktoren (zwei Handler in den vier Jahren) berücksichtigt werden können. Eine Beeinflussung des Verhaltens durch umweltbedingte Faktoren wie zum Beispiel Alter und damit verbundene Erfahrungen (Boissy und Bouissou 1988) sowie die Stabilisierung der Persönlichkeit (Visser *et al.* 2001) und genetischen Faktoren wie zum Beispiel die Rasse (Grandin 1997) ist allerdings bekannt. Dem Einflussfaktor Rasse wurde durch eine Auswertung innerhalb der beiden Rassen begegnet. Des Weiteren sind Geschlechtseinflüsse auf das Verhalten bekannt, wobei die weiblichen Kälber schwieriger zu handeln sind als männliche (Gauly *et al.* 2001). Da all diese Faktoren mit dem χ^2 -Test nicht berücksichtigt werden können, dient dieser nur als erste Hilfestellung bzw. Hinweis auf mögliche Assoziationen. Zur endgültigen Auswertung mit Berücksichtigung aller Einflüsse wurden Varianzanalysen durchgeführt, in die die bekannten und über alle vier Jahrgänge erfassten Faktoren mit signifikanten Effekten (siehe Tabelle 16) einfließen. Dies waren das Geschlecht, das Jahr der Testdurchführung stellvertretend für den Handler, der Vater des Kalbes sowie das Alter zum Zeitpunkt des Testes. Das Jahr der Testdurchführung und der Handler sind statistisch nicht zu trennen und der festgestellte Jahreseffekt ist möglicherweise auf den Handler zurückzuführen.

Zwischen den Ergebnissen der beiden Analysen für jeden Polymorphismus, χ^2 -Test und Varianzanalyse, ließen sich bezüglich auftretender Signifikanzen des Geneinflusses auf die Verhaltensscores Unterschiede nachweisen (siehe Tabelle 38). Allerdings ist im Vergleich der

unterschiedlichen Ergebnisse auch zu sehen, dass einige der als signifikant eingestuften Assoziationen nur sehr knapp unter der 5%-Signifikanzgrenze liegen, wie zum Beispiel der Einfluss des *CCKBR* (Intron 3) Polymorphismus auf den Score während des Wiegens (SCWGWT) bei Dt. Angus mit einem p-Wert von 0,0431 beim χ^2 -Test. Umgekehrt befindet sich allerdings nur einer der nicht signifikanten Assoziationen in diesem Bereich, der p-Wert des χ^2 -Testes bei Dt. Fleckvieh und dem *SERT* (Intron 13) Polymorphismus in Verbindung mit dem Score des Anbinde testes (MIN2AT) mit einem Wert von 0,0502. Diese knapp erreichten Signifikanzen können durchaus auch zufällig aufgetreten sein. Nur der *SERT* (Intron 13) Polymorphismus in Bezug auf MIN2AT bei Dt. Fleckvieh könnte als möglicher genetischer Einfluss gewertet werden, da dieser in beiden Analysen signifikant bzw. nahe der Signifikanzgrenze ist und sich bei den LSQ-Mittelwerte entsprechende Tendenzen erkennen lassen (siehe Tabelle 30). Allerdings befinden sich die Vergleichswerte bei Dt. Angus nicht nahe der 5%-Signifikanzgrenze ($p = 0,1906$ bei Varianzanalyse).

Tabelle 38: Vergleich der p-Werte der in einer der beiden Analysen (χ^2 -Test und Varianzanalyse) signifikanten Assoziation für die Polymorphismen der Kandidatengene *CCKBR*, *DRD4* und *SERT* mit den entsprechenden Merkmalen in den jeweiligen Rassen.

Polymorphismus	Rasse	Score	Chi ² -Test		Varianzanalyse	
			p-Wert	Signifikanz	p-Wert	Signifikanz
<i>CCKBR</i> (Intron 3)	DA	SCWGWT	0,0431	*	0,8359	n.s.
	FV	MIN2AT	0,3145	n.s	0,0384	*
<i>DRD4</i> (Intron 1)		SCAST	0,0158	*	0,2738	n.s.
	DA	SCAST	0,5693	n.s	0,0376	*
<i>SERT</i> (Intron 13)	FV	MIN2AT	0,0502	n.s	0,0131	*
	DA	SCEINWT	0,0457	*	0,7192	n.s.

Für den *CCKBR* (3'UTR) Polymorphismus ergaben sich in keiner der Analysen signifikante Assoziationen und wird deswegen nicht weiter berücksichtigt.

Die Assoziationsanalysen des *MAOA* (Exon XV) Polymorphismus sind etwas vielschichtiger und sollten deswegen gesondert betrachtet werden.

Im χ^2 -Test wurden, wie bei den andern Polymorphismen auch, die Allelfrequenzen der Tiere mit den Extremwerten der Scores miteinander verglichen. Hierbei gilt zu bedenken, dass die Allelzahl bei den weiblichen Kälbern der doppelten Tierzahl entspricht, bei den männlichen dagegen der einfachen Tierzahl. In diesem Test konnten signifikante Assoziationen zwischen den Allelfrequenzen und den Scores des Wiegetestes (SCEINWT und SCWGWT) bei Dt. Angus und dem Score SCAST bei Dt. Fleckvieh nachgewiesen

werden. Bei der nachfolgenden Varianzanalyse wurde das bei den anderen Genen auch verwendete Modell eingesetzt, allerdings ohne den fixen Effekt Geschlecht, sondern die Berechnung wurde innerhalb der Geschlechter, aufgrund der X-chromosomalen Lokalisation, durchgeführt. In diesem Falle konnten keinerlei signifikante Assoziationen dargestellt werden.

Als Grundlage für Assoziationsstudien bei komplexen Merkmalen wie dem Verhalten ist die Varianzanalyse aufgrund der Berücksichtigung aller vorkommenden Faktoren, die auch signifikante Einflüsse auf die Scores haben (siehe Tabelle 16), dem χ^2 -Test, für den hier die Extremwerte einbezogen wurden, vorzuziehen. Dieser kann als Hilfestellung und Stärkung des Ergebnisses der Varianzanalyse mitberücksichtigt werden, sollte aber keine eigenständige Untersuchung bleiben.

Für einen Polymorphismus im codierenden Bereich eines Gens ist eher zu erwarten, dass dieser eine positive Assoziation zu einem untersuchten Merkmal aufweist, besonders dann, wenn dieser wie im Fall des hier im *MAOA* untersuchten Nukleotidaustausches, einen Aminosäureaustausch induziert. Allerdings ist auch bei einem Aminosäureaustausch nicht unbedingt eine Änderung der Tertiärstruktur die Folge. Dennoch sind bei einem Nukleotidaustausch in der codierenden Region eher als in der nicht-codierenden Region biochemische und/oder pathophysiologische Auswirkungen zu erwarten (Kim und Misra 2007).

Die Ursachen für die hier nicht nachweisbare Assoziation des Polymorphismus im *MAOA* zu den erfassten Verhaltensmerkmalen könnten in einer solchen fehlenden Änderung der Tertiärstruktur liegen. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass die Funktion des MAOA durch andere Enzyme soweit übernommen werden kann, dass keine Auswirkung offensichtlich wird, wie dies auch im Falle des Serotonintransporters beschrieben ist (Homberg *et al.* 2007). Weiterhin gilt beim *MAOA* zu berücksichtigen, dass dieses Gen durch seine X-chromosomale Lage bei den männlichen Kälbern nur als ein Allel vorliegt und bei den weiblichen Kälbern die X-Inaktivierung zum Tragen kommt (Asai 2004) und somit zumindest bei heterozygoten weiblichen Tieren keine Rückschlüsse auf das aktive Allel möglich sind. Weiterhin ist selbstverständlich an eine generell nicht existierende Rolle des MAOA in den hier untersuchten Verhaltensmerkmalen zu denken, wenn das zugrundeliegende Verhalten der hier erhobenen Scores nicht auf das durch *MAOA* beeinflusste Aggressionspotential (Popova 2008) der Tiere zurückzuführen ist.

DNA-Varianten in nicht-codierenden Bereichen, wie sie in dieser Arbeit im *CCKBR*, *DRD4* und *SERT* nachgewiesen wurden, haben zunächst keinen direkten Einfluss auf die Aminosäurestruktur, können jedoch einen Einfluss auf die Genexpression und eventuelle Splicingvorgänge haben. Die Unterscheidung einer neutralen Mutation von einer funktionalen Mutation ist im nicht-codierenden Bereich aufgrund unvollständiger Kenntnisse schwieriger als in codierenden Abschnitten (Boffelli *et al.* 2004). In hochkonservierten Abschnitten ist eine funktionelle Veränderung zum Beispiel bei einer durch den Nukleotidaustausch induzierten Änderung von Erkennungssequenzen für Transkriptionsfaktoren möglich. Zwar tolerieren die Transkriptionsfaktoren einen gewissen Spielraum ihrer Erkennungssequenz (Weitzman 2003), dennoch zählen sie zu den ultrasensitiven biologischen Systemen und eine Affinitätsänderung des Faktors zur modifizierten Bindestelle kann einen Einfluss auf die Genexpression haben (Sneppen *et al.* 2008). Ein Beispiel dafür sind die Varianten des ovinen α_{s1} -Kaseins. Das Fehlen des Exons VII in Variante I wird durch einen Nukleotidaustausch im Intron 7 in der 5'-Donor-Splice-Stelle induziert (Giambra *et al.* 2009).

Aber auch ohne den Nachweis solcher direkten Einflüsse von Polymorphismen auf die Wirkung des Gens konnten verschiedene Assoziationen zwischen solchen Polymorphismen und Phänotypen nachgewiesen werden. Das Muskelwachstum bei Schweinen ist mit einem Nukleotidaustausch im Intron 3 des Immunglobulin F2 Gens assoziiert (Andersson 2009). Auch bei der Fellfarbe von Hunden (white spotting) konnten Unterschiede der DNA-Sequenzen bei verschiedenen Phänotypen in nicht-codierenden Bereichen des Microphthalmia associated transcription factor (MITF) Gens detektiert werden (Andersson 2009). Auch bei Erkrankungen wie zum Beispiel bei Asthma liegt eine positive Assoziation eines Dinukleotidrepeats im Intron 2 des humanen Interleukin 4 Gens (Nagarkatti *et al.* 2004) und eines SNP in Intron 3 im Gen des Interferon gamma (Kumar und Ghosh 2008) vor. Ebenso gibt es eine positive Assoziation zwischen Lupus Erythematosus und einem SNP in Intron 1 des Interferon Regulatory Factor 5 (IRF5) Gen (Kawasaki *et al.* 2008).

Bei Vorliegen von Polymorphismen in der 5'UTR oder 3'UTR kann zusätzlich die Lebensdauer der RNA und die Effektivität der Translation beeinflusst werden. Solche Beispiele gibt es auch für die untranslatierten Bereiche (Rasmussen *et al.* 2001).

Der hier vorgefundene Polymorphismus im Intron 3 des *CCKBR* war zunächst vielversprechend, da durch diesen die Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor MZF1 verändert wird. Dennoch konnten in der statistischen Analyse keine Assoziationen zu den Verhaltensscores hergestellt werden. Gleiches gilt für den Polymorphismus in der 3'UTR des

CCKBR, für den allerdings keine funktionelle Bedeutung nachgewiesen werden konnte. Da der Cholecystokininrezeptor B stark in die Ausprägung ängstlichen Verhaltens eingebunden ist (Crowley und Corwin 1994; Daugé und Léna 1998; Wang *et al.* 2005), sprechen diese Ergebnisse dagegen, dass Angst hinter dem sichtbaren Verhalten der Kälber als Instinkt steht. Dennoch sollte man bedenken, dass es noch weitere Polymorphismen im *CCKBR* geben wird, zu denen doch eventuell eine Verbindung mit diesen Verhaltensscores dargestellt werden könnte. Beim Menschen geht man von einem SNP alle 1200 Basenpaare (Sherry *et al.* 2001) bzw. je 1000 - 5000 Basenpaaren aus. Für *Bos taurus* gibt es diesbezüglich keine Angaben, aber die Verhältnisse dürften ähnlich sein. In der Datenbank (http://www.ensembl.org/Bos_taurus/Location/Genome, letzter Zugriff 20.04.2009) ist die aktuelle Genomlänge für *Bos taurus* mit knapp drei Milliarden Basenpaaren angegeben und ca. zwei Millionen detektierte SNPs. Dies würde einem SNP auf ca 1400 Basenpaaren entsprechen. Da das gesamte *CCKBR* 10823 Basenpaare (Genbank-Nr. NW_00149331) hat, bestehen gute Chancen, weitere SNPs zu identifizieren.

Durch den Serotonintransporter kann sowohl der Aspekt der Ängste (Lesch *et al.* 1996) wie bei *CCKBR* als auch der Aspekt der Aggression (Popova 2008) wie bei *MAOA* beeinflusst werden. Weiterhin könnte es aufgrund der Lage des *SERT* auf BTA19 bei ca 21,3 Mbp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/>) einen Zusammenhang zum Scurs-Locus geben, der sich bei *BMS2142* (29,3 Mbp) auf BTA19 (Asai *et al.* 2004) befindet. Allerdings zeigte sich auch bei dem in diesem Gen untersuchten Polymorphismus im nicht-codierenden Bereich, der keinen Einfluss auf einen Transkriptionsfaktor hat, kein klarer Zusammenhang mit den Verhaltensscores der Kälber. In der Varianzanalyse ergibt sich zwar ein signifikanter Einfluss des *SERT*-Genotyps auf den Score des Anbindetestes bei den Dt. Fleckvieh, der sich auch anhand der LSQ-Mittelwerte (siehe Tabelle 30) nachvollziehen lässt. Allerdings lässt sich dieser Effekt, wie in Tabelle 38 aufgezeigt, nicht mit den Extremwerten im χ^2 -Test darstellen, der errechnete p-Wert liegt mit 0,0502 aber nahe der 5%-Signifikanzgrenze. Diese hier erhaltenen Ergebnisse bezüglich des *SERT* könnten einen guten Ausgangspunkt für weiteres Screening des Gens auf Polymorphismen darstellen.

Ähnliches lässt sich über den Polymorphismus im nicht-codierenden Bereich des *DRD4* sagen, der ebenfalls bei Dt. Fleckvieh einen Einfluss auf den Score MIN2AT hat und bei Dt. Angus auf den Score des Separier- und Rückhaltetestes. Somit hat *DRD4* in beiden Rassen, allerdings bei verschiedenen Merkmalen einen Einfluss. Da *DRD4* in Neugierde- und Erkundungsverhalten (Dulawa *et al.* 1999; Fidler *et al.* 2007; Momozawa *et al.* 2005) involviert ist, stellt sich allerdings die Frage, wieso ein Polymorphismus in diesem Gen das

Verhalten während des Anbindetestes, das vermutlich eher durch Angst und/oder Aggression gegenüber der Fixierung geprägt sein wird, beeinflusst. Dies führt dann aber auch wieder zu obiger Feststellung, dass ein Kandidatengen als ursächliches Gen für einen Phänotyp in Frage kommt, wenn es in allen Rassen und Analysen einen Einfluss hat.

Bei den fehlenden oder unklaren Assoziationen der Polymorphismen zu den Verhaltensscores können neben den oben angesprochenen Funktionen der Gene und Polymorphismen die Analyse der Gene selbst eine mögliche Kopplung mit anderen Mutationen und/oder zum Beispiel die in den beiden Rassen dargestellten Allelfrequenzen eine Rolle spielen.

Bei den Allelfrequenzen zeigten sich teils Unterschiede zwischen den innerhalb der Rasse detektierten Frequenzen und den bei den Kälbern ermittelten. Zur besseren Übersichtlichkeit sind diese in den Tabellen 39-41 gegenübergestellt und im Folgenden besprochen.

Die bei den hier identifizierten Nukleotidaustauschen aufgetretenen Abweichungen der Population vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht, die auch bei einem Teil der Mikrosatelliten festgestellt wurden, sind durch die geringe Anzahl Bullen jeder Rasse zu erklären. Eine Auflistung aller Typsierungen der Bullen sind im Anhang zu finden (Tabelle 3A bis 6A).

Für beide SNPs im *CCKBR* konnten auffällige Allel- und Genotypfrequenzen bei den Kälbern detektiert werden. Das jeweils seltenere Allel ist das Allel *T*, welches über beide Rassen hinweg mit einer Frequenz von 0,17 (Intron 3) bzw. 0,13 (3'UTR) vorliegt. Der Genotyp *TT* konnte sowohl bei den Dt. Fleckvieh im Intron 3 als auch bei den Dt. Angus in der 3'UTR nicht nachgewiesen werden. Dieses Fehlen eines Genotyps bei den Kälbern ist auf die Genotypen der Bullen zurückzuführen, da bei diesen der entsprechende Genotyp auch nicht vorlag und generell die Allelfrequenz für das Allel *T* bei beiden Austausch auch in der Rasse (siehe Tabelle 39 und Tabelle 40) und dadurch bei den Kälbermüttern eher gering ist.

Die Unterschiede der Allelfrequenzen innerhalb der Rassen zu den Allelfrequenzen innerhalb der Kälber derselben Rasse wird somit maßgeblich durch die Genotypen der eingesetzten Bullen bestimmt.

Ähnliche Frequenzunterschiede mit gleicher Ursache zeigen sich auch beim *DRD4*, wobei hier das Allel *G* bei Dt. Fleckvieh nur in einer Frequenz von 0,17 vorliegt. Dies ist allerdings nur bei den Kälbern der Fall; innerhalb der Rasse liegt die Frequenz bei 0,28 (siehe Tabelle 41). Die geringere Allelfrequenz bei den Kälbern ist auf das Fehlen des Genotyps *GG* bei den Bullen zurückzuführen. Bei Dt. Angus ist die Frequenz bei 0,65 und in einer anderen Untersuchung mit Dt. Holstein Bullen und dem Zuchtwert für Melkverhalten konnte eine Frequenz von 0,61 für Allel *G* nachgewiesen werden (K. Glenske, eigene Untersuchungen).

Solch extreme Unterschiede in den Allelfrequenzen zwischen den Rassen können darauf zurückzuführen sein, dass auf jede Rasse ein anderer Selektionsdruck wirkt (Machado *et al.* 2003), da die Rassen unterschiedliche Ursprünge haben und die Zuchtgeschichten und Zuchtziele differieren. Ähnliche Unterschiede in den Allelfrequenzen sind auch für einen SNP im *DRD1* beschrieben, wobei in dieser Studie 11 Rassen zugrunde liegen und in drei dieser ein Allel sogar völlig fehlt (Haegeman *et al.* 2003a). Auch hier erfolgt die Erklärung über direkte oder indirekte Selektion in diesen Rassen. Auch bei Mikrosatelliten konnten Allelunterschiede in portugiesischen Rinderrassen nachgewiesen werden. Diese haben zwar teils einen gemeinsamen Ursprung, sind aber als zwölf eigenständige Rassen geführt und gezüchtet, was sich auch in den Allelen widerspiegelt (Mateus *et al.* 2004).

Tabelle 39: Allelfrequenzen des Nukleotidaustausches im *CCKBR* (Intron 3) der Kälber im Vergleich mit den Allelfrequenzen innerhalb der Rasse.

<i>CCKBR</i> Intron 3		DA		FV	
		Rasse	Kälber	Rasse	Kälber
Allelfrequenzen	C	0,84	0,73	0,95	0,97
	T	0,16	0,27	0,05	0,03

Tabelle 40: Allelfrequenzen des Nukleotidaustausches im *CCKBR* (3'UTR) der Kälber im Vergleich mit den Allelfrequenzen innerhalb der Rasse.

<i>CCKBR</i> 3'UTR		DA		FV	
		Rasse	Kälber	Rasse	Kälber
Allelfrequenzen	C	0,88	0,93	0,81	0,78
	T	0,12	0,07	0,19	0,22

Tabelle 41: Allelfrequenzen des Nukleotidaustausches im *DRD4* (Intron 1) der Kälber im Vergleich mit den Allelfrequenzen innerhalb der Rasse.

<i>DRD4</i> Intron 1		DA		FV	
		Rasse	Kälber	Rasse	Kälber
Allelfrequenzen	G	0,59	0,65	0,28	0,17
	T	0,41	0,35	0,72	0,83

Im Rahmen dieser Arbeit waren die Nukleotidaustausche mit den teils höchst signifikanten Unterschieden der Allelfrequenz zwischen den beiden Rassen bei den unverwandten Tieren zunächst vielversprechend. Diese höchst signifikanten Unterschiede konnten auch bei den Kälbern nachgewiesen werden. Da es auch hinsichtlich des Verhaltens Rasseunterschiede dahingehend gibt, dass die Dt. Fleckvieh schwieriger zu handeln sind als die Dt. Angus

(Gauly *et al.* 2001), waren Unterschiede der Allelfrequenzen zunächst aussichtsreich für positive Ergebnisse, konnten jedoch nur teilweise erbracht werden.

Zur Bestimmung eines Kandidatengens als ursächliches Gen bzw. eines dargestellten Polymorphismus als Ursache der Merkmalsänderung (oder in diesem Falle des Verhaltens) gilt zu bedenken, dass der Einfluss auf das zu untersuchende Merkmal in allen betroffenen Rassen auftreten sollte. So sind als Beispiele von Kandidatengenen bei landwirtschaftlichen Nutztieren das *DGATI* - Gen mit einem in verschiedenen *Bos taurus* und *Bos indicus* Rassen vorkommenden Aminosäureaustausch (Kaupe *et al.* 2004; Winter *et al.* 2002) zu nennen. Ein weiteres Beispiel ist ein Polymorphismus im Ryanodinrezeptor-Gen, der für das Auftreten der Malignen Hyperthermie (MHS) verantwortlich ist und bei verschiedenen Spezies vorkommt. Dieser hat sowohl beim Menschen als Krankheitsursache (Keating *et al.* 1994; Quane *et al.* 1997) als auch beim Schwein (Fujii *et al.* 1991) aufgrund von aus MHS resultierenden Qualitätsmängeln beim Fleisch große Bedeutung .

Zusammenfassend lässt sich zu den hier untersuchten Kandidatengenen feststellen, dass der entscheidende, das Verhalten der Kälber dieser beiden Rassen beeinflussende Polymorphismus in keinem der Gene identifiziert werden konnte. Dies ist nicht unbedingt negativ zu sehen, da nicht mehr als 1 % aller Merkmale von nur einem Gen beeinflusst werden (Roubertoux und Le Roy-Duflos 2001) und somit sicher auch das komplexe Merkmal Verhalten durch verschiedene Veränderungen auf molekularer Ebene beeinflusst wird.

In dieser Arbeit deuten sich im *DRD4* und *SERT* mehr versprechende Ergebnisse der Assoziationsanalyse an und eine weitere Untersuchung dieser Gene sollte in Betracht gezogen werden. Hierfür sollten zumindest Analysen der mRNA durchgeführt werden und dadurch die gesamte codierende Region und darin enthaltene Polymorphismen detektiert werden. Hierbei sollte das Augenmerk auf nicht-synonymen Nukleotidaustauschen liegen. Auch eine Analyse des gesamten Gens wäre denkbar, um einen vollständigen Überblick über alle vorkommenden Polymorphismen, sowohl in der codierenden als auch in der nicht-codierenden Region, zu erlangen. Bei dieser Vorgehensweise sind mögliche Polymorphismen in der nicht-codierenden Region, die aber funktionale Mutationen darstellen, auch umgehend in einer Assoziationsanalyse zu berücksichtigen. Weiterhin können mit dieser Methode vollständige aus den Polymorphismen resultierenden Haplotypen analysiert werden.

Ebenso ist das Gen des CCKBR rein von seiner funktionellen Bedeutung her nicht außer Acht zu lassen, auch wenn in dieser Arbeit keine positiven Ergebnisse erbracht werden konnten. Anders ist dies bei *MAOA*. Hier liegt zwar auch eine funktionelle Bedeutung vor, allerdings stellt die Lokalisation auf dem X-Chromosom ein gewisses Problem der Untersuchung dar. Weitere Arbeiten mit diesem Gen rein auf DNA-Ebene sind nicht sehr vielversprechend, da man gerade bei den heterozygoten weiblichen Tieren keine Rückschlüsse auf das tatsächlich aktive Allel ziehen kann (Asai 2004). In diesem Fall wäre zu überlegen, in die Analysen nur männliche Kälber einzubeziehen. Weiterhin wäre es sicherlich interessant, die Untersuchungen um Expressionsanalysen zu ergänzen, wie dies zum Beispiel bei Brunner *et al.* (1993a) anhand von Fibroblastkulturen, die mit Dexamethason behandelt waren, durchgeführt wurde.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neben den Kandidatengenen auch Mikrosatelliten auf BTA1 und BTA29 typisiert und verschiedene Analysen durchgeführt. Mikrosatelliten sind gut geeignete genetische Marker, da sie hochvariabel sind und ihre Typisierung durch Etablierung von Multiplex-PCR und halbautomatischer Auswertung eine effiziente und rasche Methode darstellt. Die hier untersuchten Mikrosatelliten auf BTA1 (fünf Marker) und BTA29 (14 Marker) zeigten gute Typisierbarkeiten mit 88% - 100% vorliegenden Genotypen. Nur einer der Marker, *DIK5057* (29-13), weist einen zu geringen PIC-Wert von 0,002 bei DA bzw. 0,100 bei FV auf und wurde in der Analyse nicht berücksichtigt. Der durchschnittliche PIC-Wert aller anderen Marker auf BTA29 von 0,581 bei DA bzw. 0,600 bei FV, der für das Vorliegen hochinformativer Marker (PIC-Wert > 0,5) spricht (Botstein *et al.* 1980), lässt eine gute Eignung der Mikrosatelliten für weitere Analysen annehmen. Im Vergleich beider Rassen miteinander und zu den Literaturangaben bezüglich der Allelzahl und -größen der Mikrosatelliten traten Unterschiede auf (siehe Tabelle 42).

Tabelle 42: Alle analysierten Mikrosatelliten mit Literaturangaben zu Allelgröße (in bp) und Allelzahl (n) nach MARC USDA (<http://www.marc.usda.gov/genome/htmls>) im Vergleich mit den eigenen Ergebnissen je Rasse und Gesamtallelzahl (Gesamt n) über beide Rassen hinweg.

Lfd. Nr.	Mikro-satellit	Eigene Ergebnisse					Literaturangabe	
		Dt. Angus		Dt. Fleckvieh		Gesamt	Allelgröße	n
		Allelgröße	n	Allelgröße	n	n		
1-1	<i>BMS1928</i>	143 – 183	16	151 – 183	13	19	138 – 178	19
1-2	<i>DIK634</i>	226 – 234	4	228 – 230	2	4	224 – 236	5
1-3	<i>BMS574</i>	133 – 155	8	143 – 153	5	8	129 – 151	12
1-4	<i>BMS4020</i>	119 – 121	2	119 – 121	2	2	114 – 116	2
1-5	<i>DIK4957</i>	184 – 190	4	186 – 190	3	4	180 – 190	3
29-1	<i>BMS1857</i>	152 – 180	14	146 – 178	15	16	149 – 175	15
29-2	<i>BMS764</i>	96 – 110	7	96 – 112	8	8	92 – 108	8
29-3	<i>BMS1787</i>	156 – 174	10	148 – 174	11	11	140 – 172	15
29-4	<i>ILSTS089</i>	139 – 165	9	135 – 155	9	13	127 – 151	7
29-5	<i>MNB-127</i>	219 – 233	5	217 – 233	6	6	219 – 238	9
29-6	<i>MNB-145</i>	166 – 180	7	164 – 178	6	8	164 – 178	5
29-7	<i>MNB-109</i>	178 – 208	10	178 – 200	7	10	180 – 206	9
29-8	<i>OarHH22</i>	105 – 121	8	105 – 121	6	8	103 – 126	10
29-9	<i>BMC1206</i>	126 – 136	6	126 – 138	6	7	130 – 140	5
29-10	<i>ILSTS081</i>	98 – 116	8	90 – 118	11	12	88 – 122	15
29-11	<i>BMS1948</i>	99 – 125	9	99 – 125	8	9	97 – 125	12
29-12	<i>DIK4499</i>	207 – 213	4	207 – 215	4	5	199 – 211	6
29-13	<i>DIK5057</i>	226 – 228	2	226 – 236	3	3	220 – 230	5
29-14	<i>MNB-101</i>	149 – 167	6	149 – 167	8	8	148 – 164	7

Die Gesamtanzahl der Allele je Mikrosatellit in den eigenen Ergebnissen liegt außer bei *BMS1857* (29-1), *ILSTS089* (29-4), *MNB-145* (29-6), *MNB-109* (29-7), *BMC1206* (29-9) und *MNB-101* (29-14) unterhalb der in der Literatur angegeben. Auch zwischen den beiden Rassen treten teils erhebliche Differenzen der Allelzahlen auf. Diese Unterschiede in Allelzahlen und –größen sind durch die unterschiedlichen Rassen bzw. die in der Literatur (<http://www.marc.usda.gov/genome/htmls>) verwendeten Kreuzungstiere mit entsprechend größerer Heterozygotie zu erklären. Diese Phänomen der rassespezifischen Allele und Differenzen der Allelzahl zwischen Rassen wurde schon für verschiedene länderspezifische Rinderrassen beschrieben (Ciampolini *et al.* 1995; Mateus *et al.* 2004). Als Ursachen hierfür werden die spezifischen Züchtungen angegeben, da im Rahmen der Zuchtgeschichten der einzelnen Rassen auch immer wieder Allele innerhalb der Rasse verloren gehen können (Machado *et al.* 2003). Dies erklärt auch die verschiedenen Allele bei Dt. Angus und Dt. Fleckvieh, da beide Rassen im Rahmen ihrer Entstehung und Züchtung nicht miteinander verwandt sind. Durch die Rassespezifität der Mikrosatelliten sind auch Unterschiede in genetischen Karten und QTL-Positionen in Berechnungen mit reinrassigem Tiermaterial zu

erklären. Für einen besseren Vergleich der Mikrosatelliten in unterschiedlichen Arbeitsgruppen und für eine eventuelle Kombinierung von Datensets untereinander sind Standardproben zum Angleichen der Ergebnisse ein sinnvolles Hilfsmittel. Aus diesem Grund sind alle in dieser Arbeit verwendeten Mikrosatelliten auch für die Referenzprobe „Giessen2000“ aus dem EU-Projekt RESGEN CT98-118 typisiert worden (siehe Tabelle 7A).

Bei dem Kandidatengen *DRD4* stellte sich unabhängig zu dem Aspekt des Verhaltens und der problematischen Amplifizierung das Problem, dass dieses Gen zwar durch vergleichende Kartierung *Homo sapiens* – *Bos taurus* dem bovinen Chromosom 29 zugeordnet werden kann (Itoh *et al.* 2005; Larkin *et al.* 2003), dies jedoch nicht durch die Whole Genome Sequence (WGS Btau_3.1 und Btau_4.0) des Rindes bestätigt werden kann. Auch anhand des Mausgenoms lässt sich eine Lokalisation auf BTA29 vermuten, da *DRD4* auf Chromosom 7 bei *Mus musculus* lokalisiert ist (Genbank-Nr. 13491) und dies entspricht BTA29 (http://oxgrid.angis.org.au/cattle/mouse/500_7.29.html). Die beiden in der Genbank veröffentlichten Sequenzen des Rindes sind zum Teil unvollständig (Genbank-Nr. AY263349) und beide in revers-komplementärer Richtung im Vergleich zu Sequenzen anderer Spezies.

Aufgrund dieser ungenauen und nicht gesicherten Angaben zur Lokalisation des *DRD4* wurde mit den Mikrosatelliten von BTA29 eine genetische Kartierung vorgenommen. Die genetische Kartierung oder auch Kopplungsanalyse erfasst Rekombinationsraten und errechnet daraus mithilfe von Wahrscheinlichkeiten die Abstände der Marker zueinander (Goldgar *et al.* 1989). Auf dieser Basis kann dann eine Anordnung der Marker erfolgen. Bei manchen Markern kann es vorkommen, dass keine Festlegung auf ein Lokalisationsintervall möglich ist und dieser Marker somit nicht explizit kartiert werden kann. Die in die Kartierung des *DRD4* einbezogene Sequenz mit dem G/T-Austausch ließ sich durch Vergleiche mit Genbanksequenzen anderer Spezies und Rind in Intron 1 einordnen. Dieser Abschnitt konnte auf BTA29 genetisch kartiert werden. Für einen höheren Informationsgehalt und bessere Genauigkeit der Ergebnisse wurden neben den Kälbern und Vätern auch noch die Mütter typisiert und in die Kartierung miteinbezogen. In dem typisierten Familienmaterial waren keine Auffälligkeiten bezüglich Fehltypisierungen zu erkennen und alle Abstammungen waren bei allen analysierten Markern korrekt (die Segregation der Allele in den Kleinfamilien nachvollziehbar) und somit eine Kartierung aller Marker möglich

Die mit dieser Kartierung dargestellte Lokalisation des *DRD4* am distalsten Ende von BTA29 (siehe Abbildung 21) stimmt mit der Lokalisation in der vergleichenden Genkartierung *Homo*

sapiens – *Bos taurus* (Larkin *et al.* 2003) überein. *DRD4* ist auf HSA11, 11p15.5 lokalisiert (GeneID 1815), dies entspricht laut Genbank dem Abschnitt zwischen 0,627-0,630 x 10⁶ Basenpaaren auf Chromosom 11. Dieser Abschnitt befindet sich genau im ersten Segment bei Larkin *et al.* (2003) und deckt sich somit mit dem distalsten Abschnitt von BTA29 (siehe Abbildung 27).

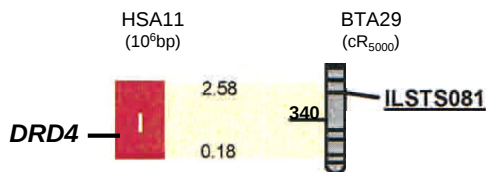


Abbildung 27: Ausschnitt der vergleichenden Kartierung HSA11, Block I (in 10⁶bp) mit der Lokalisation des humanen *DRD4* und distaler Abschnitt von BTA29 (in cR₅₀₀₀) nach Larkin *et al.* (2003).

Diese so auf den distalen Abschnitt eingegrenzte Lokalisation wurde in einem weiteren Arbeitsschritt durch die Typisierung zusätzlicher Marker in diesem Bereich und eine erneute Kartierung näher beschrieben. Hier zeigten sich Rasseunterschiede in der Lokalisation des Gens (siehe Abbildung 22). Bei Dt. Fleckvieh wurde *DRD4* 1,6 cM proximal von *MNB-101* kartiert, bei Dt. Angus hingegen 7,6 cM distal von *MNB-101*. Dennoch lässt sich dadurch die Lokalisation des Gens im distalen Abschnitt bestätigen. In diesem Bereich sind keine weiteren Mikrosatelliten in der Datenbank auffindbar (<http://www.marc.usda.gov/genome/htmls/MarkerSearch.jsp?Species=bos>) und durch die Nähe der Marker zueinander sind rein rechnerisch durchaus Vertauschungen möglich. Denkbar wäre auch eine Lokalisation des *MNB-101* innerhalb des *DRD4*, was eine exakte Kartierung für Cri-Map unmöglich macht. Zur Klärung dessen wären Sequenzierungen des distalen Endes von BTA29 mit *MNB-101*, eventuell mithilfe von BAC-Klonen wie dies auch bei der Kartierung des Polled Locus durchgeführt wurde (Drögemüller *et al.* 2005), nötig.

Die hier durchgeführte Kartierung des *DRD4* kann somit auch entgegen der fehlenden zugehörigen Whole Genome Sequence als korrekt angenommen werden. Das die WGS veröfentlichende Baylors College of Medicine (Human Genome Sequencing Center) weist selbst darauf hin, dass zum Einen Sequenzabschnitte in der WGS fehlen und zum Anderen Fehler auftreten könnten (<http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/bovine/>).

Eine gute Ergänzung zu dieser Genomsequenzierung sind Radiation Hybrid Karten (Itoh *et al.* 2005). In einer allgemeinen Studie zur Sicherung der WGS anhand einer Radiation Hybrid Karte wurden differierende Anordnungen der Marker zwischen beiden Karten auf vier Chromosomen festgestellt, darunter auch BTA29 (Jann *et al.* 2006). Dies konnte speziell für BTA29 auch in einer weiteren Studie bestätigt werden (Prasad *et al.* 2007). Weiterhin wurden für fast alle Chromosomen Unterschiede in der Sequenz der WGS und der Reihenfolge der Kartierung via Radidation Hybrid nachgewiesen (Jann *et al.* 2006). Diese Inkonsistenz ist ein deutlicher Hinweis auf die generellen Schwierigkeiten der kompletten Genomsequenzierung und spricht für die hier durchgeführte genetische Kartierung. Bei verschiedenen Kartierungsformen ist es möglich, dass sich unterschiedliche Karten ergeben, wie dies auch in einer Vergleichsstudie von Radiation Hybrid Karten, AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphismus) Karten und *in silico* Karten nachgewiesen wurde (Ajmone Marsan *et al.* 2008). Im Rahmen dieser Studie wurden für verschiedene Chromosomen Vergleiche der unterschiedlichen Kartierungsmethoden erstellt, darunter auch BTA29. Dabei konnten unterschiedliche Kartenlängen sowie auch Vertauschungen einiger Marker nachgewiesen werden. So zum Beispiel die Marker *ILSTS081* und *BMS1948* im distalen Abschnitt, die in den Radiation Hybrid Karten umgekehrt zu der *in silico* Karte angeordnet sind (siehe Abbildung 28).

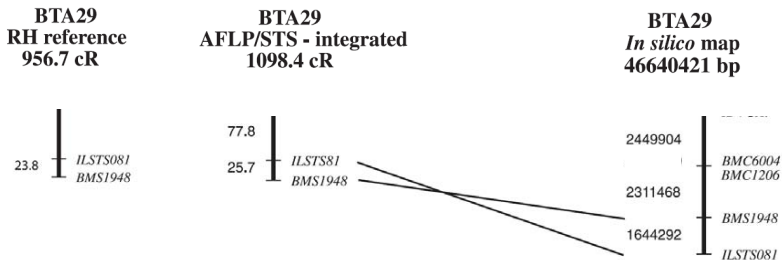


Abbildung 28: Ausschnitt des distalen Abschnittes der vergleichenden Karten von BTA29 aus Ajmone Marsan *et al.* (2008).

Bei der Erstellung der drei verschiedenen Karten in dieser Arbeit mit den zehn Mikrosatelliten zeigten sich Auffälligkeiten in den Kartenlängen. Diese unterschieden sich zwischen den Rassen um 38 cM (FV 81 cM und DA 119 cM Gesamtlänge). Die Karte über beide Rassen hinweg beläuft sich auf 104,5 cM. Auch die Karten mit allen 14 Markern unterscheiden sich um 15 cM (FV 98,9 cM und DA 113,9 cM Gesamtlänge). Die

geringgradigen Änderungen der Kartenlängen im Vergleich zu der Kartierung mit zehn Markern sind durch das vergrößerte Datenmaterial zu erklären, da innerhalb des Programmes CriMap die Rekombinationsraten aller Marker zueinander bestimmt werden und durch eine Ergänzung neuer Mikrosatelliten können somit auch „neue“ Abstände schon berechneter Mikrosatelliten durch neue Wahrscheinlichkeiten zustande kommen. Eine der ersten genetischen Karten von BTA29 hat eine Länge von 28,2 cM (Bishop *et al.* 1994) und die aktuell in der Literatur angegebene Länge von BTA29 ist 69,7 cM (Ihara *et al.* 2004). Letztere Karte wurde anhand der MARC USDA Referenz Herde, also an Kreuzungstieren, erstellt. Kreuzungstiere bieten gegenüber Reinzuchten, wie sie in dieser Arbeit genutzt wurden, den Vorteil, dass sie heterozygoter und somit informativer sind. Dies wurde schon 1994 anhand von *Bos taurus* x *Bos indicus* F1 Kreuzungen im Vergleich zu *Bos taurus* x *Bos taurus* F1 Kreuzungen sowie *Bos taurus* F1 Reinzuchten mit signifikanten Unterschieden der Heterozygotie festgestellt (Bishop *et al.*). Rasseabhängige Unterschiede in Kartenlängen wurden auch schon für BTA23 beschrieben (Weimann *et al.* 2003).

Der Marker *BMS574* auf BTA1 wird in einer kanadischen Studie als QTL für Temperament bei Fleischrindern angegeben (Schmutz *et al.* 2001). Dieser Marker wurde neben vier weiteren auf anderen Chromosomen aus der Studie von Schmutz *et al.* bereits bei einer Auswahl der Kälber typisiert und Varianzanalysen zu verschiedenen Verhaltensmerkmalen durchgeführt. Hier zeigten sich für *BMS574* signifikante Einflüsse auf die Scores des Wiegetestes und des Separier- und Rückhaltetestes (E.-M. Prinzenberg, persönliche Mitteilung).

In der hier vorliegenden Arbeit wurde dieser Bereich näher eingegrenzt und je zwei Mikrosatelliten distal und proximal von *BMS574* ausgewählt und alle fünf Mikrosatelliten bei allen 962 Kälbern typisiert. Die anschließend durchgeführte Assoziationsstudie (Varianzanalyse) konnte die vorhergehenden Ergebnisse nur bedingt bestätigen. Das zuvor auch schon in Erscheinung getretene Allel 153 von *BMS574* zeigte nur Einflüsse nahe des Signifikanzniveaus von 5% (nach Bonferroni-Korrektur: $p = 0,0125$) bei Dt. Angus und SCWGWT ($p = 0,0127$) sowie Dt. Fleckvieh und SCAST ($p = 0,0128$). Dahingegen hat das Allel 169 von *BMS1928*, der ca. 7 cM proximal von *BMS574* liegt, einen signifikanten Einfluss auf den Score SCWGWT bei Dt. Fleckvieh. Bei Dt. Angus konnte dieses Allel nicht in die Analyse miteinbezogen werden, da es mit einer Häufigkeit von unter 5% vorliegt (1,06%). Bei Dt. Fleckvieh kam dieses Allel mit 11,44% am vierthäufigsten vor, dennoch ist aufgrund des niedrigen Prozentsatzes dieses Allels in Dt. Angus dieses Ergebnis unter

Vorbehalt zu sehen und bedarf noch weiterer Analysen in vergrößertem Tiermaterial und weiteren Rassen zur Erhöhung der Aussagefähigkeit und Validierung der Ergebnisse (Darvasi und Soller 1994). Allerdings wurde in einer aktuellen Studie ein QTL bei *BMS6438* im proximalen Abschnitt von BTA1, noch vor *BMS1928* gelegen, für die Differenz der gezeigten Alarmbereitschaft in zwei hintereinander durchgeführten Social Separation Tests an Charolais x Holstein Kreuzungen nachgewiesen (Gutiérrez-Gil *et al.* 2008). Dies spricht auch für weitere Analysen im proximalen Abschnitt von BTA1. Weitere Überlegungen und Untersuchungen könnten auch zu einer Verbindung mit dem Polled Locus führen, der im proximalen Abschnitt von BTA1 (Georges *et al.* 1993b) bei *BMS6438* und *TGLA49* (Schmutz *et al.* 1995) bzw. proximal von *BMS6438* (Drögemüller *et al.* 2005) lokalisiert ist. Ein optischer Vergleich dieser Aspekte zur Verdeutlichung der Bedeutung dieses Abschnittes ist in Abbildung 29 dargestellt.

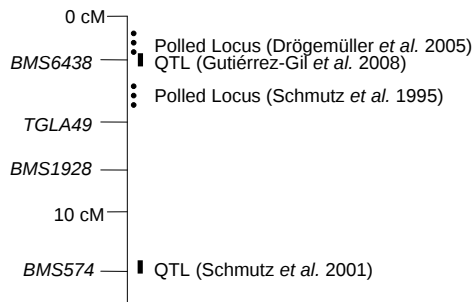


Abbildung 29: Schematische Darstellung des proximalen Abschnittes von BTA1 mit den Positionen des QTL von Gutiérrez-Gil *et al.* (2008) und des Polled Locus nach Schmutz *et al.* (1995) und Drögemüller *et al.* (2005) sowie Darstellung des proximalsten in dieser Arbeit untersuchten Mikrosatelliten *BMS1928* und des QTL von Schmutz *et al.* (1995), aufgrunddessen diese Untersuchung durchgeführt wurde.

Eine weitere Analysemöglichkeit, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, sind QTL-Studien. Solche Untersuchungen chromosomaler Fragmente in Verbindung zu Phänotypen stellen einen guten Startpunkt zu Suche nach den hinter der Variation stehenden Genen und Polymorphismen dar bzw. können dadurch Chromosomenabschnitte ausgeschlossen werden (Mormède *et al.* 2002).

Die durchgeführten QTL-Studie wurden sowohl innerhalb der Rassen über die Familien hinweg als auch innerhalb jeder einzelnen Familie mit allen fünf Mikrosatelliten durchgeführt. Eine solche Auftrennung der Analysen ist sinnvoll, da nachgewiesen wurde,

dass sich dadurch QTL-Bereiche verschieben können (Ashwell *et al.* 2004). In dieser Studie wurden zum Beispiel acht QTL für somatische Zellzahl auf sieben verschiedenen Chromosomen bei Analyse innerhalb der Familien detektiert. Bei Berechnung über die Familien hinweg stellten sich nur noch vier QTL auf vier Chromosomen dar, von denen nur einer genau mit einem der vorhergehenden übereinstimmte, zwei liegen nahe beieinander auf den Chromosomen und ein QTL ist komplett neu. Die verbleibenden fünf QTL wurden nicht wieder dargestellt.

Die hier durchgeführte QTL-Studie auf BTA1 erbrachte jedoch weder bei Analyse über die Familien innerhalb der Rassen noch in einer der 14 Familien einzeln analysiert positive Ergebnisse. Es konnten auch keine Rückschlüsse auf einen angedeuteten QTL gezogen werden. Dies kann mit der Merkmalerfassung zusammenhängen. In der Studie von Schmutz *et al.* (2001) wurde eine Verhaltensbewertung in einer Vorrichtung ähnlich der Waage im Wiegetest durchgeführt und es wurde die Bewegungshäufigkeit der Tiere in einer Minute Testdauer mit elektronischen Methoden detektiert. Dies entspricht in etwa dem Score SCWGWT. Allerdings hatten die Kälber hier währenddessen Sicht- und Rufkontakt zur Herde, was bei Schmutz *et al.* nicht der Fall war. Dort wurde Temperament auch als „Reaktion auf Isolation von Artgenossen“ definiert, wohingegen hier eher die Reaktion auf menschliches Handeln (Mathiak 2002; Urban 2007) und das Verhalten gegenüber der Waage untersucht wurde. Ein weiterer Unterschied der beiden Studien ist die Tierzahl. Bei Schmutz *et al.* (2001) handelte es sich um 17 Familien mit 130 Kälbern und hier sind 14 Familien mit 962 Kälbern untersucht und analysiert worden. In diesem Vergleich und für den Ansatz einer QTL-Studie ist unser Tiermaterial besser als das von Schmutz *et al.*, da das Detektieren von QTL stark von dem genetischen Pool der analysierten Population abhängt (Roubertoux und Le Roy-Duflos 2001) und viele verschiedene Halbgeschwister-Familien, die möglichst groß sind, am sinnvollsten sind (Geldermann 2005).

Dennoch sollte eine Bedeutung von BTA1 im Zusammenhang mit Verhalten nicht ausgeschlossen werden. Zusätzliche Untersuchungen am proximalen Ende mit Typisierungen und Assoziationsstudien der weiteren Mikrosatelliten (siehe Abbildung 29) könnten durchaus noch positive Ergebnisse bringen.

Auf BTA29 wurde ein QTL für Temperament bei Milchkühen, gemessen als das Verhalten während des Melkens, beschrieben. Dieser liegt im proximalen Abschnitt bei *BMS764* (20cM) (Hiendleder *et al.* 2003). Das funktionelle Kandidatengen *DRD4* hingegen wurde im distalen Bereich von BTA29 kartiert. Zur weiteren Analyse dieses Chromsomes und

Bestätigung und/oder Widerlegung dieser Aussagen wurde für BTA29 ebenfalls eine QTL-Studie mit den Verhaltensscores und den ersten zehn Mikrosatelliten (29-1 bis 29-10) durchgeführt.

In der QTL-Studie auf BTA29 konnte in keiner Rasse und innerhalb der einzelnen Familie ein deutlicher QTL nachgewiesen werden. Nur bei den Dt. Angus stellte sich für den Verhaltensscore SCEINWT ein putativer QTL mit einem F-Wert von 2,54 an der 5%-Signifikanzgrenze mit 2,58 bei ca. 14 cM in unserer Karte dar. In diesem Bereich befindet sich der Mikrosatellit *BMS764*. Der beschriebene QTL bei Milchkühen liegt ebenfalls bei diesem Mikrosatelliten, auch wenn in dieser Studie 20 cM als Locus angegeben sind (Hiendleder *et al.* 2003). Diese unterschiedlichen Lokalisationsangaben können aufgrund der Verwendung verschiedener Datenbanken mit unterschiedlichen Angaben zustande kommen. So wird dieser Marker zur Zeit (April 2009) beim National Centre for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) bei 9,7 cM und beim United States Department of Agriculture (Agricultural Research Centre, Meat Animal Research Centre, <http://www.marc.usda.gov/genome/genome.html>) bei 11,293 cM als Lokalisation auf BTA29 angegeben. Auch bei Dt. Fleckvieh, allerdings für den Score SCWGWT, könnte man einen QTL bei *BMS764* vermuten, allerdings hat dieser einen F-Wert von 2,22 und die 5%-Signifikanzgrenze liegt in diesem Fall bei 2,33. Dennoch kann aus diesen Untersuchungen die Bedeutung des proximalen Bereichs von BTA29 um *BMS764* herum für Temperament und Verhalten bestätigt werden und die Auswahl zusätzlicher Mikrosatelliten zur Feinkartierung und Auswahl geeigneter Kandidatengene in diesem Bereich als weitere Schritte sollten angedacht werden. Auch eine Erweiterung des Tiermaterials mit gezielten Kreuzungen der beiden Rassen ist für weitere Untersuchungen sinnvoll (Gasparin *et al.* 2007), da auch generell für Kopplungsanalysen Kreuzungen aufgrund der Erhöhung der Heterozygotie empfohlen werden (Haberfeld *et al.* 1993). Je höher die genetische Diversität zwischen den untersuchten Ausgangspopulationen ist, umso leichter lassen sich in daraus resultierenden Kreuzungstieren genetische Marker nachweisen (Cheverud und Routman 1993), die dann entsprechend auch in anderen Rassen untersucht werden können. Die Kreuzungen der beiden Rassen Dt. Angus und Dt. Fleckvieh und Verhaltenstests der Kälber wurden inzwischen durchgeführt (Plachta 2009) und die Daten sowie Proben der Tiere stehen für zukünftige Analysen zur Verfügung.

Bei BTA29 zeigt sich allerdings bei FV auch im distalen Bereich bei ca. 74 cM in der FV-Karte ein Anstieg des F-Wertes auf 2,16 ab. Dort ist *ILSTS081* lokalisiert, der in direkter Nähe zu *DRD4* liegt (siehe Abbildung 22). Somit ist *DRD4* eventuell doch als positionelles

Kandidatengen anzusehen, wenn es auch nicht mit dem QTL im proximalen Abschnitt in Verbindung zu stehen scheint. Eine aktuelle QTL-Studie zum Temperament bei Charolais x Holstein Kreuzungen konnte signifikante QTLs im distalen Abschnitt von BTA29 (zwischen *DIK49* und *MNB-101*) für die Fluchtdistanz der Tiere in einem Verhaltenstest darstellen (Gutiérrez-Gil *et al.* 2008). Somit könnte *DRD4* hier eine Rolle spielen. Eine schematische Zusammenfassung dieser Aspekte ist in Abbildung 30 dargestellt.

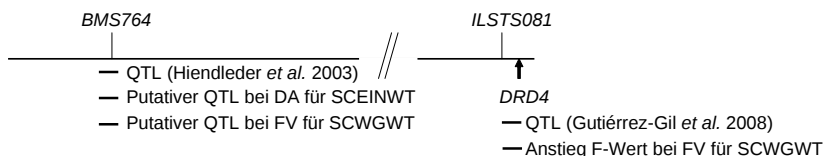


Abbildung 30: Schematische Darstellung der telomerischen Abschnitte von BTA29 mit den Positionen der QTL von Hiendleder *et al.* (2003) und Gutiérrez-Gil *et al.* (2008) sowie der genetisch kartierten Lokalisation des *DRD4* und den in dieser Arbeit detektierten putativen QTL beider Rassen und Bereich des Anstiegs des F-Wertes bei FV.

Da bekannt ist, dass die einem QTL zugrundeliegenden molekularen Besonderheiten sehr unterschiedlich sein können (Andersson 2009), erscheint eine weitere Untersuchung verschiedener Genomregionen unter Berücksichtigung der in dieser Arbeit zusammengefassten Analyse und Integration der verschiedenen Ansätze und Chromosomenregionen sinnvoll. Hier wären zum Beispiel an QTL-Studien im Rahmen eines Whole Genome Scans zu denken, aber auch an eine detailliertere Untersuchung der telomerischen Bereiche von BTA1 und BTA29, die sich in dieser Arbeit als wichtige Ansatzpunkte für die dem Verhalten zugrundeliegende Genetik erwiesen haben. Im Anschluß könnten positionelle Kandidatengene analysiert werden, die mittels einer vollständigen Sequenzierung der codierenden Abschnitte analysiert werden sollten. So wäre eine weitere Grundlagenforschung für eine zukünftige Einbeziehung der Verhaltensgenetik in die Fleischerzucht und Mutterkuhhaltung möglich.

6 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung von Chromosomenabschnitten und Polymorphismen in Kandidatengenen, die einen Einfluss auf das Verhalten von Kälbern der Mutterkuhrassen Dt. Angus (DA) und Dt. Fleckvieh (FV) haben.

Die einbezogenen Kälber stammen aus vier Jahrgängen des Lehr- und Versuchsbetriebes Rudlos. Insgesamt handelte es sich um 417 Kälber der Rasse FV und 545 Kälber der Rasse DA. Diese wurden drei Verhaltenstests unterzogen und dabei vier Scores vergeben (Min2AT im Anbindetest, SCEINWT bei Eintritt in die Waage, SCWGWT während des Wiegens, ScAST im Separier- und Rückhaltetest). FV-Kälber zeigten im Vergleich zu den DA-Kälbern ein unruhigeres Verhalten.

Für die Auswahl der Kandidatengene wurden funktionelle Merkmale herangezogen und vier Gene (Cholecystokininrezeptor B (CCKBR) - Gen, Dopaminrezeptor D4 (DRD4) - Gen, Monoaminoxidase A (MAOA) - Gen und das Serotonintransporter (SERT) - Gen) ausgewählt. In diesen Genen wurden bestimmte Abschnitte (*CCKBR*: Ex III – Ex IV und 3'UTR; *DRD4*: Intron 1 – ExII; *MAOA*: Ex XIV – Ex XV; *SERT*: Intron 13 und 5'UTR), amplifiziert und mit Sequenzierung analysiert. Insgesamt konnten fünf Nukleotidaustausche detektiert werden. Für die Typisierung dieser wurden PCR-RFLP- bzw. Tetra-Primer ARMS-PCR-Analysen etabliert und die Kälber genotypisiert. Die Assoziationsanalyse erfolgte mit Chi²-Test und den Extremwerten sowie mittels Varianzanalysen, wobei mit beiden Analysen unterschiedliche Signifikanzen detektiert wurden. Unter Kombination beider Ergebnisse sind der SNP im *SERT* (Einfluss auf Min2AT bei FV mit $p = 0,0131$) und im *DRD4* (Effekt auf ScAST bei DA mit $p = 0,0376$ und Min2AT bei FV mit $p = 0,0384$) mit dem Verhalten der Kälber im Zusammenhang zu sehen.

In einem weiteren Teil der Arbeit wurden Mikrosatelliten auf BTA1 (*BMS1928*, *DIK634*, *BMS574*, *BMS4020* und *DIK4957*) und BTA29 (*BMS1857*, *BMS764*, *BMS1787*, *ILSTS089*, *MNB-127*, *MNB-145*, *MNB-109*, *OarHH22*, *BMC1206*, *ILSTS081*, *BMS1948*, *DIK4499*, *DIK5057* und *MNB-101*) analysiert und QTL-Analysen zu den Verhaltensscores berechnet. Hier zeigte sich ein putativer QTL auf BTA29 bei *BMS764* in der Rasse Dt. Angus für SCEINWT. Im Rahmen einer Varianzanalyse mit den Mikrosatelliten auf BTA1 konnte ein Einfluss auf SCWGWT von *BMS1928* (Allel 169) bei FV und von *BMS574* (Allel 153) bei DA festgestellt werden. Dieses Allel hat ebenso einen Effekt auf ScAST bei FV.

Das Gen des Dopaminrezeptors D4 wurde mit 14 Mikrosatelliten auf BTA29 in beiden Rassen im distalen Abschnitt des Chromosomes bei *MNB-101* genetisch kartiert.

7 Summary

The aim of this study was the identification of sections of chromosomes and polymorphisms in genes, which influence the behaviour of calves. The included examined calves in the study were German Simmental (GS) and German Angus (GA) born in four consecutive years at the research station Rudlos. They were behaviour tested in three different testsituations with four scores (Min2AT in tetheringtest, SCEINWT while entering the scale, SCWGWT while weighing and score ScAST for separation- and restrainttest). All together 417 German Simmental and 545 German Angus calves were used in this study. In the behaviour tests the GS were more difficult to handle than the GA.

The candidate genes were selected according to functional characteristics und four genes (cholecystokininreceptor B (CCKBR) - gene, dopamine receptor D4 (DRD4) - gene, monoamine oxidase A (MAOA) - gene and the serotonintransporter (SERT) - gene) were decided which had been analyzed. Different regions in these genes (*CCKBR*: Ex III – Ex IV und 3'UTR; *DRD4*: Intron 1 – ExII; *MAOA*: Ex XIV – Ex XV; *SERT*: Intron 13 und 5'UTR) were amplified and sequenced. A total of five nucleotide substitutions were identified. The genotyping of the calves was done with especially developed PCR-RFLP- or tetra-primer ARMS-PCR-analysis. Association studies between genotypes and behaviour scores were arranged with a chi-square test on the one hand and variance analysis on the other hand. Both analyses resulted in different outcomes. In conclusion of the outcomes the SNP in *SERT* (influence on Min2AT/FV with $p = 0,0131$) and the SNP in *DRD4* (influence on ScAST/DA with $p = 0,0376$ and Min2AT/FV with $p = 0,0384$) could be supposed to affect the behaviour of the calves.

Different microsatellites on BTA1 (*BMS1928*, *DIK634*, *BMS574*, *BMS4020* and *DIK4957*) and BTA29 (*BMS1857*, *BMS764*, *BMS1787*, *ILSTS089*, *MNB-127*, *MNB-145*, *MNB-109*, *OarHH22*, *BMC1206*, *ILSTS081*, *BMS1948*, *DIK4499*, *DIK5057* and *MNB-101*) were analysed and QTL-studies were calculated. On BTA29 a putative QTL near microsatellit *BMS764* was detected, influencing SCEINWT in German Angus. With the microsatellites on BTA1 a variance analysis was done. The score SCWGWT was affected by *BMS1928* (allel 169) in German Simmental and *BMS574* (allel 153) in German Angus. These allel also influences ScAST in German Simmental.

The gene of the dopamine receptor D4 was mapped in this study with the 14 microsatellites on BTA29 in the distal telomeric region near *MNB-101* in both breeds.

8 Literaturverzeichnis

- Abell, C. W., S. W. Kwan (2001): Molecular characterization of monoamine oxidases A and B. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 65: 129-156.
- Adamec, R., P. Burton, J. Blundell, D. L. Murphy, A. Holmes (2006): Vulnerability to mild predator stress in serotonin transporter knockout mice. *Behavioural Brain Research* 170: 126-140.
- Agelink, M. W., J. Kornischka, J. Cordes, A. Klimke, H. Hauner, D. Ziegler (2006): Allgemeinmedizinische Aspekte der Therapie mit Antipsychotika der zweiten Generation. *Deutsches Ärzteblatt* 42: A2802-A2808.
- Ajmone Marsan, P., C. Gorni, E. Milanesi, R. Mazza, M. J. T. van Eijk, J. D. Peleman, J. L. Williams (2008): Assessment of AFLP (R) marker behaviour in enriching STS radiation hybrid maps. *Animal Genetics* 39: 383-394.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, D. J. Lipman (1990): Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410.
- Andersson, L. (2001): Genetic dissection of phenotypic diversity in farm animals. *Nature Reviews. Genetics* 2: 130-138.
- Andersson, L. (2009): Genome-wide association analysis in domestic animals: a powerful approach for genetic dissection of trait loci. *Genetica* 136: 341-349.
- Andersson, L., M. Georges (2004): Domestic-animal genomics: deciphering the genetics of complex traits. *Nature Reviews. Genetics* 5: 202-212.
- Asai, M. (2004): Allele-specific real-time PCR for examination of X chromosome inactivation in *Bos Taurus*. Swiss Federal Institute of Technology, Zürich;
- Asai, M., T. G. Berryere, S. M. Schmutz (2004): The scurs locus in cattle maps to bovine chromosome 19. *Animal Genetics* 35: 34-39.
- Asghari, V., O. Schoots, S. van Kats, K. Ohara, V. Jovanovic, H. C. Guan, J. R. Bunzow, A. Petronis, H. H. Van Tol (1994): Dopamine D4 receptor repeat: analysis of different native and mutant forms of the human and rat genes. *Molecular Pharmacology* 46: 364-373.
- Ashwell, M. S., D. W. Heyen, T. S. Sonstegard, C. P. Van Tassell, Y. Da, P. M. VanRaden, M. Ron, J. I. Weller, H. A. Lewin (2004): Detection of quantitative trait loci affecting milk production, health, and reproductive traits in Holstein cattle. *Journal of Dairy Science* 87: 468-475.
- Auerbach, J., V. Geller, S. Lezer, E. Shinwell, R. H. Belmaker, J. Levine, R. Ebstein (1999): Dopamine D4 receptor (D4DR) and serotonin transporter promoter (5-HTTLPR) polymorphisms in the determination of temperament in 2-month-old infants. *Molecular Psychiatry* 4: 369-373.
- Auerbach, J. G., M. Faroy, R. Ebstein, M. Kahana, J. Levine (2001): The association of the dopamine D4 receptor gene (DRD4) and the serotonin transporter promoter gene (5-HTTLPR) with temperament in 12-month-old infants. *Journal of Child Psychology and Psychiatry and Allied Disciplines* 42: 777-783.
- Bach, A. W., N. C. Lan, D. L. Johnson, C. W. Abell, M. E. Bembenek, S. W. Kwan, P. H. Seeburg, J. C. Shih (1988): cDNA cloning of human liver monoamine oxidase A and B: molecular basis of differences in enzymatic properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85: 4934-4938.
- Bagnato, A., F. Schiavini, A. Rossoni, C. Maltecca, M. Dolezal, I. Medugorac, J. Solkner, V. Russo, L. Fontanesi, A. Friedmann, M. Soller, E. Lipkin (2008): Quantitative trait loci affecting milk yield and protein percentage in a three-country Brown Swiss population. *Journal of Dairy Science* 91: 767-783.

- Bailey, J. N., S. E. Breidenthal, M. J. Jorgensen, J. T. McCracken, L. A. Fairbanks (2007): The association of DRD4 and novelty seeking is found in a nonhuman primate model. *Psychiatric Genetics* 17: 23-27.
- Barendse, W., S. M. Armitage, L. M. Kossarek, A. Shalom, B. W. Kirkpatrick, A. M. Ryan, D. Clayton, L. Li, H. L. Neibergs, N. Zhang, W. M. Grosse, J. Weiss, P. Creighton, F. McCarthy, M. Ron, A. J. Teale, R. Fries, R. A. McGraw, S. S. Moore, M. Georges, M. Soller, J. E. Womack, D. J. S. Hetzel (1994): A genetic linkage map of the bovine genome. *Nature Genetics* 6: 227-235.
- Barendse, W., S. M. Armitage, A. M. Ryan, S. S. Moore, D. Clayton, M. Georges, J. E. Womack, J. Hetzel (1993): A genetic map of DNA loci on bovine chromosome 1. *Genomics* 18: 602-608.
- Barendse, W., D. Vaiman, S. J. Kemp, Y. Sugimoto, S. M. Armitage, J. L. Williams, H. S. Sun, A. Eggen, M. Agaba, S. A. Aleyasin, M. Band, M. D. Bishop, J. Buitkamp, K. Byrne, F. Collins, L. Cooper, W. Coppettiers, B. Denys, R. D. Drinkwater, K. Easterday, C. Elduque, S. Ennis, G. Erhardt, L. Ferretti, N. Flavin, Q. Gao, M. Georges, R. Gurung, B. Harlizius, G. A. Hawkins, J. Hetzel, T. Hirano, D. Hulme, C. Jorgensen, M. Kessler, B. W. Kirkpatrick, B. Konfortov, S. Kostica, C. Kuhn, J. A. Lenstra, H. Leveziel, H. A. Lewin, B. Leyhe, L. Li, I. Martin Burriel, R. A. McGraw, J. R. Miller, D. E. Moody, S. S. Moore, S. Nakane, I. J. Nijman, I. Olsaker, P. D., A. Rando, M. Ron, A. Shalom, A. J. Teale, U. Thieven, B. G. D. Urquhart, D.-I. Vage, A. Van de Weghe, S. Varvio, R. Velmala, J. Vilkkii, R. Weikard, C. Woodside, J. E. Womack, M. Zanotti, P. Zaragoza (1997): A medium-density genetic linkage map of the bovine genome. *Mammalian Genome* 8: 21-28.
- Battersby, S., A. D. Ogilvie, C. A. Smith, D. H. Blackwood, W. J. Muir, J. P. Quinn, G. Fink, G. M. Goodwin, A. J. Harmar (1996): Structure of a variable number tandem repeat of the serotonin transporter gene and association with affective disorder. *Psychiatric Genetics* 6: 177-181.
- Baumung, R. (2001): Grundsätze der Genomanalyse - Genkartierung und Hauptgenusche. Genomanalyse und markergestützte Selektion - Seminar des Genetischen Ausschusses der ZAR, Geinberg.
- Becker, B. G., J. F. P. Lobato (1997): Effect of gentle handling on the reactivity of zebu crossed calves to humans. *Applied Animal Behaviour Science* 53: 219-224.
- Becker, K., M. Laucht, M. El-Faddagh, M. H. Schmidt (2005): The dopamine D4 receptor gene exon III polymorphism is associated with novelty seeking in 15-year-old males from a high-risk community sample. *Journal of Neural Transmission* 112: 847-858.
- Bellivier, F., I. Roy, M. Leboyer (2002): Serotonin transporter gene polymorphisms and affective disorder-related phenotypes. *Current Opinion in Psychiatry* 15: 49-58.
- Bishop, M. D., S. M. Kappes, J. W. Keele, R. T. Stone, S. L. Sundeen, G. A. Hawkins, S. S. Toldo, R. Fries, M. D. Grosz, J. Yoo, C. W. Beattie (1994): A genetic linkage map for cattle. *Genetics* 136: 619-639.
- Black, G. C., Z. Y. Chen, I. W. Craig, J. F. Powell (1991): Dinucleotide repeat polymorphism at the MAOA locus. *Nucleic Acids Research* 19: 689.
- Boffelli, D., M. A. Nobrega, E. M. Rubin (2004): Comparative genomics at the vertebrate extremes. *Nature Reviews. Genetics* 5: 456-465.
- Boichard, D., C. Grohs, F. Bourgeois, F. Cerqueira, R. Faugeras, A. Neau, R. Rupp, Y. Amigues, M. Y. Boscher, H. Leveziel (2003): Detection of genes influencing economic traits in three French dairy cattle breeds. *Genetics, Selection, Evolution.: GSE* 35: 77-101.

- Boissy, A., M. F. Bouissou** (1988): Effects of early handling on heifer's subsequent reactivity to humans and to unfamiliar situations. *Applied Animal Behaviour Science* 20: 259-273.
- Boivin, X., P. Le Neindre, J. M. Chupin** (1992): Establishment of cattle-human relationships. *Applied Animal Behaviour Science* 32: 325-335.
- Botstein, D., R. L. White, M. Skolnick, R. W. Davis** (1980): Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* 32: 314-331.
- Bourin, M., M. Malinge, E. Vasar, J. Bradwejn** (1996): Two faces of cholecystokinin: anxiety and schizophrenia. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 10: 116-126.
- Bradwejn, J., D. Koszycki, A. Couetoux du Tertre, H. van Megen, J. den Boer, H. Westenberg** (1994): The panicogenic effects of cholecystokinin-tetrapeptide are antagonized by L-365,260, a central cholecystokinin receptor antagonist, in patients with panic disorder. *Archives of General Psychiatry* 51: 486-493.
- Brem, G., H. Kräublich, G. Stranzinger** (1991): Experimentelle Genetik in der Tierzucht - Grundlagen für spezielle Verfahren der Biotechnik, Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart.
- Brownstein, M. J., J. D. Carpten, J. R. Smith** (1996): Modulation of non-templated nucleotide addition by Taq DNA polymerase: primer modifications that facilitate genotyping. *BioTechniques* 20: 1004-1006, 1008-1010.
- Brunner, H. G., M. Nelen, X. O. Breakefield, H. H. Ropers, B. A. van Oost** (1993a): Abnormal behavior associated with a point mutation in the structural gene for monoamine oxidase A. *Science* 262: 578-580.
- Brunner, H. G., M. R. Nelen, P. van Zandvoort, N. G. Abeling, A. H. van Gennip, E. C. Wolters, M. A. Kuiper, H. H. Ropers, B. A. van Oost** (1993b): X-linked borderline mental retardation with prominent behavioral disturbance: phenotype, genetic localization, and evidence for disturbed monoamine metabolism. *American Journal of Human Genetics* 52: 1032-1039.
- Buitenhuis, A. J., M. S. Lund, J. R. Thomasen, B. Thomsen, V. H. Nielsen, C. Bendixen, B. Guldbrandtsen** (2007): Detection of quantitative trait loci affecting lameness and leg conformation traits in Danish Holstein cattle. *Journal of Dairy Science* 90: 472-481.
- Burrow, H. M.** (1997): Measurement of temperament and their relationship with performance traits of beef cattle. *Animal Breeding Abstracts*: 478-495.
- Casanova, L., C. Frei-Tschopp, O. Grüter, J. Moll** (2003): Erbfehler und Erbhygiene am Beispiel des Braunviehs. Erbfehler und Erbhygiene beim Rind - Seminar des Genetischen Ausschusses der ZAR, Salzburg.
- Cases, O., I. Seif, J. Grimsby, P. Gaspar, K. Chen, S. Pournin, U. Muller, M. Aguet, C. Babinet, J. C. Shih, E. De Maeyer** (1995): Aggressive behavior and altered amounts of brain serotonin and norepinephrine in mice lacking MAOA. *Science* 268: 1763-1766.
- Caspi, A., J. McClay, T. E. Moffitt, J. Mill, J. Martin, I. W. Craig, A. Taylor, R. Poulton** (2002): Role of genotype in the cycle of violence in maltreated children. *Science* 297: 851-854.
- Chen, K., D. P. Holschneider, W. Wu, I. Rebrin, J. C. Shih** (2004): A spontaneous point mutation produces monoamine oxidase A/B knock-out mice with greatly elevated monoamines and anxiety-like behavior. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 39645-39652.
- Cheverud, J. M., E. Routman** (1993): Quantitative Trait Loci - Individual Gene Effects on Quantitative Characters. *Journal of Evolutionary Biology* 6: 463-480.
- Ciampolini, R., K. Moazami-Goudarzi, D. Vaiman, C. Dillmann, E. Mazzanti, J. L. Foulley, H. Leveziel, D. Cianci** (1995): Individual multilocus genotypes using

- microsatellite polymorphisms to permit the analysis of the genetic variability within and between Italian beef cattle breeds. *Journal of Animal Science* 73: 3259-3268.
- Civelli, O., J. R. Bunzow, D. K. Grandy** (1993): Molecular diversity of the dopamine receptors. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 33: 281-307.
- Cloninger, C. R.** (1987): A systematic method for clinical description and classification of personality variants. A proposal. *Archives of General Psychiatry* 44: 573-588.
- Cloninger, C. R., D. M. Svrakic, T. R. Przybeck** (1993): A psychobiological model of temperament and character. *Archives of General Psychiatry* 50: 975-990.
- Cohen, H., Z. Kaplan, M. A. Matar, I. Buriakovsky, M. Bourin, M. Kotler** (2004): Different pathways mediated by CCK1 and CCK2 receptors: effect of intraperitoneal mrna antisense oligodeoxynucleotides to cholecystokinin on anxiety-like and learning behaviors in rats. *Depression and Anxiety* 20: 139-152.
- Collier, D. A., M. J. Arranz, P. Sham, S. Battersby, H. Vallada, P. Gill, K. J. Aitchison, M. Sodhi, T. Li, G. W. Roberts, B. Smith, J. Morton, R. M. Murray, D. Smith, G. Kirov** (1996): The serotonin transporter is a potential susceptibility factor for bipolar affective disorder. *Neuroreport* 7: 1675-1679.
- Contini, V., F. Z. Marques, C. E. Garcia, M. H. Hutz, C. H. Bau** (2006): MAOA-uVNTR polymorphism in a Brazilian sample: further support for the association with impulsive behaviors and alcohol dependence. *American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics* 141: 305-308.
- Craig, I. W.** (2007): The importance of stress and genetic variation in human aggression. *BioEssays: News and Reviews in molecular, cellular and developmental Biology* 29: 227-236.
- Crawley, J. N., R. L. Corwin** (1994): Biological actions of cholecystokinin. *Peptides* 15: 731-755.
- Darvasi, A., M. Soller** (1994): Selective DNA pooling for determination of linkage between a molecular marker and a quantitative trait locus. *Genetics* 138: 1365-1373.
- Daugé, V., I. Léna** (1998): CCK in anxiety and cognitive processes. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 22: 815-825.
- Daugé, V., A. Sebret, F. Beslot, T. Matsui, B. P. Roques** (2001): Behavioral profile of CCK2 receptor-deficient mice. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 25: 690-698.
- Davidson, J. R.** (1998): Pharmacotherapy of social anxiety disorder. *The Journal of Clinical Psychiatry* 59 Suppl 17: 47-53.
- Deakin, J. F.** (1991): Depression and 5HT. *International Clinical Psychopharmacology* 6 Suppl.: 23-28.
- Deckert, J., M. Catalano, Y. V. Syagailo, M. Bosi, O. Okladnova, D. Di Bella, M. M. Nothen, P. Maffei, P. Franke, J. Fritze, W. Maier, P. Propping, H. Beckmann, L. Bellodi, K. P. Lesch** (1999): Excess of high activity monoamine oxidase A gene promoter alleles in female patients with panic disorder. *Human Molecular Genetics* 8: 621-624.
- Dekkers, J. C., F. Hospital** (2002): The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations. *Nature Reviews. Genetics* 3: 22-32.
- Désautés, C., J. P. Bidanel, D. Milant, N. Iannuccelli, Y. Amigues, F. Bourgeois, J. C. Caritez, C. Renard, C. Chevalet, P. Mormède** (2002): Genetic linkage mapping of quantitative trait loci for behavioral and neuroendocrine stress response traits in pigs. *Journal of Animal Science* 80: 2276-2285.
- Desbois, C., P. Clerc, I. Le Huerou-Luron, G. Le Drean, M. Gestin, M. Dufresne, D. Fourmy, P. Guilloteau** (1998): Differential tissular expression of the CCK(A) and CCK(B) gastrin receptor genes during postnatal development in the calf. *Life Sciences* 63: 2059-2070.

- Drögemüller, C., A. Wohlke, S. Momke, O. Distl** (2005): Fine mapping of the polled locus to a 1-Mb region on bovine chromosome 1q12. *Mammalian Genome* 16: 613-620.
- Du, L., D. Bakish, A. Ravindran, P. D. Hrdina** (2004): MAO-A gene polymorphisms are associated with major depression and sleep disturbance in males. *Neuroreport* 15: 2097-2101.
- Dufresne, M., C. Escricut, P. Clerc, I. Le Huerou-Luron, H. Prats, V. Bertrand, V. Le Meuth, P. Guilloteau, N. Vaysse, D. Fourmy** (1996): Molecular cloning, developmental expression and pharmacological characterization of the CCKB/gastrin receptor in the calf pancreas. *European Journal of Pharmacology* 297: 165-179.
- Dulawa, S. C., D. K. Grandy, M. J. Low, M. P. Paulus, M. A. Geyer** (1999): Dopamine D4 receptor-knock-out mice exhibit reduced exploration of novel stimuli. *The Journal of Neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 19: 9550-9556.
- Ebstein, R. P., I. Gritsenko, L. Nemanov, A. Frisch, Y. Osher, R. H. Belmaker** (1997): No association between the serotonin transporter gene regulatory region polymorphism and the Tridimensional Personality Questionnaire (TPQ) temperament of harm avoidance. *Molecular Psychiatry* 2: 224-226.
- Ebstein, R. P., O. Novick, R. Umansky, B. Priel, Y. Osher, D. Blaine, E. R. Bennett, L. Nemanov, M. Katz, R. H. Belmaker** (1996): Dopamine D4 receptor (D4DR) exon III polymorphism associated with the human personality trait of Novelty Seeking. *Nature Genetics* 12: 78-80.
- Edmondson, D. E., A. Mattevi, C. Binda, M. Li, F. Hubalek** (2004): Structure and mechanism of monoamine oxidase. *Current Medicinal Chemistry* 11: 1983-1993.
- Ekelund, J., J. Suhonen, M. R. Jarvelin, L. Peltonen, D. Lichtermann** (2001): No association of the -521 C/T polymorphism in the promoter of DRD4 with novelty seeking. *Molecular Psychiatry* 6: 618-619.
- Fahrenkrug, S. C., E. Casas, J. W. Keele, T. P. Smith** (1999): Technical note: direct genotyping of the double-muscling locus (mh) in Piedmontese and Belgian Blue cattle by fluorescent PCR. *Journal of Animal Science* 77: 2028-2030.
- Farook, J. M., Y. Z. Zhu, H. Wang, S. Moochhala, L. Lee, P. T. Wong** (2001): Strain differences in freezing behavior of PVG hooded and Sprague-Dawley rats: differential cortical expression of cholecystokinin2 receptors. *Neuroreport* 12: 2717-2720.
- Fidler, A. E., K. van Oers, P. J. Drent, S. Kuhn, J. C. Mueller, B. Kempenaers** (2007): Drd4 gene polymorphisms are associated with personality variation in a passerine bird. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society* 274: 1685-1691.
- Fink, H., A. Rex, M. Voits, J. P. Voigt** (1998): Major biological actions of CCK--a critical evaluation of research findings. *Experimental brain research. Experimentelle Hirnforschung. Expérimentation cérébrale* 123: 77-83.
- Fiskerstrand, C. E., E. A. Lovejoy, J. P. Quinn** (1999): An intronic polymorphic domain often associated with susceptibility to affective disorders has allele dependent differential enhancer activity in embryonic stem cells. *FEBS letters* 458: 171-174.
- Flint, J.** (2003): Analysis of quantitative trait loci that influence animal behavior. *Journal of neurobiology* 54: 46-77.
- Fordyce, G., R. M. Dodt, J. R. Wythes** (1988a): Cattle temperaments in extensive beef herds in northern Queensland 1. Factors affecting temperament. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 28: 683-687.
- Fordyce, G., J. R. Wythes, W. R. Shorthose, D. W. Underwood, R. K. Shepherd** (1988b): Cattle temperaments in extensive beef herds in northern Queensland 2. Effect of temperament on carcass and meat quality. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 28: 689-693.
- Fuchs, U.** (2003): Die Genomfalle, Ullstein Heyne List GmbH & Co. KG.

- Fujii, J., K. Otsu, F. Zorzato, S. de Leon, V. K. Khanna, J. E. Weiler, P. J. O'Brien, D. H. MacLennan (1991): Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science* 253: 448-451.
- Gasparin, G., M. Miyata, L. L. Coutinho, M. L. Martinez, R. L. Teodoro, J. Furlong, M. A. Machado, M. V. Silva, T. S. Sonstegard, L. C. Regitano (2007): Mapping of quantitative trait loci controlling tick [Rhipicephalus (Boophilus) microplus] resistance on bovine chromosomes 5, 7 and 14. *Animal Genetics* 38: 453-459.
- Gauly, M., H. Mathiak, G. Erhardt (2002): Genetic background of behavioural and plasma cortisol response to repeated short-term separation and tethering of beef calves. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 119: 379-384.
- Gauly, M., H. Mathiak, K. Hoffmann, M. Kraus, G. Erhardt (2001): Estimating genetic variability in temperamental traits in German Angus and German Simmental cattle. *Applied Animal Behaviour Science* 74: 109-119.
- Geha, R. M., K. Chen, J. Wouters, F. Ooms, J. C. Shih (2002): Analysis of conserved active site residues in monoamine oxidase A and B and their three-dimensional molecular modeling. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 17209-17216.
- Geldermann, H. (1975): Investigations on inheritance of quantitative characters in animals by gene markers I. Methods. *Theoretical and Applied Genetics* 46: 319-330.
- Geldermann, H. (2005): Tier-Biotechnologie, Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart.
- Georges, M., A. B. Dietz, A. Mishra, D. Nielsen, L. S. Sargeant, A. Sorensen, M. R. Steele, X. Zhao, H. Leipold, J. E. Womack, M. Lathrop (1993a): Microsatellite mapping of the gene causing weaver disease in cattle will allow the study of an associated quantitative trait locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 1058-1062.
- Georges, M., R. Drinkwater, T. King, A. Mishra, S. S. Moore, D. Nielsen, L. S. Sargeant, A. Sorensen, M. R. Steele, X. Zhao, J. E. Womack, J. Hetzel (1993b): Microsatellite mapping of a gene affecting horn development in Bos taurus. *Nature Genetics* 4: 206-210.
- Georges, M., D. Nielsen, M. Mackinnon, A. Mishra, R. Okimoto, A. T. Pasquino, L. S. Sargeant, A. Sorensen, M. R. Steele, X. Zhao, J. E. Womack, I. Hoeschele (1995): Mapping quantitative trait loci controlling milk production in dairy cattle by exploiting progeny testing. *Genetics* 139: 907-920.
- Gerra, G., L. Garofano, L. Castaldini, F. Rovetto, A. Zaimovic, G. Moi, M. Bussandri, B. Branchi, F. Brambilla, G. Friso, C. Donnini (2005): Serotonin transporter promoter polymorphism genotype is associated with temperament, personality traits and illegal drugs use among adolescents. *Journal of Neural Transmission* 112: 1397-1410.
- Gerra, G., L. Garofano, G. Santoro, S. Bosari, C. Pellegrini, A. Zaimovic, G. Moi, M. Bussandri, A. Moi, F. Brambilla, C. Donnini (2004): Association between low-activity serotonin transporter genotype and heroin dependence: behavioral and personality correlates. *American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics* 126: 37-42.
- Giambra, I. J., L. Chianese, P. Ferranti, G. Erhardt (2009): Genomics and Proteomics of deleted ovine CSN1S1*1. *International Dairy Journal* doi:10.1016/j.idairyj.2009.09.005, im Druck.
- Goldgar, D. E., P. Green, D. M. Parry, J. J. Mulvihill (1989): Multipoint linkage analysis in neurofibromatosis type I: an international collaboration. *American journal of human genetics* 44: 6-12.
- Gonda, M. G., B. W. Kirkpatrick, G. E. Shook, M. T. Collins (2007): Identification of a QTL on BTA20 affecting susceptibility to Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis infection in US Holsteins. *Animal Genetics* 38: 389-396.

- Grandin, T.** (1993): Behavioral agitation during handling of cattle is persistent over time. *Applied Animal Behaviour Science* 36: 1-9.
- Grandin, T.** (1997): Assessment of stress during handling and transport. *Journal of Animal Science* 75: 249-257.
- Grandin, T.** (2005): Ich sehe die Welt wie ein frohes Tier - Eine Autistin entdeckt die Sprache der Tiere, Ullstein Verlag.
- Green, P.** (1992): Construction and comparison of chromosome 21 radiation hybrid and linkage maps using CRI-MAP. *Cytogenetics and Cell Genetics* 59: 122-124.
- Grignard, L., A. Boissy, X. Boivin, J. P. Garel, P. Le Neindre** (2000): The social environment influences the behavioural responses of beef cattle to handling. *Applied Animal Behaviour Science* 68: 1-11.
- Grimsby, J., K. Chen, L. J. Wang, N. C. Lan, J. C. Shih** (1991): Human monoamine oxidase A and B genes exhibit identical exon-intron organization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88: 3637-3641.
- Grobet, L., D. Poncelet, L. J. Royo, B. Brouwers, D. Pirottin, C. Michaux, F. Menissier, M. Zanotti, S. Dunner, M. Georges** (1998): Molecular definition of an allelic series of mutations disrupting the myostatin function and causing double-muscling in cattle. *Mammalian Genome* 9: 210-213.
- Gutiérrez-Gil, B., N. Ball, D. Burton, M. Haskell, J. L. Williams, P. Wiener** (2008): Identification of quantitative trait Loci affecting cattle temperament. *The Journal of Heredity* 99: 629-638.
- Haberfeld, A., D. Kalay, P. Weisberger, O. Gal, J. Hilliel** (1993): Applications of multilocus molecular markers in cattle breeding. *Journal of Dairy Science* 76: 645-652.
- Haegeman, A., J. L. Williams, A. Law, A. Van Zeveren, L. J. Peelman** (2003a): Characterization and mapping of bovine dopamine receptors 1 and 5. *Animal Genetics* 34: 290-293.
- Haegeman, A., J. L. Williams, A. Law, A. Van Zeveren, L. J. Peelman** (2003b): Mapping and SNP analysis of bovine candidate genes for meat and carcass quality. *Animal Genetics* 34: 349-353.
- Hallikainen, T., T. Saito, H. M. Lachman, J. Volavka, T. Pohjalainen, O. P. Ryyanen, J. Kauhanen, E. Syvalahti, J. Hietala, J. Tiihonen** (1999): Association between low activity serotonin transporter promoter genotype and early onset alcoholism with habitual impulsive violent behavior. *Molecular Psychiatry* 4: 385-388.
- Hamada, H., M. G. Petrino, T. Kakunaga** (1982): A novel repeated element with Z-DNA-forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79: 6465-6469.
- Hamada, H., M. G. Petrino, T. Kakunaga, M. Seidman, B. D. Stollar** (1984): Characterization of genomic poly(dT-dG).poly(dC-dA) sequences: structure, organization, and conformation. *Molecular and Cellular Biology* 4: 2610-2621.
- Hamilton, S. P., S. L. Slager, L. Helleby, G. A. Heiman, D. F. Klein, S. E. Hodge, M. M. Weissman, A. J. Fyer, J. A. Knowles** (2001): No association or linkage between polymorphisms in the genes encoding cholecystokinin and the cholecystokinin B receptor and panic disorder. *Molecular Psychiatry* 6: 59-65.
- Hancock, J. M.** (1999): Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. Microsatellites - Evolution and Applications. D. B. Goldstein und C. Schlötterer, Oxford University Press.
- Harada, S., T. Okubo, M. Tsutsumi, S. Takase, T. Muramatsu** (1996): Investigation of genetic risk factors associated with alcoholism. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research* 20: 293A-296A.

- Harro, J.** (2006): CCK and NPY as anti-anxiety treatment targets: promises, pitfalls, and strategies. *Amino Acids* 31: 215-230.
- Harro, J., J. Marcusson, L. Orelund** (1992): Alterations in brain cholecystokinin receptors in suicide victims. *European Neuropsychopharmacology: the Journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 2: 57-63.
- Hasegawa, T., F. Sato, N. Ishida** (2002): Determination and Variability of Nucleotide Sequences for D4 Dopamine Receptor Genes (*DRD4*) in Genus *Equus*. *Journal of Equine Science* 13: 57-62.
- Hattori, E., K. Yamada, T. Toyota, K. Yoshitsugu, M. Toru, H. Shibuya, T. Yoshikawa** (2001): Association studies of the CT repeat polymorphism in the 5' upstream region of the cholecystokinin B receptor gene with panic disorder and schizophrenia in Japanese subjects. *American Journal of Medical Genetics* 105: 779-782.
- Hearnshaw, H., C. A. Morris** (1984): Genetic and Environmental Effects on a Temperament Score in Beef Cattle. *Australian Journal of Agricultural Research* 35: 723-733.
- Heils, A., A. Teufel, S. Petri, M. Seemann, D. Bengel, U. Balling, P. Riederer, K. P. Lesch** (1995): Functional promoter and polyadenylation site mapping of the human serotonin (5-HT) transporter gene. *Journal of Neural Transmission. General Section* 102: 247-254.
- Hejjas, K., J. Vas, J. Topal, E. Szantai, Z. Ronai, A. Szekely, E. Kubinyi, Z. Horvath, M. Sasvari-Szekely, A. Miklosi** (2007): Association of polymorphisms in the dopamine D4 receptor gene and the activity-impulsivity endophenotype in dogs. *Animal Genetics* 38: 629-633.
- Hernandez-Gómez, A. M., R. Aguilar-Roblero, M. Perez de la Mora** (2002): Role of cholecystokinin-A and cholecystokinin-B receptors in anxiety. *Amino Acids* 23: 283-290.
- Hiendleder, S., H. Lewalski, R. Wassmuth, A. Janke** (1998): The complete mitochondrial DNA sequence of the domestic sheep (*Ovis aries*) and comparison with the other major ovine haplotype. *Journal of Molecular Evolution* 47: 441-448.
- Hiendleder, S., H. Thomsen, N. Reinsch, J. Bennewitz, B. Leyhe-Horn, C. Looft, N. Xu, I. Medjugorac, I. Russ, C. Kuhn, G. A. Brockmann, J. Blumel, B. Brenig, F. Reinhardt, R. Reents, G. Averdunk, M. Schwerin, M. Forster, E. Kalm, G. Erhardt** (2003): Mapping of QTL for Body Conformation and Behavior in Cattle. *The Journal of Heredity* 94: 496-506.
- Hoeschele, I., T. R. Meinert** (1990): Association of genetic defects with yield and type traits: the weaver locus effect on yield. *Journal of Dairy Science* 73: 2503-2515.
- Hoh, J., J. Ott** (2001): A train of thoughts on gene mapping. *Theoretical Population Biology* 60: 149-153.
- Holmes, A., D. L. Murphy, J. N. Crawley** (2002a): Reduced aggression in mice lacking the serotonin transporter. *Psychopharmacology* 161: 160-167.
- Holmes, A., R. J. Yang, D. L. Murphy, J. N. Crawley** (2002b): Evaluation of antidepressant-related behavioral responses in mice lacking the serotonin transporter. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 27: 914-923.
- Holtkemper, U., B. Rolf, C. Hohoff, P. Forster, B. Brinkmann** (2001): Mutation rates at two human Y-chromosomal microsatellite loci using small pool PCR techniques. *Human Molecular Genetics* 10: 629-633.
- Homberg, J. R., J. D. Olivier, B. M. Smits, J. D. Mul, J. Mudde, M. Verheul, O. F. Nieuwenhuizen, A. R. Cools, E. Ronken, T. Cremers, A. N. Schoffeleer, B. A. Ellenbroek, E. Cuppen** (2007): Characterization of the serotonin transporter knockout rat: a selective change in the functioning of the serotonergic system. *Neuroscience* 146: 1662-1676.

- Horinouchi, Y., J. Akiyoshi, A. Nagata, H. Matsushita, T. Tsutsumi, K. Isogawa, T. Noda, H. Nagayama (2004): Reduced anxious behavior in mice lacking the CCK2 receptor gene. *European Neuropsychopharmacology: the Journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 14: 157-161.
- Hösing, V. G., A. Schirmacher, G. Kuhlenbaumer, C. Freitag, P. Sand, C. Schlesiger, C. Jacob, J. Fritze, P. Franke, M. Rietschel, H. Garritsen, M. M. Nothen, R. Fimmers, F. Stogbauer, J. Deckert (2004): Cholecystokinin- and cholecystokinin-B-receptor gene polymorphisms in panic disorder. *Journal of Neural Transmission. Supplementum*: 147-156.
- Hotamisligil, G. S., X. O. Breakefield (1991): Human monoamine oxidase A gene determines levels of enzyme activity. *American Journal of Human Genetics* 49: 383-392.
- Hu, Z. L., E. R. Fritz, J. M. Reecy (2007): AnimalQTLdb: a livestock QTL database tool set for positional QTL information mining and beyond. *Nucleic Acids Research* 35: D604-609.
- Hu, Z. L., J. M. Reecy (2007): Animal QTLdb: beyond a repository. A public platform for QTL comparisons and integration with diverse types of structural genomic information. *Mammalian Genome* 18: 1-4.
- Ihara, N., A. Takasuga, K. Mizoshita, H. Takeda, M. Sugimoto, Y. Mizoguchi, T. Hirano, T. Itoh, T. Watanabe, K. M. Reed, W. M. Snelling, S. M. Kappes, C. W. Beattie, G. L. Bennett, Y. Sugimoto (2004): A comprehensive genetic map of the cattle genome based on 3802 microsatellites. *Genome Research* 14: 1987-1998.
- Inoue-Murayama, M., N. Matsuura, Y. Murayama, T. Tsubota, T. Iwasaki, H. Kitagawa, S. Ito (2002): Sequence comparison of the dopamine receptor D4 exon III repetitive region in several species of the order Carnivora. *The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science* 64: 747-749.
- ISAG (2003): Recommended ISAG panels of markers for parentage verification. www.isag.org.uk.
- Ito, H., H. Nara, M. Inoue-Murayama, M. K. Shimada, A. Koshimura, Y. Ueda, H. Kitagawa, Y. Takeuchi, Y. Mori, Y. Murayama, M. Morita, T. Iwasaki, K. Ota, Y. Tanabe, S. Ito (2004): Allele frequency distribution of the canine dopamine receptor D4 gene exon III and I in 23 breeds. *The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science* 66: 815-820.
- Itoh, T., T. Watanabe, N. Ihara, P. Mariani, C. W. Beattie, Y. Sugimoto, A. Takasuga (2005): A comprehensive radiation hybrid map of the bovine genome comprising 5593 loci. *Genomics* 85: 413-424.
- Jann, O. C., J. Aerts, M. Jones, N. Hastings, A. Law, S. McKay, E. Marques, A. Prasad, J. Yu, S. S. Moore, S. Floriot, M. F. Mahe, A. Eggen, L. Silveri, R. Negrini, E. Milanesi, P. Ajmone-Marsan, A. Valentini, C. Marchitelli, M. C. Savarese, M. Janitz, R. Herwig, S. Hennig, C. Gorni, E. E. Connor, T. S. Sonstegard, T. Smith, C. Drogemuller, J. L. Williams (2006): A second generation radiation hybrid map to aid the assembly of the bovine genome sequence. *BMC Genomics* 7: 283-297.
- Joerg, H., H. R. Fries, E. Meijerink, G. F. Stranzinger (1996): Red coat color in Holstein cattle is associated with a deletion in the MSHR gene. *Mammalian Genome* 7: 317-318.
- Jönsson, E. G., G. C. Sedvall, M. M. Nothen, S. Cichon (2003): Dopamine D4 receptor gene (DRD4) variants and schizophrenia: meta-analyses. *Schizophrenia Research* 61: 111-119.
- Kaiser, R., B. Muller-Oerlinghausen, D. Filler, P. B. Tremblay, A. Berghofer, I. Roots, J. Brockmoller (2002): Correlation between serotonin uptake in human blood platelets

- with the 44-bp polymorphism and the 17-bp variable number of tandem repeat of the serotonin transporter. *American Journal of Medical Genetics* 114: 323-328.
- Kalinowski, S. T., M. L. Taper, T. C. Marshall** (2007): Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* 16: 1099-1106.
- Kalueff, A. V., P. S. Gallagher, D. L. Murphy** (2006): Are serotonin transporter knockout mice 'depressed'? hypoactivity but no anhedonia. *Neuroreport* 17: 1347-1351.
- Katsuragi, S., H. Kunugi, A. Sano, T. Tsutsumi, K. Isogawa, S. Nanko, J. Akiyoshi** (1999): Association between serotonin transporter gene polymorphism and anxiety-related traits. *Biological Psychiatry* 45: 368-370.
- Kaupe, B., A. Winter, R. Fries, G. Erhardt** (2004): DGAT1 polymorphism in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle breeds. *The Journal of Dairy Research* 71: 182-187.
- Kawada, Y., M. Hattori, X. Y. Dai, S. Nanko** (1995): Possible association between monoamine oxidase A gene and bipolar affective disorder. *American Journal of Human Genetics* 56: 335-336.
- Kawasaki, A., C. Kyogoku, J. Ohashi, R. Miyashita, K. Hikami, M. Kusaoi, K. Tokunaga, Y. Takasaki, H. Hashimoto, T. W. Behrens, N. Tsuchiya** (2008): Association of IRF5 polymorphisms with systemic lupus erythematosus in a Japanese population: support for a crucial role of intron 1 polymorphisms. *Arthritis and Rheumatism* 58: 826-834.
- Keating, K. E., K. A. Quane, B. M. Manning, M. Lehane, E. Hartung, K. Censier, A. Urwyler, M. Klausnitzer, C. R. Muller, J. J. Heffron, T. V. McCarthy** (1994): Detection of a novel RYR1 mutation in four malignant hyperthermia pedigrees. *Human Molecular Genetics* 3: 1855-1858.
- Kehrli, M. E., Jr., M. R. Ackermann, D. E. Shuster, M. J. van der Maaten, F. C. Schmalstieg, D. C. Anderson, B. J. Hughes** (1992): Bovine leukocyte adhesion deficiency. Beta 2 integrin deficiency in young Holstein cattle. *The American Journal of Pathology* 140: 1489-1492.
- Keltikangas-Jarvinen, L., M. Elovainio, M. Kivimaki, D. Lichtermann, J. Ekelund, L. Peltonen** (2003): Association between the type 4 dopamine receptor gene polymorphism and novelty seeking. *Psychosomatic Medicine* 65: 471-476.
- Kemp, D. J., D. B. Smith, S. J. Foote, N. Samaras, M. G. Peterson** (1989): Colorimetric detection of specific DNA segments amplified by polymerase chain reactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86: 2423-2427.
- Kennedy, J. L., J. Bradwejn, D. Koszycki, N. King, R. Crowe, J. Vincent, O. Fourie** (1999): Investigation of cholecystokinin system genes in panic disorder. *Molecular Psychiatry* 4: 284-285.
- Kim, S., A. Misra** (2007): SNP genotyping: technologies and biomedical applications. *Annual Review of Biomedical Engineering* 9: 289-320.
- Kim, S. J., Y. S. Kim, C. H. Kim, H. S. Lee** (2006): Lack of association between polymorphisms of the dopamine receptor D4 and dopamine transporter genes and personality traits in a Korean population. *Yonsei Medical Journal* 47: 787-792.
- Klungland, H., A. Sabry, B. Heringstad, H. G. Olsen, L. Gomez-Raya, D. I. Vage, I. Olsaker, J. Odegard, G. Klemetsdal, N. Schulman, J. Vilkkki, J. Ruane, M. Aasland, K. Ronningen, S. Lien** (2001): Quantitative trait loci affecting clinical mastitis and somatic cell count in dairy cattle. *Mammalian Genome* 12: 837-842.
- Klungland, H., D. I. Vage, L. Gomez-Raya, S. Adalsteinsson, S. Lien** (1995): The role of melanocyte-stimulating hormone (MSH) receptor in bovine coat color determination. *Mammalian Genome* 6: 636-639.

- Kolbehdari, D., Z. Wang, J. R. Grant, B. Murdoch, A. Prasad, Z. Xiu, E. Marques, P. Stothard, S. S. Moore (2008): A Whole-Genome Scan to Map Quantitative Trait Loci for Conformation and Functional Traits in Canadian Holstein Bulls. *Journal of Dairy Science* 99: 2844-2856.
- Kuhn, C., J. Bennewitz, N. Reinsch, N. Xu, H. Thomsen, C. Looft, G. A. Brockmann, M. Schwerin, C. Weimann, S. Hiendleder, G. Erhardt, I. Medjugorac, M. Forster, B. Brenig, F. Reinhardt, R. Reents, I. Russ, G. Averdunk, J. Blumel, E. Kalm (2003): Quantitative trait loci mapping of functional traits in the German Holstein cattle population. *Journal of Dairy Science* 86: 360-368.
- Kühn, K. U., K. Meyer, M. M. Nothen, M. Gansicke, A. Papassotiropoulos, W. Maier (1999): Allelic variants of dopamine receptor D4 (DRD4) and serotonin receptor 5HT2c (HTR2c) and temperament factors: replication tests. *American Journal of Medical Genetics* 88: 168-172.
- Kumar, A., B. Ghosh (2008): A single nucleotide polymorphism (A --> G) in intron 3 of IFNgamma gene is associated with asthma. *Genes and Immunity* 9: 294-301.
- Kunugi, H., M. Hattori, T. Kato, M. Tatsumi, T. Sakai, T. Sasaki, T. Hirose, S. Nanko (1997): Serotonin transporter gene polymorphisms: ethnic difference and possible association with bipolar affective disorder. *Molecular Psychiatry* 2: 457-462.
- Kunugi, H., M. Tatsumi, T. Sakai, M. Hattori, S. Nanko (1996): Serotonin transporter gene polymorphism and affective disorder. *Lancet* 347: 1340.
- Landeskuratorium der Erzeugerringe für tierische Veredelung in Bayern e.V. (2006): Wie sicher ist die MLP? http://www.lkv.bayern.de/akt/mlp_seiten.pdf.
- Larkin, D. M., A. Everts-van der Wind, M. Rebeiz, P. A. Schweitzer, S. Bachman, C. Green, C. L. Wright, E. J. Campos, L. D. Benson, J. Edwards, L. Liu, K. Osoegawa, J. E. Womack, P. J. de Jong, H. A. Lewin (2003): A cattle-human comparative map built with cattle BAC-ends and human genome sequence. *Genome Research* 13: 1966-1972.
- Larsen, S. A., L. Mogensen, R. Dietz, H. J. Baagoe, M. Andersen, T. Werge, H. B. Rasmussen (2005): Identification and characterization of tandem repeats in exon III of dopamine receptor D4 (DRD4) genes from different mammalian species. *DNA and Cell Biology* 24: 795-804.
- Lawson, D. C., D. Turic, K. Langley, H. M. Pay, C. F. Govan, N. Norton, M. L. Hamshere, M. J. Owen, M. C. O'Donovan, A. Thapar (2003): Association analysis of monoamine oxidase A and attention deficit hyperactivity disorder. *American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics* 116: 84-89.
- Le Dréan, G., I. Le Huerou-Luron, M. Gestin, C. Desbois, V. Rome, C. Bernard, M. Dufresne, L. Moroder, D. Gully, J. A. Chayvialle, D. Fourmy, P. Guilloteau (1999): Exogenous CCK and gastrin stimulate pancreatic exocrine secretion via CCK-A but also via CCK-B/gastrin receptors in the calf. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* 438: 86-93.
- Le Neindre, P., G. Trillat, J. Sapa, F. Menissier, J. N. Bonnet, J. M. Chupin (1995): Individual differences in docility in Limousin cattle. *Journal of Animal Science* 73: 2249-2253.
- Lesch, K. P., U. Balling, J. Gross, K. Strauss, B. L. Wolozin, D. L. Murphy, P. Riederer (1994): Organization of the human serotonin transporter gene. *Journal of Neural Transmission. General Section* 95: 157-162.
- Lesch, K. P., D. Bengel, A. Heils, S. Z. Sabol, B. D. Greenberg, S. Petri, J. Benjamin, C. R. Muller, D. H. Hamer, D. L. Murphy (1996): Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science* 274: 1527-1531.

- Lesch, K. P., L. Gutknecht** (2005): Pharmacogenetics of the serotonin transporter. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 29: 1062-1073.
- Lesch, K. P., U. Merschedorf** (2000): Impulsivity, aggression, and serotonin: a molecular psychobiological perspective. *Behavioral Sciences & The Law* 18: 581-604.
- Lesch, K. P., J. Meyer, K. Glatz, G. Flugge, A. Hinney, J. Hebebrand, S. M. Klauck, A. Poustka, F. Poustka, D. Bengel, R. Mossner, P. Riederer, A. Heils** (1997): The 5-HT transporter gene-linked polymorphic region (5-HTTLPR) in evolutionary perspective: alternative biallelic variation in rhesus monkeys. Rapid communication. *Journal of Neural Transmission* 104: 1259-1266.
- Lesch, K. P., R. Mössner** (1998): Genetically driven variation in serotonin uptake: is there a link to affective spectrum, neurodevelopmental, and neurodegenerative disorders? *Biological Psychiatry* 44: 179-192.
- Levinson, G., G. A. Gutman** (1987): Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Molecular Biology and Evolution* 4: 203-221.
- Lim, L. C., J. F. Powell, R. Murray, M. Gill** (1994): Monoamine oxidase A gene and bipolar affective disorder. *American Journal of Human Genetics* 54: 1122-1124.
- Litt, M., J. A. Luty** (1989): A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics* 44: 397-401.
- Livak, K. J., J. Rogers, J. B. Lichter** (1995): Variability of dopamine D4 receptor (DRD4) gene sequence within and among nonhuman primate species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 427-431.
- Livingston, M. G., H. M. Livingston** (1996): Monoamine oxidase inhibitors. An update on drug interactions. *Drug Safety: an International Journal of Medical Toxicology and Drug Experience* 14: 219-227.
- Löffler, G., P. E. Petrides** (1998): Biochemie und Pathobiochemie, Springer-Verlag.
- Löhner, L.** (1939): Über das spezifische Gewicht der Leukocyten und Thrombocyten. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* 242: 509-514.
- Lühken, G.** (2007): Molekulare Charakterisierung des Interleukin-2-Gens von Schaf-, Ziegen- und Rinderarten sowie Kartierung und funktionelle Analyse von DNA-Varianten des Interleukin-2-Gens von *Ovis aries*. Dissertation Fachbereich Veterinärmedizin, Institut für Tierzucht und Haustiergenetik, Justus-Liebig-Universität, Gießen; VVB Lauferweiler Verlag.
- Lund, M. S., G. Sahana, L. Andersson-Eklund, N. Hastings, A. Fernandez, N. Schulman, B. Thomsen, S. Viitala, J. L. Williams, A. Sabry, H. Viinalass, J. Vilkkki** (2007): Joint analysis of quantitative trait loci for clinical mastitis and somatic cell score on five chromosomes in three Nordic dairy cattle breeds. *Journal of Dairy Science* 90: 5282-5290.
- Lung, F. W., P. Yang, T. S. Cheng, W. T. Kao** (2006): No allele variation of the MAOA gene promoter in male Chinese subjects with attention deficit hyperactivity disorder. *Neuropsychobiology* 54: 147-151.
- Lymbery, A. J.** (1996): Finding Genetic Markers for Complex Phenotypic Traits in Parasites. *International Journal for Parasitology* 26: 7-17.
- Machado, M. B. B., M. A. Alencar, A. P. Pereira, H. N. Oliveira, E. Casas, L. L. Coutinho, L. C. A. Regitano** (2003): QTL affecting body weight in a candidate region of cattle chromosome 5. *Genetics and Molecular Biology* 26: 259-265.
- MacKenzie, A., J. Quinn** (1999): A serotonin transporter gene intron 2 polymorphic region, correlated with affective disorders, has allele-dependent differential enhancer-like properties in the mouse embryo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 15251-15255.

- Makalowski, W.** (2001): The human genome structure and organization. *Acta Biochimica Polonica* 48: 587-598.
- Männistö, P. T., A. Lang, J. Harro, E. Peuranen, J. Bradwejn, E. Vasar** (1994): Opposite effects mediated by CCKA and CCKB receptors in behavioural and hormonal studies in rats. *Naumyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 349: 478-484.
- Marshall, T. C., J. Slate, L. E. Kruuk, J. M. Pemberton** (1998): Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology* 7: 639-655.
- Mateus, J. C., M. C. Penedo, V. C. Alves, M. Ramos, T. Rangel-Figueiredo** (2004): Genetic diversity and differentiation in Portuguese cattle breeds using microsatellites. *Animal Genetics* 35: 106-113.
- Mathews, T. A., D. E. Fedele, F. M. Coppelli, A. M. Avila, D. L. Murphy, A. M. Andrews** (2004): Gene dose-dependent alterations in extraneuronal serotonin but not dopamine in mice with reduced serotonin transporter expression. *Journal of Neuroscience Methods* 140: 169-181.
- Mathiak, H.** (2002): Genetische Parameter von Merkmalen des Temperamentes und der Umgänglichkeit bei den Rassen Deutsche Angus und Deutsches Fleckvieh. Dissertation Fachbereich Agrarwissenschaften, Oekotrophologie und Umweltmanagement, Institut für Tierzucht und Haustiergenetik, Justus-Liebig-Universität, Gießen; Fachverlag Köhler.
- McCauley, J. L., L. M. Olson, M. Dowd, T. Amin, A. Steele, R. D. Blakely, S. E. Folstein, J. L. Haines, J. S. Sutcliffe** (2004): Linkage and association analysis at the serotonin transporter (SLC6A4) locus in a rigid-compulsive subset of autism. *American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics* 127: 104-112.
- McPherron, A. C., S. J. Lee** (1997): Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 12457-12461.
- Mejia, J. M., F. R. Ervin, R. M. Palmour, R. E. Tremblay** (2001): Aggressive behavior and Brunner syndrome: no evidence for the C936T mutation in a population sample. *American Journal of Medical Genetics* 105: 396-397.
- Miyasaka, K., S. Kobayashi, M. Ohta, S. Kanai, Y. Yoshida, A. Nagata, T. Matsui, T. Noda, S. Takiguchi, Y. Takata, T. Kawanami, A. Funakoshi** (2002): Anxiety-related behaviors in cholecystokinin-A, B, and AB receptor gene knockout mice in the plus-maze. *Neuroscience Letters* 335: 115-118.
- Mogensen, L., C. C. Kinze, T. Werge, H. B. Rasmussen** (2006): Identification and characterization of a tandem repeat in exon III of the dopamine receptor D4 (DRD4) gene in cetaceans. *The Journal of Heredity* 97: 279-284.
- Momozawa, Y., Y. Takeuchi, R. Kusunose, T. Kikusui, Y. Mori** (2005): Association between equine temperament and polymorphisms in dopamine D4 receptor gene. *Mammalian Genome* 16: 538-544.
- Montgomery, G. W., J. A. Sise** (1990): Extraction of DNA from sheep white blood cells. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 33: 437-441.
- Moore, S. S., K. Byrne, K. T. Berger, W. Barendse, F. McCarthy, J. E. Womack, D. J. Hetzel** (1994): Characterization of 65 bovine microsatellites. *Mammalian Genome* 5: 84-90.
- Mormède, P.** (2005): Molecular genetics of behaviour: research strategies and perspectives for animal production. *Livestock Production Science* 93: 15-21.
- Mormède, P., H. Courvoisier, A. Ramos, N. Marissal-Arvy, O. Ousova, C. Desautes, M. Duclos, F. Chaouloff, M. P. Moisan** (2002): Molecular genetic approaches to investigate individual variations in behavioral and neuroendocrine stress responses. *Psychoneuroendocrinology* 27: 563-583.

- Mortensen, O. V., A. S. Kristensen, G. Rudnick, O. Wiborg** (1999): Molecular cloning, expression and characterization of a bovine serotonin transporter. *Brain Research. Molecular Brain Research* 71: 120-126.
- Mulcrone, J., R. W. Kerwin** (1996): No difference in the expression of the D4 gene in post-mortem frontal cortex from controls and schizophrenics. *Neuroscience Letters* 219: 163-166.
- Mülhardt, C.** (2006): Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics, Elsevier GmbH, Spektrum Akademischer Verlag.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, H. Erlich** (1992): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology (Reading, Mass.)* 24: 17-27.
- Nagarkatti, R., R. Kumar, S. K. Sharma, B. Ghosh** (2004): Association of IL4 gene polymorphisms with asthma in North Indians. *International Archives of Allergy and Immunology* 134: 206-212.
- Naylor, L. H., E. M. Clark** (1990): d(TG)n.d(CA)n sequences upstream of the rat prolactin gene form Z-DNA and inhibit gene transcription. *Nucleic Acids Research* 18: 1595-1601.
- Newman, T. K., Y. V. Syagailo, C. S. Barr, J. R. Wendland, M. Champoux, M. Graessle, S. J. Suomi, J. D. Higley, K. P. Lesch** (2005): Monoamine oxidase A gene promoter variation and rearing experience influences aggressive behavior in rhesus monkeys. *Biological Psychiatry* 57: 167-172.
- Newton, C. R., A. Graham** (1994): PCR, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg; Berlin; Oxford.
- Ng-Kwai-Hang, K. F., J. F. Hayes, J. E. Moxley, H. G. Monardes** (1984): Association of genetic variants of casein and milk serum proteins with milk, fat, and protein production by dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 67: 835-840.
- Nicholl, D. S. T.** (1995): Gentechnische Methoden, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg; Berlin; Oxford.
- Niimi, Y., M. Inoue-Murayama, K. Kato, N. Matsuura, Y. Murayama, S. Ito, Y. Momoi, K. Konno, T. Iwasaki** (2001): Breed differences in allele frequency of the dopamine receptor D4 gene in dogs. *The Journal of Heredity* 92: 433-436.
- Niimi, Y., M. Inoue-Murayama, Y. Murayama, S. Ito, T. Iwasaki** (1999): Allelic variation of the D4 dopamine receptor polymorphic region in two dog breeds, Golden retriever and Shiba. *The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science* 61: 1281-1286.
- Noble, F., B. P. Roques** (1999): CCK-B receptor: chemistry, molecular biology, biochemistry and pharmacology. *Progress in Neurobiology* 58: 349-379.
- Noble, F., B. P. Roques** (2002): Phenotypes of mice with invalidation of cholecystokinin (CCK(1) or CCK(2)) receptors. *Neuropeptides* 36: 157-170.
- Oak, J. N., J. Oldenhof, H. H. Van Tol** (2000): The dopamine D(4) receptor: one decade of research. *European Journal of Pharmacology* 405: 303-327.
- Ogilvie, A. D., S. Battersby, V. J. Bubb, G. Fink, A. J. Harmar, G. M. Goodwin, C. A. Smith** (1996): Polymorphism in serotonin transporter gene associated with susceptibility to major depression. *Lancet* 347: 731-733.
- Ohno, K., M. Tanaka, H. Ino, H. Suzuki, M. Tashiro, T. Ibi, K. Sahashi, A. Takahashi, T. Ozawa** (1991): Direct DNA sequencing from colony: analysis of multiple deletions of mitochondrial genome. *Biochimica et Biophysica Acta* 1090: 9-16.
- Oki, H., R. Kusunose, H. Nakaoka, A. Nishiura, T. Miyake, Y. Sasaki** (2007): Estimation of heritability and genetic correlation for behavioural responses by Gibbs sampling in the Thoroughbred racehorse. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 124: 185-191.

- Okuyama, Y., H. Ishiguro, M. Toru, T. Arinami** (1999): A genetic polymorphism in the promoter region of DRD4 associated with expression and schizophrenia. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 258: 292-295.
- Peter, C.** (2005): Molekulargenetische Charakterisierung von Schafrassen Europas und des Nahen Ostens auf der Basis von Mikrosatelliten. Dissertation Fachbereich Veterinärmedizin, Institut für Tierzucht und Haustiergenetik, Justus-Liebig-Universität, Gießen; VVB Lauferweiler Verlag.
- Plachta, C.** (2009): Untersuchungen zum Temperament von Dt. Angus und Dt. Fleckvieh Rindern sowie deren reziproken Kreuzung anhand verschiedener Testverfahren unter besonderer Berücksichtigung von Kreuzungseffekten. Dissertation Fachbereich Veterinärmedizin, Institut für Tierzucht und Haustiergenetik, Justus-Liebig-Universität, Gießen; VVB Lauferweiler Verlag.
- Polineni, P., P. Aragonda, S. R. Xavier, R. Furuta, D. L. Adelson** (2006): The bovine QTL viewer: a web accessible database of bovine Quantitative Trait Loci. *BMC Bioinformatics* 7: 283.
- Pommier, B., F. Beslot, A. Simon, M. Pophillat, T. Matsui, V. Dauge, B. P. Roques, F. Noble** (2002): Deletion of CCK2 receptor in mice results in an upregulation of the endogenous opioid system. *The Journal of Neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 22: 2005-2011.
- Popova, N. K.** (2008): From gene to aggressive behavior: The role of brain serotonin. *Neuroscience and Behavioral Physiology*: 471-475.
- Popova, N. K., Y. A. Skrinskaya, T. G. Amstislavskaya, G. B. Vishnivetskaya, I. Seif, E. de Meier** (2001): Behavioral characteristics of mice with genetic knockout of monoamine oxidase type A. *Neuroscience and Behavioral Physiology* 31: 597-602.
- Powell, J. F., Y. P. Hsu, W. Weyler, S. A. Chen, J. Salach, K. Andrikopoulos, J. Mallet, X. O. Breakefield** (1989): The primary structure of bovine monoamine oxidase type A. Comparison with peptide sequences of bovine monoamine oxidase type B and other flavoenzymes. *The Biochemical Journal* 259: 407-413.
- Prasad, A., T. Schiex, S. McKay, B. Murdoch, Z. Wang, J. E. Womack, P. Stothard, S. S. Moore** (2007): High resolution radiation hybrid maps of bovine chromosomes 19 and 29: comparison with the bovine genome sequence assembly. *BMC Genomics* 8: 310-319.
- Quane, K. A., H. Ordning, K. E. Keating, B. M. Manning, R. Heine, D. Bendixen, K. Berg, R. Krivosic-Horber, F. Lehmann-Horn, T. Fagerlund, T. V. McCarthy** (1997): Detection of a novel mutation at amino acid position 614 in the ryanodine receptor in malignant hyperthermia. *British Journal of Anaesthesia* 79: 332-337.
- Rasmussen, H. B., M. A. Kelly, J. Clausen** (2001): Genetic susceptibility to multiple sclerosis: detection of polymorphic nucleotides and an intron in the 3' untranslated region of the major histocompatibility complex class II transactivator gene. *Human Immunology* 62: 371-377.
- Raud, S., K. Runkorg, A. Veraksits, A. Reimets, A. Nelovkov, U. Abramov, T. Matsui, M. Bourin, V. Volke, S. Koks, E. Vasar** (2003): Targeted mutation of CCK2 receptor gene modifies the behavioural effects of diazepam in female mice. *Psychopharmacology* 168: 417-425.
- Ressler, K. J., C. B. Nemeroff** (2000): Role of serotonergic and noradrenergic systems in the pathophysiology of depression and anxiety disorders. *Depression and Anxiety* 12 Suppl.: 2-19.
- Riva, J., G. Bondiolotti, M. Michelazzi, M. Verga, C. Carenzi** (2008): Anxiety related behavioural disorders and neurotransmitters in dogs. *Applied Animal Behaviour Science* 114: 168-181.

- Roberts, D. A., D. Balderson, S. M. Pickering-Brown, J. F. Deakin, F. Owen (1996): The relative abundance of dopamine D4 receptor mRNA in post mortem brains of schizophrenics and controls. *Schizophrenia Research* 20: 171-174.
- Rodrigues, K. P., P. A. Souza, P. M. Lima, W. O. Dutra, H. Correa, M. A. Romano-Silva (2005): Expression of D3 and D4 dopamine receptors in leukocytes is related to schizophrenic symptoms. *Schizophrenia Research* 80: 363-365.
- Roubertoux, P. L., I. Le Roy-Duflos (2001): Quantitative trait locus mapping: fishing strategy or replicable results? *Behavior Genetics* 31: 141-148.
- Rozen, S., H. Skaletsky (2000): Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 132: 365-386.
- Rubinstein, M., T. J. Phillips, J. R. Bunzow, T. L. Falzone, G. Dziewczapolski, G. Zhang, Y. Fang, J. L. Larson, J. A. McDougall, J. A. Chester, C. Saez, T. A. Pugsley, O. Gershanik, M. J. Low, D. K. Grandy (1997): Mice lacking dopamine D4 receptors are supersensitive to ethanol, cocaine, and methamphetamine. *Cell* 90: 991-1001.
- Sabol, S. Z., S. Hu, D. Hamer (1998): A functional polymorphism in the monoamine oxidase A gene promoter. *Human Genetics* 103: 273-279.
- Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich, N. Arnheim (1985): Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.
- Saito, T., H. M. Lachman, L. Diaz, T. Hallikainen, J. Kauhanen, J. T. Salonen, O. P. Rynanen, M. K. Karvonen, E. Syvalahti, T. Pohjalainen, J. Hietala, J. Tiitonen (2002): Analysis of monoamine oxidase A (MAOA) promoter polymorphism in Finnish male alcoholics. *Psychiatry Research* 109: 113-119.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, T. Maniatis (1989): Molecular Cloning - A laboratory manual. New York, Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Samochowiec, J., K. P. Lesch, M. Rottmann, M. Smolka, Y. V. Syagailo, O. Okladnova, H. Rommelspacher, G. Winterer, L. G. Schmidt, T. Sander (1999): Association of a regulatory polymorphism in the promoter region of the monoamine oxidase A gene with antisocial alcoholism. *Psychiatry Research* 86: 67-72.
- Samochowiec, J., S. Syrek, P. Michal, A. Ryzewska-Wodecka, A. Samochowiec, J. Horodnicki, M. Zakrzewska, J. Kucharska-Mazur (2004): Polymorphisms in the serotonin transporter and monoamine oxidase A genes and their relationship to personality traits measured by the Temperament and Character Inventory and NEO Five-Factor Inventory in healthy volunteers. *Neuropsychobiology* 50: 174-181.
- Schlötterer, C., C. Vogl, D. Tautz (1997): Polymorphism and locus-specific effects on polymorphism at microsatellite loci in natural *Drosophila melanogaster* populations. *Genetics* 146: 309-320.
- Schmutz, S. M., F. L. Marquess, T. G. Berryere, J. S. Moker (1995): DNA marker-assisted selection of the polled condition in Charolais cattle. *Mammalian Genome* 6: 710-713.
- Schmutz, S. M., J. M. Stookey, D. C. Winkelman-Sim, C. S. Waltz, Y. Plante, F. C. Buchanan (2001): A QTL study of cattle behavioral traits in embryo transfer families. *The Journal of Heredity* 92: 290-292.
- Schrooten, C., H. Bovenhuis, W. Coppieters, J. A. Van Arendonk (2000): Whole genome scan to detect quantitative trait loci for conformation and functional traits in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 83: 795-806.
- Schuback, D. E., E. L. Mulligan, K. B. Sims, E. A. Tivol, B. D. Greenberg, S. F. Chang, S. L. Yang, Y. C. Mau, C. Y. Shen, M. S. Ho, N. H. Yang, M. G. Butler, S. Fink, C. E. Schwartz, F. Berlin, X. O. Breakefield, D. L. Murphy, Y. P. Hsu (1999): Screen for MAOA mutations in target human groups. *American Journal of Medical Genetics* 88: 25-28.

- Schwarzenbacher, H., M. Dolezal (2003): Entwicklung und Anwendung von molekulargenetischen Tests zur Erkennung von Erbfehlern. Erbfehler und Erbhigiene beim Rind - Seminar des Genetischen Ausschusses der ZAR, Salzburg.
- Seaton, G., C. S. Haley, S. A. Knott, M. Kearsey, P. M. Visscher (2002): QTL Express: mapping quantitative trait loci in simple and complex pedigrees. *Bioinformatics (Oxford, England)* 18: 339-340.
- Seeman, P., H. C. Guan, H. H. Van Tol (1993): Dopamine D4 receptors elevated in schizophrenia. *Nature* 365: 441-445.
- Seeman, P., H. H. Van Tol (1994): Dopamine receptor pharmacology. *Trends in Pharmacological Sciences* 15: 264-270.
- Semenova, T. P. (1997): The role of the interaction of serotonin- and noradrenergic systems in regulating behavior, Abstract. *Zhurnal vysshei nervnoi deiatelnosti imeni I P Pavlova* 47: 358-361.
- Sharma, B. S., I. Leyva, F. Schenkel, N. A. Karrow (2006): Association of toll-like receptor 4 polymorphisms with somatic cell score and lactation persistency in Holstein bulls. *Journal of Dairy Science* 89: 3626-3635.
- Sherry, S. T., M. H. Ward, M. Kholodov, J. Baker, L. Phan, E. M. Smigielski, K. Sirotkin (2001): dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Research* 29: 308-311.
- Shimada, M. K., M. Inoue-Murayama, Y. Ueda, M. Maejima, Y. Murayama, O. Takenaka, I. Hayasaka, S. Ito (2004): Polymorphism in the second intron of dopamine receptor D4 gene in humans and apes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 316: 1186-1190.
- Shioe, K., T. Ichimiya, T. Suhara, A. Takano, Y. Sudo, F. Yasuno, M. Hirano, M. Shinohara, M. Kagami, Y. Okubo, M. Nankai, S. Kanba (2003): No association between genotype of the promoter region of serotonin transporter gene and serotonin transporter binding in human brain measured by PET. *Synapse (New York, N.Y.)* 48: 184-188.
- Shuster, D. E., M. E. Kehrli, Jr., M. R. Ackermann, R. O. Gilbert (1992): Identification and prevalence of a genetic defect that causes leukocyte adhesion deficiency in Holstein cattle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89: 9225-9229.
- Sibley, D. R., F. J. Monsma, Jr. (1992): Molecular biology of dopamine receptors. *Trends in Pharmacological Sciences* 13: 61-69.
- Sneppen, K., M. A. Micheelsen, I. B. Dodd (2008): Ultrasensitive gene regulation by positive feedback loops in nucleosome modification. *Molecular Systems Biology* 4: 182.
- Statistisches Bundesamt (2007), www.destatis.de.
- Stefanis, N. C., J. N. Bresnick, R. W. Kerwin, W. N. Schofield, G. McAllister (1998): Elevation of D4 dopamine receptor mRNA in postmortem schizophrenic brain. *Brain Research. Molecular Brain Research* 53: 112-119.
- Strobel, A., F. M. Spinath, A. Angleitner, R. Riemann, K. P. Lesch (2003): Lack of association between polymorphisms of the dopamine D4 receptor gene and personality. *Neuropsychobiology* 47: 52-56.
- Sugiyama, A., M. Inoue-Murayama, M. Miwa, R. Ohashi, B. B. Kayang, M. Mizutani, K. Nirasawa, M. Odai, M. Minezawa, S. Watanabe, S. Ito (2004): Polymorphism of dopamine receptor D4 exon I corresponding region in chicken. *Zoological Science* 21: 941-946.
- Sutcliffe, J. S., R. J. Delahanty, H. C. Prasad, J. L. McCauley, Q. Han, L. Jiang, C. Li, S. E. Folstein, R. D. Blakely (2005): Allelic heterogeneity at the serotonin transporter

- locus (SLC6A4) confers susceptibility to autism and rigid-compulsive behaviors. *American Journal of Human Genetics* 77: 265-279.
- Tachikawa, H., S. Harada, Y. Kawanishi, T. Okubo, H. Shiraishi** (1999): Novel polymorphism in the promoter and coding regions of the human cholecystokinin B receptor gene: an association analysis with schizophrenia. *American Journal of Medical Genetics* 88: 700-704.
- Tautz, D.** (1989): Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research* 17: 6463-6471.
- Tautz, D., M. Renz** (1984): Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research* 12: 4127-4138.
- Thaller, G., W. Kramer, A. Winter, B. Kaupe, G. Erhardt, R. Fries** (2003): Effects of DGAT1 variants on milk production traits in German cattle breeds. *Journal of Animal Science* 81: 1911-1918.
- Thomassen, J. R., B. Guldbrandsen, P. Sorensen, B. Thomsen, M. S. Lund** (2008): Quantitative trait loci affecting calving traits in Danish Holstein cattle. *Journal of Dairy Science* 91: 2098-2105.
- Tipton, K. F., S. Boyce, J. O'Sullivan, G. P. Davey, J. Healy** (2004): Monoamine oxidases: certainties and uncertainties. *Current Medicinal Chemistry* 11: 1965-1982.
- Tulloh, N. M.** (1961a): Behaviour of cattle in yards. I. Weighing, order and behaviour before entering scales. *Animal Behaviour* 9: 25-30.
- Tulloh, N. M.** (1961b): Behaviour of cattle in yards. II. A study of temperament. *Animal Behaviour* 9: 25-30.
- Urban, C.** (2007): Untersuchungen zum genetischen Hintergrund von Temperament und Umgänglichkeit bei Mutterkühen und Kälbern der Rassen Dt. Angus und Dt. Fleckvieh anhand der Validierung von geeigneten Testverfahren. Dissertation Fachbereich Veterinärmedizin, Institut für Tierzucht und Haustiergenetik, Justus-Liebig-Universität, Gießen;
- van Megen, H. J., J. A. den Boer, H. G. Westenberg** (1994): On the significance of cholecystokinin receptors in panic disorder. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 18: 1235-1246.
- Van Tol, H. H., J. R. Bunzow, H. C. Guan, R. K. Sunahara, P. Seeman, H. B. Niznik, O. Civelli** (1991): Cloning of the gene for a human dopamine D4 receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine. *Nature* 350: 610-614.
- Van Tol, H. H., C. M. Wu, H. C. Guan, K. Ohara, J. R. Bunzow, O. Civelli, J. Kennedy, P. Seeman, H. B. Niznik, V. Jovanovic** (1992): Multiple dopamine D4 receptor variants in the human population. *Nature* 358: 149-152.
- Vasar, E., E. Peuranen, J. Harro, A. Lang, L. Oreland, P. T. Mannisto** (1993): Social isolation of rats increases the density of cholecystokinin receptors in the frontal cortex and abolishes the anti-exploratory effect of caerulein. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 348: 96-101.
- Vincze, T., J. Posfai, R. J. Roberts** (2003): NEBcutter: A program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Research* 31: 3688-3691.
- Visscher, P. M., R. Thompson, C. S. Haley** (1996): Confidence intervals in QTL mapping by bootstrapping. *Genetics* 143: 1013-1020.
- Visser, E. K., C. G. van Reenen, H. Hopster, M. B. H. Schilder, J. H. Knaap, A. Barneveld, H. J. Blokhuis** (2001): Quantifying aspects of young horses' temperament: consistency of behavioural variables. *Applied Animal Behaviour Science* 74: 241-258.
- Voisinet, B. D., T. Grandin, J. D. Tatum, S. F. O'Connor, J. J. Struthers** (1997): Feedlot cattle with calm temperaments have higher average daily gains than cattle with excitable temperaments. *Journal of Animal Science* 75: 892-896.

- Vormfelde, S. V., I. Hoell, M. Tzvetkov, K. Jamrozinski, D. Sehr, J. Brockmoller, E. Leibling (2006): Anxiety- and novelty seeking-related personality traits and serotonin transporter gene polymorphisms. *Journal of Psychiatric Research* 40: 568-576.
- Wang, H., P. T. Wong, J. Spiess, Y. Z. Zhu (2005): Cholecystokinin-2 (CCK2) receptor-mediated anxiety-like behaviors in rats. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 29: 1361-1373.
- Wang, H., Y. Z. Zhu, P. T. Wong, J. M. Farook, A. L. Teo, L. K. Lee, S. Mochhala (2003): cDNA microarray analysis of gene expression in anxious PVG and SD rats after cat-freezing test. *Experimental brain research. Experimentelle Hirnforschung. Expérimentation cérébrale* 149: 413-421.
- Weber, J. L. (1990): Informativeness of human (dC-dA)n.(dG-dT)n polymorphisms. *Genomics* 7: 524-530.
- Weimann, C. (2000): Entwicklung von DNA-Markern an den Inhibin-/Aktivin-Genorten bei Schaf, Rind und Ziege. Dissertation Fachbereich Agrarwissenschaften, Oekotrophologie und Umweltmanagement, Institut für Tierzucht und Haustiergenetik, Justus-Liebig-Universität, Gießen; Fachverlag Köhler.
- Weimann, C., M. Kraus, M. Gauly, G. Erhardt (2003): Differences in recombination rates on chromosome 23 between German Angus and German Simmental and breed specific linkage mapping. *Animal Genetics* 34: 229-231.
- Weitzman, J. B. (2003): Tracking evolution's footprints in the genome. *Journal of Biology* 2: 9.
- Wendland, J. R., K. P. Lesch, T. K. Newman, A. Timme, H. Gachot-Neveu, B. Thierry, S. J. Suomi (2006): Differential functional variability of serotonin transporter and monoamine oxidase a genes in macaque species displaying contrasting levels of aggression-related behavior. *Behavior Genetics* 36: 163-172.
- Winter, A., W. Kramer, F. A. Werner, S. Kollers, S. Kata, G. Durstewitz, J. Buitkamp, J. E. Womack, G. Thaller, R. Fries (2002): Association of a lysine-232/alanine polymorphism in a bovine gene encoding acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase (DGAT1) with variation at a quantitative trait locus for milk fat content. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 9300-9305.
- Xing, Q. H., S. N. Wu, Z. G. Lin, H. F. Li, J. D. Yang, G. Y. Feng, M. T. Wang, W. W. Yang, L. He (2003): Association analysis of polymorphisms in the upstream region of the human dopamine D4 receptor gene in schizophrenia. *Schizophrenia Research* 65: 9-14.
- Yamada, K., E. Hattori, M. Shimizu, A. Sugaya, H. Shibuya, T. Yoshikawa (2001): Association studies of the cholecystokinin B receptor and A2a adenosine receptor genes in panic disorder. *Journal of Neural Transmission* 108: 837-848.
- Ye, S., S. Dhillon, X. Ke, A. R. Collins, I. N. Day (2001): An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Research* 29: E88-E88.
- Yeh, F. C., R.-C. Yang, T. Boyle, Z.-H. Ye, J. Mao (1997): POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Online unter <http://www.ualberta.ca/~fyeh/>.
- Yirmiya, N., T. Pilowsky, L. Nemanov, S. Arbelle, T. Feinsilver, I. Fried, R. P. Ebstein (2001): Evidence for an association with the serotonin transporter promoter region polymorphism and autism. *American Journal of Medical Genetics* 105: 381-386.
- Yonekura, S., K. Kitade, G. Furukawa, K. Takahashi, N. Katsumata, K. Katoh, Y. Obara (2002): Effects of aging and weaning on mRNA expression of leptin and CCK receptors in the calf rumen and abomasum. *Domestic Animal Endocrinology* 22: 25-35.
- Youdim, M. B., Y. S. Bakhle (2006): Monoamine oxidase: isoforms and inhibitors in Parkinson's disease and depressive illness. *British Journal of Pharmacology* 147 Suppl 1: S287-S296.

- Ziegle, J. S., Y. Su, K. P. Corcoran, L. Nie, P. E. Mayrand, L. B. Hoff, L. J. McBride, M. N. Kronick, S. R. Diehl** (1992): Application of automated DNA sizing technology for genotyping microsatellite loci. *Genomics* 14: 1026-1031.
- Zimen, E.** (1997): Der Wolf, Knesebeck GmbH & Co. VerlagsKG.

verwendete Internetseiten:

http://cedar.genetics.soton.ac.uk/public_html/primer1.html
<http://genomes.sapac.edu.au/bovineqtl/>
http://oxgrid.angis.org.au/cattle/mouse/500_7.29.html
<http://primer3.sourceforge.net/>
<http://qtl.cap.ed.ac.uk/>
<http://www.animalgenome.org/cattle/>
<http://www.animalgenome.org/QTLdb/cattle.html>
<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>
http://www.ensembl.org/Bos_taurus/Location/Genome
<http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/bovine/>
<http://www.marc.usda.gov/genome/htmls>
<http://www.marc.usda.gov/genome/cattle/cattle.html>
<http://www.marc.usda.gov/genome/htmls/MarkerSearch.jsp?Species=bos>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=unists>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview>
www.genecontrol.de

9 Anhang

Tabelle 1A: Häufigkeit der Größen (1 bis 5) der Vollgeschwistergruppen für die Bullen mit Gesamtzahl Nachkommen und Dauer des Einsatzes des Bullens.

DE-Nr. Bulle	Name Bulle	1	2	3	4	5	Gesamtnach- kommen	Eingesetzte Jahre
DE0665118487	Claudius	3	6	4	18	1	104	4
DE0340386055	Heino	2	7	18	3	-	82	3
DE0665123113	Hiro	29	-	-	-	-	29	1
DE0340118479	Pamtera	2	6	6	18	1	109	4
DE0665094128	Pauker	2	5	6	20	-	110	4
DE0665118486	Vollkorn	4	4	6	19	1	111	4
DE0665124735	Habsburg	16	-	-	-	-	16	1
DE1500244225	Herkan	6	12	11	-	-	63	3
DE0980232295	Honannes	22	11	12	1	-	84	4
DE0932318461	Mambo	19	-	-	-	-	19	1
DE1500258855	Matze	4	8	11	7	-	81	4
DE0576839147	Paros	3	12	10	5	-	77	4
DE0930336668	Poker	7	14	1	-	-	38	2
7760280	Theo	16	10	1	-	-	39	2

Tabelle 2A: Auflistung der zur Bestimmung der Allelfrequenzen der Polymorphismen innerhalb der Rassen verwendeten Mütter.

Rasse	DE-Nr.	Prob_ID	Rasse	DE-Nr.	Prob_ID
DA	DE0110401884	DArot16	FV	DE0661090734	FLVgruen28
DA	DE0110401892	DAgelb19	FV	DE0661091822	FLVorange29
DA	DE0110401900	DArot17	FV	DE0661097089	FLVrot18
DA	DE0110401910	DAgelb21	FV	DE0661097092	FLVgelb21
DA	DE0110700576	DAgelb24	FV	DE0661102961	FLVgruen27
DA	DE0110700577	DAgelb18	FV	DE0661102972	FLVorange28
DA	DE0110700591	DAgelb17	FV	DE0661106841	FLVrot16
DA	DE0110700594	DAgruen07	FV	DE0662074455	FLVblau13
DA	DE0110700613	DArot14	FV	DE0663081548	FLVorange23
DA	DE0340000003	DArot12	FV	DE0663103409	FLVgelb15
DA	DE0340003116	DAgruen10	FV	DE0664028166	FLVgelb19
DA	DE0340007981	DAgruen30	FV	DE0664033357	FLVgruen22
DA	DE0340007984	DAgelb22	FV	DE0664033360	FLVgelb16
DA	DE0340022526	DAgelb23	FV	DE0664041049	FLVblau15
DA	DE0340308532	DAgelb20	FV	DE0664041050	FLVgruen23
DA	DE0340314590	DAgruen11	FV	DE0665063268	FLVorange25
DA	DE0340319978	DAgruen09	FV	DE0665066550	FLVorange24
DA	DE0340342850	DAgruen29	FV	DE0665066554	FLVrot17
DA	DE0340420391	DArot11	FV	DE0665066591	FLVgruen24
DA	DE0665097662	DAorange08	FV	DE0665075626	FLVgelb22
DA	DE0665097678	DAorange07	FV	DE0665081108	FLVorange26
DA	DE0665097967	DAorange05	FV	DE0665081109	FLVgruen25
DA	DE0665097972	DArot07	FV	DE0665081115	FLVorange27
DA	DE0665104623	DAbblau07	FV	DE0665085264	FLVgelb24
DA	DE0665111772	DAgruen822	FV	DE0665085270	FLVblau17
DA	DE0665111816	DAgruen811	FV	DE0665092242	FLVblau14
DA	DE0665118465	DAorange02	FV	DE0665092243	FLVblau18
DA	DE0665118467	DAgruen31	FV	DE0665118458	FLVgruen21
DA	DE0665118468	DAgruen32	FV	DE0665118459	FLVrot05
DA	DE0665124714	DAgruen922	FV	DE0665118462	FLVrot06
DA	DE0915128370	DAbblau10	FV	DE0665118471	FLVgelb18
DA	DE0915128371	DAorange03	FV	DE0665118477	FLVrot07
DA	DE0915128391	DArot08	FV	DE0665118482	FLVrot03
DA	DE0915128419	DAorange06	FV	DE0665124975	FLVorange904
DA	DE0917501807	DAgruen04	FV	DE0810451323	FLVorange31
DA	DE0917501823	DAbblau03	FV	DE1500018754	FLVblau16
DA	DE0917501829	DAbblau06	FV	DE1500244226	FLVrot02
DA	DE0917501840	DAbblau02	FV	DE1500257157	FLVblau11
DA	DE0917501849	DAorange01	FV	DE1500257165	FLVrot13
DA	DE0980002008	DAorange04	FV	DE1500257168	FLVrot09
DA	DE0980205731	DAbblau05	FV	DE1500257169	FLVrot12
DA	DE0980205741	DAgruen03	FV	DE1500257189	FLVrot11
DA	DE1400116484	DAbblau04	FV	DE1500257191	FLVblau10
DA	DE1400141514	DAgruen05	FV	DE1500270667	FLVgruen20
DA	DE1400188562	DAgruen06	FV	DE1500270678	FLVgelb17
DA	DE1400188579	DAbblau08	FV	DE1500270786	FLVrot01
DA	DE1400188585	DArot09	FV	DE1601100407	FLVrot04
DA	DE1400188591	DAorange09	FV	DE1601100428	FLVrot08

Tabelle 3A: Typisierungsergebnisse der eingesetzten Bullen für die Nukleotidaustausche der Kandidatengene *CCKBR*, *DRD4*, *MAOA* und *SERT*.

DE-Nr. Bulle	Name Bulle	Rasse	<i>CCKBR</i> (Intron 3)	<i>CCKBR</i> (3'UTR)	<i>DRD4</i> (Intron 1)	<i>MAOA</i> (Exon XV)	<i>SERT</i> (Intron 13)
DE0665118487	Claudius	DA	TT	CC	GG	C	GA
DE0340386055	Heino	DA	CC	CC	GT	C	GA
DE0665123113	Hiro	DA	CC	CT	GG	C	GA
DE0340118479	Pamtera	DA	CT	CC	GT	T	AA
DE0665094128	Pauker	DA	CT	CC	GG	C	AA
DE0665118486	Vollkorn	DA	CC	CC	GT	T	GA
DE0665124735	Habsburg	FV	CC	CC	TT	T	GA
DE1500244225	Herkun	FV	CC	CC	TT	T	AA
DE0980232295	Honannes	FV	CC	CC	TT	C	GG
DE0932318461	Mambo	FV	CC	CC	TT	T	AA
DE1500258855	Matze	FV	CC	TT	GT	T	GG
DE0576839147	Paros	FV	CC	CC	TT	C	GA
DE0930336668	Poker	FV	CC	CC	TT	T	AA
7760280	Theo	FV	CC	CT	TT	T	GG

Tabelle 4A: Typisierungsergebnisse der eingesetzten Bullen für die Mikrosatelliten auf BTA1 (1-1 – 1-5) mit Anzahl der heterozygoten Marker je Bulle.

DE-Nr. Bulle	Name Bulle	Rasse	1-1 <i>BMS1928</i>	1-2 <i>DIK634</i>	1-3 <i>BMS574</i>	1-4 <i>BMS4020</i>	1-5 <i>DIK4957</i>	Anzahl heterozygote Marker
DE0665118487	Claudius	DA	161 161	228 230	153 153	121 121	186 186	1
DE0340386055	Heino	DA	161 181	230 230	149 149	121 121	186 186	1
DE0665123113	Hiro	DA	145 163	228 230	145 153	121 121	186 188	4
DE0340118479	Pamtera	DA	145 161	230 234	147 147	121 121	186 186	2
DE0665094128	Pauker	DA	145 181	228 230	143 147	121 121	186 188	4
DE0665118486	Vollkorn	DA	161 161	230 230	151 153	121 121	186 186	1
DE0665124735	Habsburg	FV	163 163	230 230	143 153	119 121	186 186	2
DE1500244225	Herkun	FV	161 163	230 230	151 153	121 121	186 186	2
DE0980232295	Honannes	FV	163 163	230 230	143 147	119 119	186 186	1
DE0932318461	Mambo	FV	161 161	230 230	147 149	119 121	186 186	2
DE1500258855	Matze	FV	161 161	230 230	143 149	119 121	186 188	3
DE0576839147	Paros	FV	161 167	230 230	149 149	121 121	186 188	2
DE0930336668	Poker	FV	161 169	230 230	149 149	121 121	186 188	2
7760280	Theo	FV	161 169	230 230	149 149	121 121	186 188	2

Tabelle 5A: Typisierungsergebnisse der eingesetzten Bullen für die ersten zehn Mikrosatelliten auf BTA29 (29-1 – 29-10) mit Anzahl der heterozygoten Marker je Bulle.

DE-Nr. Bulle	Name Bulle	Rasse	29-1 <i>BMS1857</i>	29-2 <i>BMS764</i>	29-3 <i>BMS1787</i>	29-4 <i>ILSTS089</i>	29-5 <i>MNB-127</i>	29-6 <i>MNB-145</i>	29-7 <i>MNB-109</i>	29-8 <i>OarHH22</i>	29-9 <i>BMC1206</i>	29-10 <i>ILSTS081</i>	Anzahl heterozygote Marker
DE0665118487	Claudius	DA	160 160	100 106	160 160	139 139	227 229	166 166	192 192	113 115	132 132	100 102	4
DE0340386055	Heino	DA	152 164	096 108	160 160	139 147	227 227	166 172	198 200	113 115	130 132	100 108	8
DE0665123113	Hiro	DA	152 162	104 110	162 168	141 147	227 229	172 172	192 194	115 121	132 132	104 104	7
DE0340118479	Pamtera	DA	160 160	100 104	160 168	139 139	227 229	166 166	192 192	113 115	132 132	098 104	5
DE0665094128	Pauker	DA	160 164	096 106	162 166	141 147	227 229	166 178	192 198	105 115	128 132	102 104	10
DE0665118486	Vollkorn	DA	152 164	096 106	160 160	139 139	219 227	166 174	178 178	113 115	130 130	104 104	5
DE0665124735	Habsburg	FV	158 176	100 108	158 160	139 147	217 217	166 174	178 190	113 113	132 132	102 106	7
DE1500244225	Herkar	FV	160 176	106 110	162 164	139 155	229 229	166 166	192 200	115 115	130 130	100 104	6
DE0980232295	Honannes	FV	158 160	106 108	160 164	139 139	219 229	166 166	178 190	113 121	130 132	098 100	8
DE0932318461	Mambo	FV	152 160	104 112	156 160	139 147	229 231	166 166	178 178	113 115	128 132	106 118	8
DE1500258855	Matze	FV	160 160	106 106	156 164	139 139	219 227	166 172	190 190	113 113	130 132	098 100	5
DE0576839147	Paros	FV	160 166	100 106	148 164	139 139	219 229	166 174	190 192	113 115	130 130	100 104	8
DE0930336668	Poker	FV	160 164	100 106	156 162	139 139	227 229	166 166	178 178	115 115	130 132	104 106	6
7760280	Theo	FV	158 176	104 104	164 170	139 139	229 231	166 178	188 200	111 111	130 130	100 104	6

Tabelle 6A: Typisierungsergebnisse der eingesetzten Bullen für die weiteren vier Mikrosatelliten (29-11 – 29-14) auf BTA29 mit Anzahl der heterozygoten Marker je Bulle.

DE-Nr. Bulle	Name Bulle	Rasse	29-11 <i>BMS1948</i>	29-12 <i>DIK4499</i>	29-13 <i>DIK5057</i>	29-14 <i>MNB-101</i>	Anzahl heterozygote Marker
DE0665118487	Claudius	DA	119 123	209 213	226 226	151 151	2
DE0340386055	Heino	DA	123 123	211 213	226 226	151 151	1
DE0665123113	Hiro	DA	115 115	211 211	226 226	151 151	0
DE0340118479	Pamtera	DA	123 123	209 209	226 226	165 165	0
DE0665094128	Pauker	DA	119 119	209 209	226 226	151 161	1
DE0665118486	Vollkorn	DA	115 123	209 209	226 226	151 151	1
DE0665124735	Habsburg	FV	115 121	209 209	226 226	161 161	1
DE1500244225	Herkar	FV	119 123	207 211	226 228	161 161	3
DE0980232295	Honannes	FV	115 121	207 209	226 226	151 161	3
DE0932318461	Mambo	FV	099 117	209 209	226 226	151 161	2
DE1500258855	Matze	FV	123 123	211 211	226 226	151 161	1
DE0576839147	Paros	FV	099 115	211 211	226 226	161 161	1
DE0930336668	Poker	FV	115 121	209 211	226 226	161 161	2
7760280	Theo	FV	099 115	207 209	226 226	151 161	3

Tabelle 7A: Typisierungsergebnisse der Mikrosatelliten der Referenzprobe „Giessen2000“ (= DABlau25) aus dem EU-Projekt RESGEN CT98-118.

Lfd. Nr.	Mikrosatellit	Chromosom	Allele
1-1	<i>BMS1928</i>	BTA1	159 161
1-2	<i>DIK634</i>	BTA1	230 230
1-3	<i>BMS574</i>	BTA1	149 151
1-4	<i>BMS4020</i>	BTA1	121 121
1-5	<i>DIK4957</i>	BTA1	186 186
29-1	<i>BMS1857</i>	BTA29	152 160
29-2	<i>BMS764</i>	BTA29	096 106
29-3	<i>BMS1787</i>	BTA29	160 168
29-4	<i>ILSTS089</i>	BTA29	139 141
29-5	<i>MNB-127</i>	BTA29	227 227
29-6	<i>MNB-145</i>	BTA29	166 166
29-7	<i>MNB-109</i>	BTA29	188 192
29-8	<i>OarHH22</i>	BTA29	113 113
29-9	<i>BMC1206</i>	BTA29	128 130
29-10	<i>ILSTS081</i>	BTA29	098 100
29-11	<i>BMS1948</i>	BTA29	119 119
29-12	<i>DIK4499</i>	BTA29	209 211
29-14	<i>MNB101</i>	BTA29	151 151

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Erhardt gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Dissertationsthemas, die kritische Durchsicht des Manuskriptes und Betreuung der Arbeit während der langen Zeit.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Tierzucht und Haustiergenetik, der Lehr- und Forschungsstation Oberer Hardthof und dem Lehr- und Versuchsbetrieb Rudlos danke ich sehr für die gute Zusammenarbeit und die schöne Zeit während meiner Dissertation.

Besonders danken möchte ich Carina für ihre Einweisung und immer währende Unterstützung in den Untiefen des molekulargenetischen Labors; Horst für sein immer offenes Ohr in statistischen und sonstigen Fragen und dass er auch bei wiederholten Erklärungen immer die Ruhe bewahrt hat und einen auf den Boden der Tatsachen geholt hat; Margarete für ihre stete Betreuung des ALFs; Christina, Christina und Stephi für das Verstehen der Mikrosatelliten und Hilfen am ABI; Anja, Heike, Renate, Sylvia, Sandra und Therese für ihre Unterstützungen im Laboralltag und beim Proben suchen; Gesine für die Laborleitung; Eva für interessante Telefonate und natürlich allen meinen Doktorandenkolleginnen und –kollegen für die gemeinsame Zeit und die gegenseitigen Hilfestellungen.

Die ganze „Truppe“ hat trotz mancher Wechsel durch die gute Zusammenarbeit und die vielen, nicht immer dienstlichen, Gespräche, verschiedene Keksrunden und ergreifende Diskussionsforen (Kann man 3er Eier einfrieren?) und kreative Bastelstunden für ein gutes Arbeitsklima und ein meist angenehmes Arbeiten im Institut gesorgt.

Und dann möchte ich mich auch ganz herzlich bei meinen Eltern und Großeltern, allen Freunden, Bekannten und den vierbeinigen Wegbegleitern außerhalb des Institutes bedanken, die mich während der gesamten Zeit unterstützt haben, die Höhen und Tiefen verfolgt und einfach da waren.

Und last but not least danke ich dem Zitronenfalter, der uns immer wieder zum Lächeln gebracht hat.

Ich erkläre:

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

ISBN 978-3-941703-72-8



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