

**UNTERSUCHUNG GENETISCHER URSACHEN DER
UNTERSCHIEDLICHEN EMPFÄNGLICHKEIT FÜR DIE
PARATUBERKULOSE DES RINDES ANHAND VON
MIKROSATELLITEN- UND KANDIDATENGENANALYSEN**

MICHAELA HINGER

INAUGURAL-DISSERTATION

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



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

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

1. Auflage 2009

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

1st Edition 2009

© 2009 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

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

Betreuer: Prof. Dr. Georg Erhardt

**UNTERSUCHUNG GENETISCHER URSACHEN DER UNTERSCHIEDLICHEN
EMPFÄNGLICHKEIT FÜR DIE PARATUBERKULOSE DES RINDES ANHAND
VON MIKROSATELLITEN- UND KANDIDATENGENANALYSEN**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

MICHAELA HINGER

Tierärztin aus Freudenstadt

Gießen 2009

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

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. Georg Baljer

Gutachter:

Prof. Dr. Georg Erhardt
PD Dr. Hermann Willems

Tag der Disputation: 11.02.2009

Meiner Familie

Teile dieser Arbeit sind Bestandteil folgender Publikationen:

HINGER, M., BRANDT, H., HORNER, S., ERHARDT, G. (2007): Short Communication: Association Analysis of Microsatellites and *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* Antibody Response in German Holstein. *Journal of Dairy Science* 90, 1957-1961.

HINGER, M., BRANDT, H., ERHARDT, G. (2008): Heritability Estimates for Antibody Response to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in German Holstein Cattle. *Journal of Dairy Science* 91, 3237-3244.

Diese Arbeit wurde im Rahmen des Forschungsprojekts "Mensch-Ernährung-Umwelt", Forschungsschwerpunkt B: „Krankheitsrisiken durch Lebensmittel“, finanziell gefördert durch das Hessische Ministerium für Wissenschaft und Kunst.

1	EINLEITUNG	1
2	LITERATURÜBERSICHT	3
2.1	Paratuberkulose beim Rind	3
2.1.1	Ätiologie.....	3
2.1.2	Geografische Verbreitung	3
2.1.3	Pathogenese.....	4
2.1.3.1	Verlauf der Immunantwort.....	6
2.1.4	Klinik.....	7
2.1.5	Nachweis	7
2.1.5.1	Direkter Nachweis.....	8
2.1.5.1.1	Kotkultur	8
2.1.5.1.2	Mikroskopie	8
2.1.5.1.3	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	8
2.1.5.1.4	Untersuchung des Ileoäkallymphknotens.....	8
2.1.5.2	Indirekter Nachweis	9
2.1.5.2.1	Serologie.....	9
2.1.5.2.2	Sonstige Methoden.....	10
2.1.6	Therapie und Impfung.....	10
2.1.7	Erblichkeit	11
2.1.8	Wirtschaftliche Bedeutung.....	12
2.2	Paratuberkulose bei anderen Wiederkäuern	12
2.3	Paratuberkulose bei Nichtwiederkäuern	13
2.4	Morbus Crohn – Paratuberkulose beim Menschen?	13
2.5	Zucht auf Krankheitsresistenz beim Rind	15
2.5.1	Voraussetzungen für genetische Studien.....	16
2.6	Kandidatengenansatz.....	17
2.6.1	Interleukin-12 (<i>IL12</i>).....	19
2.6.2	Natural Resistance associated Macrophage Protein 1 (<i>NRAMP1</i>).....	19
2.6.3	Interferon- γ (<i>IFNG</i>).....	20

INHALTSVERZEICHNIS

2.6.4	Interleukin-4 (<i>IL4</i>).....	20
2.6.5	Interleukin-18 (<i>IL18</i>).....	20
2.6.6	Interleukin-10 (<i>IL10</i>).....	21
2.6.7	Tumor Necrosis Factor- α (<i>TNF</i>)	21
2.6.8	Toll-like-Rezeptoren (<i>TLR</i>).....	21
2.6.9	Caspase Recruitment Domain, Member 15 (<i>CARD15</i>)	22
2.6.10	Interleukin-2 (<i>IL2</i>).....	23
2.6.11	GATA binding protein 3 (<i>GATA3</i>).....	23
2.7	Mikrosatellitenanalyse	24
3	MATERIAL UND METHODEN.....	26
3.1	Tiere und Probenmaterial	26
3.1.1	Vergleichsgruppe	26
3.1.2	Proben verschiedener Rinderrassen	26
3.1.3	Proben von Tieren mit MAP-Status.....	26
3.1.3.1	Auswahl der Proben für Assoziationsanalysen.....	29
3.2	Verbrauchsmaterialien	30
3.2.1	Chemikalien und Puffer	30
3.2.2	Reaktionskits	31
3.2.3	Enzyme.....	31
3.2.4	Oligonukleotide.....	32
3.2.5	Längen- und Konzentrationsstandards	32
3.2.6	Plastikwaren, Glaswaren, Handschuhe, Filter und Tücher	32
3.3	Geräte	33
3.4	Dokumentation	34
3.5	Computerprogramme	34
3.5.1	Molekulargenetik	34
3.5.2	Statistische Analysen.....	34
3.6	Labors.....	34
3.7	Verwendete Referenzsequenzen.....	35
3.8	Molekularbiologische Methoden.....	36

3.8.1	Isolation von DNA aus Vollblut und Gewebe	36
3.8.2	Isolation von Kern-DNA aus Vollblut	36
3.8.3	Ermittlung der Qualität bzw. Quantität von DNA	36
3.8.4	Sequenzanalyse spezifischer Regionen in Kandidatengenomen.....	37
3.8.4.1	Primerauswahl.....	37
3.8.4.2	PCR-Amplifikation von DNA-Fragmenten für Sequenzanalysen	38
3.8.4.3	Direktsequenzierung von PCR-Fragmenten.....	39
3.8.4.3.1	Aufreinigung von PCR-Produkten	39
3.8.4.3.2	Durchführung der Sequenzierreaktion	40
3.8.4.3.3	Herstellung eines Polyacrylamidgels für die Sequenzierung.....	40
3.8.4.4	Klonierung von PCR-Produkten	41
3.8.5	Genotypisierungsmethoden.....	42
3.8.5.1	Fragmentlängenanalysen.....	42
3.8.5.1.1	Mikrosatellitenanalyse	42
3.8.5.1.2	Analyse der Insertion im Interleukin2-Gen (IL2)	46
3.8.5.2	PCR-RFLP und ACRS-Analysen	46
3.8.5.2.1	Auswahl der Restriktionsenzyme.....	46
3.8.5.2.2	Auswahl der Primer für PCR-RFLP	47
3.8.5.2.3	Durchführung der Polymerasekettenreaktion (PCR)	48
3.8.5.2.4	Spaltung von DNA mittels Restriktionsenzymen	49
3.8.5.3	Tetra-Primer Amplification-Refractory-Mutation-System-PCR	50
3.9	Bioinformatische Analyse von Nukleotidsequenzdaten.....	50
3.10	Statistische Methoden	51
3.10.1	Varianzkomponentenschätzung	51
3.10.2	Hardy-Weinberg-Gleichgewicht	52
3.10.3	Assoziationsstudien.....	52
4	ERGEBNISSE	53
4.1	Zusammenhänge zwischen verschiedenen Parametern und MAP-Status.....	53
4.1.1	Einfluss des MAP-Status auf die Milchleistung	53
4.1.2	Einfluss von Betrieb und Alter auf den MAP-Status	53

4.1.3	Varianzkomponentenschätzung und Heritabilitäten	56
4.2	Mikrosatellitenanalyse	58
4.2.1	Typisierbarkeit der Mikrosatelliten	58
4.2.2	Vergleichstiere	58
4.2.3	Fall- und Kontrollgruppe.....	59
4.3	Kandidatengene.....	61
4.3.1	Natural Resistance associated Macrophage Protein 1 (<i>NRAMP1</i>).....	61
4.3.1.1	PCR und Sequenzierung.....	61
4.3.1.2	Darstellung des Basenaustausches <i>NRAMP1</i> E5(+165) mittels PCR-RFLP	62
4.3.2	Toll-like Receptor 4 (<i>TLR4</i>).....	63
4.3.2.1	PCR und Sequenzierung.....	63
4.3.2.2	Nachweis des Basenaustausches <i>TLR4</i> E3+1040 durch PCR-RFLP	63
4.3.2.3	Nachweis des Basenaustausches <i>TLR4</i> E3+2021 durch Tetra-Primer Amplification-Refractory-Mutation-System-PCR	65
4.3.3	Caspase Recruitment Domain Family, Member 15 (<i>CARD15</i>)	65
4.3.3.1	Vergleich ausgewählter Bereiche der bovinen <i>CARD15</i> -Proteinsequenz mit Sequenzen anderer Spezies	65
4.3.3.2	PCR und Sequenzierung.....	66
4.3.3.3	Nachweis der Basenaustausche im <i>CARD15</i> -Gen	70
4.3.3.3.1	Darstellung des SNP E4+921 in Exon IV durch PCR-RFLP	70
4.3.3.3.2	Darstellung des SNP E11(-14) im Intron 10 durch PCR-RFLP-Analyse	70
4.3.4	Interleukin 2 (<i>IL2</i>)	72
4.3.5	Gata-binding Protein 3 (<i>GATA 3</i>).....	72
4.3.5.1	PCR und Sequenzierung.....	72
4.3.5.2	Nachweis des Basenaustausches durch PCR-RFLP.....	72
4.3.6	Vergleichende <i>In-silico</i> -Analyse von Polymorphismen	73
4.3.7	Zusammenfassung der Nachweismethoden	74
4.3.8	Allel- und Genotypfrequenzen	75
5	DISKUSSION.....	78
5.1	Zusammenhänge zwischen Milchleistung, Betrieb, Alter und MAP-Status	78

INHALTSVERZEICHNIS

5.1.1	Milchleistung.....	78
5.1.2	Einfluss von Betrieb und Alter auf den MAP-Status	78
5.2	Auswahl der Proben und Tiere für die Assoziationsanalysen	79
5.3	Heritabilitätsschätzung.....	82
5.4	Mikrosatellitenanalyse	83
5.5	Kandidatengenanalyse	85
5.6	Zuchtziel Paratuberkuloseresistenz?	89
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	93
7	SUMMARY	95
8	LITERATURVERZEICHNIS	97
9	ANHANG	115

Abbildung 1: Infrastruktur und Vernetzung zur Durchführung der Studie.....	27
Abbildung 2: Ausschnitt aus der 3'UTR des <i>NRAMP1</i> , GenBank Nr. U12862. Die Repeat-Motive (GT) sind grau unterlegt, die Primer in Fettdruck, Primernamen jeweils darüber dargestellt.	44
Abbildung 3: Darstellung der geschätzten Betriebsmittelwerte (Betrieb A bis L) des Anteils MAP-positiver Kühe der Rasse Dt. Holstein, basierend auf dem serologischen MAP-Status und dem OD-Wert.	54
Abbildung 4: Darstellung der geschätzten Mittelwerte des Anteils MAP-positiver Tiere für Altersklassen (in Jahren) bei der Rasse Dt. Holstein, basierend auf dem serologischen MAP-Status und dem OD-Wert.	55
Abbildung 5: Varianzkomponentenschätzung, Darstellung der additiv-genetischen Varianz und der Restvarianz unter Verwendung verschiedener Datensätze (1, 2).....	57
Abbildung 6: Sequenz des durch die Primer BT <i>NRAMP1</i> -RFLP_F und BT <i>NRAMP1</i> -RFLP_R begrenzten PCR-Produkts im Intron 5 des <i>NRAMP1</i> -Gens.....	62
Abbildung 7: Darstellung von bovinen <i>NRAMP1</i> E5(+165)-Genotypen durch PCR-RFLP-Analyse mit Agarosegelelektrophorese; M, pUC Größenmarker 8.	63
Abbildung 8: Sequenz des 188 bp großen PCR-Produkts zur Darstellung der Sequenzvariante <i>TLR4</i> E3+1040.	64
Abbildung 9: Darstellung von Genotypen an <i>TLR4</i> E3+1040 durch PCR-RFLP-Analyse und Agarosegelelektrophorese; M, pUC Größenmarker 19.....	64
Abbildung 10: Nachweis der Genotypen an <i>TLR4</i> E3+2021 c>t durch Tetra-Primer ARMS-PCR und nachfolgende Auftrennung der Fragmente im 1,5%igen Agarosegel, M, Marker Gene Ruler 100+.....	65
Abbildung 11: Sequenz des 695 bp großen PCR-Produkts zur Darstellung des <i>CARD15</i> Exon II (grau unterlegt) und dessen flankierender Intronsequenzen beim Rind.	67
Abbildung 12: Sequenz des 749 bp großen, durch die Primer <i>CARD15</i> -Exon IV_F und_R (Positionen unterstrichen) begrenzten PCR-Produkts des <i>CARD15</i>	69
Abbildung 13: Darstellung der Varianten an Position 921 im Exon IV des <i>CARD15</i> -Gens durch PCR-RFLP-Analyse und Agarosegelelektrophorese	70
Abbildung 14: Sequenz des durch BT_ <i>CARD15</i> -In10_F3 und BT_ <i>CARD15</i> -In10_R5 begrenzten PCR-Produkts im Intron 10 des <i>CARD15</i> -Gens.....	71
Abbildung 15: Nachweis der Varianten an Position <i>CARD15</i> E11(-14) durch PCR-RFLP-Analyse und Agarosegelelektrophorese.	71

Abbildung 16: Sequenz des durch GATA3 BT Ex5_F2 und GATA3 BT 3'UTR_R2
begrenzten PCR-Produkts in der 3'UTR des *GATA3*. 72

Abbildung 17: Darstellung der Genotypen im *GATA3* durch PCR-RFLP-Analyse. 73

Abbildung 18: Von der DNA-Variante *CARD15* E11(-14) a>g betroffenes Sequenzmotiv
(unterstrichen) für die potentiell bindenden Transkriptionsfaktoren. 74

Tabelle 1: Prävalenzen von MAP-Infektionen bei Rindern in verschiedenen Ländern.....	4
Tabelle 2: Indirekte Nachweismethoden für <i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i> nach Homuth (2002) und OIE (2006).....	10
Tabelle 3: Kandidatengene und die zur Analyse ausgewählten Mikrosatellitenmarker, ihre genetische und physische Position und deren Referenzen.	24
Tabelle 4: Anteil (%) serologisch MAP-negativer (n = 3113), MAP-positiver (n = 637) und MAP-verdächtiger (n =774) Tiere der Rasse Dt. Holstein, aufgeschlüsselt nach Betrieben sowie gesamte Tierzahl je Betrieb (n=).	28
Tabelle 5: Beschreibung des zur Auswertung verwendeten Datenmaterials mit Tierzahl, Anzahl der eingesetzten Bullen sowie der Zahl der Töchter pro Vater.	28
Tabelle 6: Rohmittelwerte (\bar{x}) und Standardabweichungen (Std) der Milchleistungsdaten der ersten Laktation von Kühen der Rasse Dt. Holstein in MAP-positiven Betrieben.	29
Tabelle 7: Altersstruktur der Fall- und Kontrollgruppe (MAP-pos., n = 594; MAP-neg., n = 585).	30
Tabelle 8: Referenzsequenzen der untersuchten Genregionen aus der GenBank.	35
Tabelle 9: Primer zur Sequenzanalyse von spezifischen Regionen der Kandidatengene <i>NRAMP1</i> , <i>TLR4</i> , <i>CARD15</i> und <i>GATA3</i> sowie deren Sequenzen, optimale Annealingtemperatur (AT) und Produktgrößen (bp) der Fragmente.	38
Tabelle 10: Volumenanteil und Konzentration der Reaktionsbestandteile im Standard-PCR-Ansatz.....	39
Tabelle 11: Standard PCR-Profil zur Amplifizierung der PCR-Produkte in Kandidatengenen	39
Tabelle 12: Volumenanteil und Konzentration der Reaktionsbestandteile für die Sequenzierreaktion	40
Tabelle 13: Standard-Profil zur Sequenzierung der PCR-Produkte aus Kandidatengenen.	40
Tabelle 14: Primersequenzen und Allelgrößen (bp) der untersuchten Mikrosatelliten. VIC [®] , NED [®] , 6-FAM= Fluoreszenzmarkierungen der verwendeten Mikrosatellitenprimer; for= Vorwärtsprimer; rev= Rückwärtsprimer; unterstrichene Sequenzen= PIGtail.	43
Tabelle 15: Zusammensetzung des 10x Primermix für die Multiplexreaktionen Nr. 1 (<i>BMC9006/BB705/BB717/BB719/BB704</i>), Nr. 2 (<i>BOBT24/BMS1617/BB702</i>) und Nr. 3 (<i>BM1225/RM106</i>) for, Vorwärtsprimer; rev, Rückwärtsprimer.	44
Tabelle 16: Reaktionsansätze für die Multiplex-PCR-Reaktionen Nr. 1, Nr. 2 und Nr. 3.....	45
Tabelle 17: PCR-Profil für die Multiplex-PCR-Reaktionen Nr. 1, Nr. 2 und Nr. 3.	45

Tabelle 18: Restriktionsenzyme für PCR-RFLP und PCR-ACRS, deren Bezugsquellen, verwendete Puffer, die jeweiligen erforderlichen Inkubationstemperaturen und Erkennungssequenzen.	46
Tabelle 19: Primer für die RCR-RFLP in Kandidatengen (PCR Nr. 1 bis 7) sowie die Produktgrößen der Amplifikate (bp) und optimale Annealingtemperatur (AT)...	47
Tabelle 20: Volumenanteil und Konzentration der Reaktionsbestandteile im Standard-PCR-Ansatz für die Amplifikation von PCR-Produkten für den Restriktionsverdau.....	48
Tabelle 21: Standard PCR-Profil zur Amplifikation von PCR-Produkten für den anschließenden Restriktionsverdau	49
Tabelle 22: Ansätze für den Restriktionsverdau und eingesetzte Menge einzelner Komponenten.	49
Tabelle 23: Primer für die Tetra-Primer ARMS-PCR mit Touchdown-Protokoll zum Nachweis des Basenaustausches <i>TLR4</i> E3+2021 (Sharma et al. 2006).....	50
Tabelle 24: LSQ-Mittelwerte (LSM) und Standardfehler (SE) für den Einfluss des MAP-Status auf Milchleistungsparameter von Kühen der Fall- und Kontrollgruppe.	53
Tabelle 25: Geschätzte Heritabilitäten für das Merkmal der Antikörperbildung gegen <i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i> beim Dt. Holstein unter Berücksichtigung verschiedener Modelle und Datensätze.....	56
Tabelle 26: Allelanzahl der in der untersuchten Vergleichsgruppe typisierten Mikrosatelliten und Zahl der untersuchten Tiere je Rasse (n).....	58
Tabelle 27: Anzahl der Allele (n_a) in der Fall- und Kontrollgruppe sowie erwartete (H_e) und beobachtete (H_o) Heterozygotie je Locus.....	59
Tabelle 28: Allelfrequenzen (%) der Mikrosatelliten in der Fall (Fall)- und Kontrollgruppe (Kont) sowie Zahl der je Marker genotypisierten Tiere (n).	60
Tabelle 29: Identifizierte Sequenzvarianten im Intron 5 des <i>NRAMP1</i> -Gens	61
Tabelle 30: Durch Sequenzanalyse ermittelte Sequenzvarianten an Pos. 1040, 1119 und 1167 (mRNA-Referenzsequenz GenBank AY297040) im Exon III des <i>TLR4</i> -Gens.....	63
Tabelle 31: Eigenschaften von Aminosäureaustauschen im CARD15 unter Vergleich der Spezies <i>Bos taurus</i> , <i>Bos indicus</i> , <i>Bison bison</i> , <i>Canis familiaris</i> , <i>Homo sapiens</i> , <i>Pan troglodytes</i> , <i>Saguinus oedipus</i> , <i>Mus musculus</i> und <i>Rattus norvegicus</i>	74
Tabelle 32: Zusammenfassung der etablierten Screeningmethoden für DNA-Varianten in Kandidatengen.	75

TABELLENVERZEICHNIS

- Tabelle 33: Allelfrequenzen (%) der untersuchten Basenaustausche in den einzelnen Kandidatengenen in der Fall- (MAP-positive) und Kontrollgruppe (MAP-negative) und Anzahl untersuchter Proben (gesamt) sowie berechnete Signifikanzen. 76
- Tabelle 34: Genotypfrequenzen (%) der untersuchten Basenaustausche in den einzelnen Kandidatengenen in der Fall- (MAP-positive) und Kontrollgruppe (MAP-negative) und Anzahl untersuchter Proben (gesamt) sowie berechnete Signifikanzen. 77

Anhang Abbildung A: Sequenz des 421 bp großen PCR-Produkts zur Darstellung des *CARD15* Exon XI (grau unterlegt) und der flankierenden Sequenzen. Die Position der Primer ist unterstrichen. Fettdruck: SNP an Position E11(-14) (a>g). 117

Anhang Tabelle A: DNA-Proben von Rindern verschiedener Rassen, die zur Suche von Polymorphismen eingesetzt wurden..... 115

Anhang Tabelle B: Allelfrequenzen (%) der Mikrosatelliten in der Vergleichsgruppe (Dt. Angus, Dt. Holstein, Dt. Fleckvieh, Jersey). 116

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µmol	Mikromol
A	Adenin
AB	Anatolisches Schwarzvieh
ACRS	Amplification created Restriction Site
APS	Ammoniumpersulfat
AT	Annealingtemperatur
BCG	<i>Mycobacterium bovis</i> Bacillus Calmette-Guérin
Bh	Brahman
bp	Basenpaare
BTA	bovines Chromosom
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
cM	Centimorgan
d. h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DSA	Disease Susceptibility Allele, Krankheitsempfänglichkeit beeinflussendes Allel
Dt.	Deutsche(s)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent Assay
EST	Expressed Sequence Tag
G	Guanin
GAS	Gene-assisted Selection, gengestützte Selektion
h	Stunde

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

H ₂ O	Wasser
HB	Herdbuch
H _e	erwartete Heterozygotie
H _o	beobachtete Heterozygotie
IBD	Inflammatory Bowel Disease, entzündliche Darmerkrankung
kb	Kilobasen
KBE	koloniebildende Einheiten
LAM	Lipoarabinomannan
LD	Linkage Disequilibrium, Kopplungsungleichgewicht
LE	Linkage Equilibrium, Kopplungsgleichgewicht
M	molar
mA	Milliampere
MAS	Marker-assisted Selection, markergestützte Selektion
Mb	Megabasenpaare
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minuten
ml	Milliliter
MLP	Milchleistungsprüfung
mm	Millimeter
mM	millimolar
mmol	Millimol
mRNA	Messenger-RNA, Boten-RNA
n	Anzahl
NaAc	Natriumacetat
ND	N'Dama-Rind
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
Nr.	Nummer

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

OARV	Ostanatolisches Rotvieh
OD	optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBMC	periphere mononukleäre Blutzellen
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerasekettenreaktion
pmol	Picomol
QTL	Quantitative Trait Locus
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
SNP	Single Nucleotide Polymorphism, Einzelbasenaustausch
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borsäure/EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TP	Touchdown-PCR
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
U	Unit (Enzymeinheit)
u. a.	unter anderem
UTR	untranslatierte Region
V	Volt
v/v	Volumenprozent
VIT	Vereinigte Informationssysteme Tierhaltung
w/v	Gewichtsprozent
z. B.	zum Beispiel

1 Einleitung

Paratuberkulose ist eine chronische granulomatöse Enteritis der Wiederkäuer, die durch *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) verursacht wird und sich durch eine lange Inkubationszeit auszeichnet. Die Erkrankung ist besonders beim Rind gekennzeichnet durch starke, intermittierende, später chronische Durchfälle und führt unter fortschreitender Abmagerung letztlich zum Tod der betroffenen Tiere. Paratuberkulose ist nicht heilbar und ein Impfstoff ist in Deutschland nicht zugelassen. Neben der negativen Beeinflussung der Tiergesundheit in Nutztierbeständen hat die Infektion große wirtschaftliche Bedeutung, die sich in finanziellen Verlusten aufgrund von verminderten Milch- und Mastleistungen sowie verringerter Fruchtbarkeit, bereits in subklinischen Stadien, äußert. Durch mehrjährige Inkubationszeit, subklinische Phasen (Chiodini et al. 1984), schwierige Diagnostik und nicht flächendeckende Bestandsuntersuchungen sind genaue Angaben über das eigentliche Vorkommen von MAP in deutschen Rinderbeständen nicht vorhanden. Ein wichtiger Aspekt im Sinne des vorbeugenden Verbraucherschutzes liegt in der möglichen Beteiligung des Erregers *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* am Morbus Crohn des Menschen, einer Erkrankung mit ähnlichem klinischen Bild (Bülte et al. 2005).

Die Bekämpfung der Paratuberkulose erfolgt bis jetzt vor allem auf der Grundlage von Managementmaßnahmen, welche die Übertragung des Erregers verhindern sollen, und der Erkennung infizierter Rinder in den Beständen sowie der Merzung von Erregerausscheidern. Die Diagnostik erfolgt entweder über den direkten Erregernachweis durch PCR, Anzucht aus Kot- oder Gewebeproben oder indirekt durch Antikörperdetektion mittels kommerzieller ELISA-Tests. Problematisch ist allerdings bei allen Methoden die eingeschränkte Sensitivität und Spezifität, infizierte Tiere zu detektieren, insbesondere im frühen Infektionsstadium. Durch Kombination der Testverfahren kann die Diagnostik nur geringfügig verbessert werden (Böttcher und Gangl 2004).

Genetisch bedingte Unterschiede in der Empfänglichkeit gegenüber Mycobakterien wurden bei verschiedenen Spezies beobachtet (Kang und Chae 2001), bei der Maus (Frelief et al. 1990) und beim Schaf (Reddacliff et al. 2005) auch bezüglich MAP. Daher könnte – begleitend zu den erforderlichen Hygienemaßnahmen – die tierzüchterische Beeinflussung genetischer Unterschiede in der Empfänglichkeit für *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* hin zu Tieren, die eine höhere Resistenz gegen den Erreger aufweisen, entscheidend zur Erhöhung der natürlichen Krankheitsresistenz und zur Verbesserung der Gesundheit und Produktivität der Nutztierbestände beitragen (Adams und Templeton 1998). Beispiele für das Auffinden an der Merkmalsausprägung verantwortlicher Gene und den erfolgreichen Einsatz molekulargenetischer Methoden in der Tierzucht sind das Maligne-Hyperthermie-Syndrom beim Schwein (Fujii et al. 1991), die Bovine Leukozyten Adhäsionsdefizienz (BLAD) des Rindes (Kehrli et al. 1990) oder die Zucht auf Scrapieresistenz beim Schaf (Hunter 2003).

Aufgrund der morphologischen und klinischen Ähnlichkeit des Morbus Crohn beim Menschen mit Paratuberkulose, geht die dieser Arbeit zugrunde liegende Arbeitshypothese davon aus, dass ähnliche immunologische Mechanismen in der Krankheitsentstehung auch beim Rind eine Rolle spielen.

Ziel der Arbeit ist daher die Charakterisierung von genetischen und umweltbedingten Einflüssen auf die Paratuberkulose des Rindes als Basis weiterer Forschungsarbeiten. Zu diesem Zweck sollen zunächst die Heritabilität geschätzt und die nicht genetischen Einflussfaktoren ermittelt werden. Weiterhin werden durch molekulargenetische Untersuchungen genetische Prädispositionen für die Infektion mit *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* am Beispiel der Rasse Dt. Holstein analysiert. Es sollen Kandidatengene und Mikrosatelliten aus den unterschiedlichen immunologischen Kaskaden auf informative Polymorphismen untersucht und bei erkrankten bzw. serologisch positiven Tieren im Vergleich zu Tieren ohne serologisch positiven Befund typisiert werden. Die gewonnenen Ergebnisse sollen eine mögliche Basis zur Bekämpfung der Paratuberkulose beim Rind und somit zur Minimierung des Infektionsrisikos für den Menschen darstellen.

2 Literaturübersicht

2.1 Paratuberkulose beim Rind

2.1.1 Ätiologie

Der Erreger der Paratuberkulose ist *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP), ein säurefestes, streng aerobes, unbewegliches grampositives Stäbchenbakterium (Bisping und Amtsberg 1988). MAP zeichnet sich durch hohe Alkohol- und Säurefestigkeit aus, welche auf der spezifischen Zellwandstruktur mit Mykolsäuren, Glykolipiden und Wachsen beruht und den Nachweis durch die Ziehl-Neelsen-Färbung ermöglicht. Sein Wachstum ist abhängig von Mycobactin (Gerlach 2002), einem Eisenchelatbildner, was ihn von verwandten Mycobakterien unterscheidet und daher bei der kulturellen Anzucht diagnostisch von Bedeutung ist.

Auffällig ist die hohe Tenazität von MAP. In Kot, Gülle und sauren Böden ist es monatelang überlebensfähig und äußerst resistent gegen Austrocknung, allerdings nicht gegen direkte Sonneneinstrahlung (Chiodini et al. 1984). Die Überlebenszeit in Fließgewässern beträgt mindestens 163 Tage, in stehenden Gewässern 270 Tage und 330 Tage in Fäzes und Erde, abhängig von der Beschaffenheit (Anonymus 2004). Hervorzuheben ist zudem die Thermostabilität des Bakteriums, auch nach Lagerung bei -14 °C gelang noch die kulturelle Anzucht. Die Replikation außerhalb eines Wirtstieres ist nicht möglich (Grant 2005). Die meisten üblichen Desinfektionsmittel außer formaldehyd- und phenolhaltigen Präparaten sind nicht wirksam (zusammengefasst von vom Schloß 2000). MAP wurde außerdem in Schmeißfliegenarten (*Calliphora* und *Lucilia* spp.) nachgewiesen, die in Schlachthäusern gefangen wurden und Kontakt zu Schlachtabfällen paratuberkulosekranker Rinder hatten (Fischer et al. 2004).

2.1.2 Geografische Verbreitung

Es handelt sich bei der Paratuberkulose um eine weltweit verbreitete Erkrankung, mit großer ökonomischer Bedeutung. Studien zur Ermittlung der Prävalenzen in einzelnen Ländern wurden weltweit durchgeführt, gründen jedoch meist auf der Prävalenz in einzelnen Regionen des entsprechenden Landes und darauf basierenden Hochrechnungen (Dreier et al. 2006) und sind daher lückenhaft.

Die geschätzte Herdenprävalenz liegt in Europa zwischen 6,9 und 95,3 % (Tabelle 1). Außerhalb Europas schwankt die Prävalenz zwischen 30 und 86 % in Kanada bzw. Ägypten. Anhand der Untersuchungen von Salem et al. (2005) schlussfolgerten die Autoren, dass autochthone Rinderrassen entweder eine höhere Resistenz gegenüber MAP besitzen bzw. dass importierte Holsteins einer höheren MAP-Exposition ausgesetzt sind.

Tabelle 1: Prävalenzen von MAP-Infektionen bei Rindern in verschiedenen Ländern.

Land	Prävalenz (%)	Autoren
Außereuropäische Länder		
Ägypten	16,7 (autochthone Rassen) bzw. 85,7 (Holstein)	Salem et al. (2005)
Australien	14–17	Johne's Information Center 2005 ¹
Kanada (Ontario)	2,6 (Einzeltier) bzw. 30 (Herden mit > 2 positiv getesteten Tieren)	Hendrick et al. (2005a)
Neuseeland	60	Johne's Information Center (2005) ¹
USA	6,9 (Einzeltier) bzw. 54 (Herde)	Johnson-Ifearulundu (1999)
Europa		
Belgien	(ø 18,0); 7,0 (Fleischrinder) bzw. 32,0 (Milchvieh)	Boelaert et al. (2000)
Dänemark	8,8 (Einzeltier)	Jakobsen et al. (2000)
Deutschland	9,6–12,7 (Einzeltier) bzw. 20–84,7/95,3 % (Herde)	vom Schloß (2000) Hacker (2004) Donat (2005)
England	17,4 (Herde)	Cetinkaya et al. (1998)
Niederlande	2,5–6,9 (Einzeltier) bzw. 54,7 (Herde)	Muskens et al. (2000)
Österreich	1,1–7,1 (Einzeltier) bzw. 6,9–19 % (Herde)	Gasteiner et al. (2000) Dreier (2006)
Schweiz	1,7–49,2 (ø 19,7)	Corti und Stephan (2002) Stephan et al. 2002

¹(<http://www.johnes.org/dairy/epidemiology.html>)

2.1.3 Pathogenese

Die Infektion mit MAP erfolgt in der Regel horizontal durch fäkal-orale Übertragung des Erregers mit dem Kolostrum, durch kontaminierte Stallungen und Arbeitsgeräte oder über kotverschmierte Zitzen (Chiodini et al. 1984). Auch die Übertragung des Erregers von Kalb zu Kalb wurde experimentell nachgewiesen (van Roermund et al. 2007). Besonders bei klinisch erkrankten Müttern wurde zudem von einer vertikalen Übertragung auf das Kalb berichtet (Sweeney 1996). Bei asymptomatisch infizierten Kühen ist die Übertragungswahrscheinlichkeit geringer, jedoch tritt die Ausscheidung von MAP mit der Milch auch schon bei diesen Tieren auf (Sweeney et al. 1992b). MAP wurde in Leber, Milz, Sperma, Samenblase, Hoden und Nebenhoden von Zuchtbullen nachgewiesen, daher kann zusätzlich der Deckakt

als potenzielle Infektionsquelle vermutet werden (Ayele et al. 2004).

Ursprünglich wurde angenommen, dass die Tonsillen die primäre Eintrittspforte des Erregers in den Organismus darstellen (Payne und Rankin 1961). Neuere Ergebnisse stützen jedoch die Hypothese, dass der Dünndarm primäre Eintrittspforte des Erregers ist (Sweeney et al. 2006a), im Speziellen das Mucosa-assoziierte Lymphgewebe (MALT). Der Erreger wird von M-Zellen aufgenommen, durch die Schleimhautbarriere in das Lymphgewebe geschleust (Momotani et al. 1988) und von Makrophagen phagozytiert (Lugton 1999), die Teil des unspezifischen, zellvermittelten Abwehrsystems des Wirtes sind (Sugawara et al. 1999). MAP scheint wie *Mycobacterium tuberculosis* die Fusion zum Phagolysosom zu verhindern (Clemens und Horwitz 1995) und ist dadurch vor Abwehrmechanismen des Wirtsorganismus geschützt.

Kälber bis zum Alter von 30 Tagen sind empfänglicher für eine MAP-Infektion und die spätere Ausbildung klinischer Symptome, während ältere Tiere ab ca. 6–24 Monaten als partiell resistent gelten (Rankin 1961; Larsen et al. 1975; Chiodini et al. 1984). Hierfür gibt es eine Reihe von Erklärungen: Zum einen wird die geringere Empfänglichkeit älterer Tiere auf die Verringerung der M-Zellen des Darms zurückgeführt (Clarke 1997; Liebler-Tenorio und Pabst 2006), die eine bedeutende Rolle im Infektionsgeschehen spielen. In den Peyerschen Platten des Ileums, die bei Jungtieren ihren höchsten Entwicklungsgrad haben, herrscht ein potenzieller T-Zell-Mangel, der ebenfalls günstig für den Erreger zu sein scheint (Clarke 1997). Eine weitere Erklärungsmöglichkeit liegt in der Umgehung der Pansenflora durch den Schlundrinnenreflex bei Kälbern, welcher eine schnellere Passage der Mycobakterien nach der oralen Aufnahme zum Dünndarm als bei Adulten bewirkt. Sweeney (1996) erklärt die erhöhte Empfänglichkeit von Neonaten für eine MAP-Infektion mit der vereinfachten Passage von Makromolekülen *post natum*. Maternale Antikörper eines infizierten Muttertieres scheinen den Eintritt der Bakterien in die intestinale Mucosa des Kalbes zu begünstigen (Momotani et al. 1988).

Eine Infektionsdosis von 10^4 Erregern pro Kalb ist ausreichend (Gerlach 2002), allerdings begünstigen hohe Dosen die Infektion (Clarke 1997). Dies konnte in einer weiteren Studie von Sweeney et al. (2006a) bestätigt werden, in der Kälber mit verschiedenen hohen Dosen von MAP experimentell infiziert wurden. Mit der Menge des Inokulums stieg die Anzahl der später in Kultur positiven Gewebe je Tier. Kälber, die am zweiten und dritten Lebenstag infiziert wurden, ergaben signifikant mehr positive Gewebekulturen als die Kälber, deren Infektion am 21. und 22. Lebenstag stattfand. Es muss jedoch herausgestellt werden, dass die Infektionsdosis im ersten Fall $2,5 \times 10^{10}$ KBE, im zweiten Fall nur $1,5 \times 10^6$ KBE betrug. Im Falle der Verabreichung von nur 2×10^5 KBE war in dieser Untersuchung keine Infektion nachweisbar.

2.1.3.1 Verlauf der Immunantwort

Der Infektionsverlauf der Paratuberkulose kann in drei Stadien eingeteilt werden. (a) nicht infiziert, (b) infiziert mit vorherrschender zellvermittelter Immunantwort, geringer humoraler Beteiligung und sehr seltenem Nachweis der Bakterien im Kot sowie (c) fortgeschritten infiziert (Nielsen et al. 2002a). Mit der Erregervermehrung und dem Zugrundegehen der Makrophagen unter Freisetzung der Bakterien nimmt die humorale Immunantwort zu. Es sind erhöhte Antikörpertiter messbar und der Erregernachweis im Kot gelingt häufiger (Nielsen et al. 2002a; Toft et al. 2005).

Antikörper gegen MAP sind nicht von protektivem Wert (Chiodini et al. 1984; Burrells et al. 1998; Waters et al. 1999; Stabel 2000), dennoch unterstützen sie die T-Zell-Antwort durch Antigenpräsentation und Ankurbelung der Immunantwort. Während der humoralen Immunabwehr besteht somit eine höhere Wahrscheinlichkeit der Erregerausscheidung und somit Infektiosität als während der zellvermittelten Immunantwort (Stabel 2000; Stabel et al. 2002).

In experimentellen Infektionen konnte jedoch mit einem LAM-ELISA schon früh eine humorale Immunantwort nachgewiesen werden, was der vorherrschenden Lehrmeinung der späten Antikörperentwicklung widerspricht (Waters et al. 2003). Gestützt wird diese These durch Koets et al. (2001). Da MAP hauptsächlich auf das Wachstum innerhalb der Makrophagen beschränkt ist, sind der proinflammatorische und zytotoxische Bereich der Immunabwehr essenziell für die Kontrolle der Infektion (Coussens 2004). Kürzlich wurde die Bildung von Autoantikörpern beim Schaf im Verlauf der klinischen Paratuberkulose-Erkrankung nachgewiesen (Berger et al. 2007).

Th1 und Th2 sind an der Aktivierung des Immunsystems des Wirtes beteiligt, indem sie die Produktion der Zytokine IFN- γ , IL-2 und TNF- α induzieren, welche die Infektion in der subklinischen Phase halten (McDonald et al. 1999). Der klinische Ausbruch einer Paratuberkulose-Erkrankung ist beim Rind mit einem Wechsel der T-Helferzell (Th)-1-dominierten Immunabwehr zu einer Th-2-gesteuerten Immunabwehr verbunden (Coussens et al. 2004).

Es kann in jedem, hauptsächlich jedoch im Endstadium zu einem Zustand der Anergie kommen, in der jegliche Abwehrreaktionen des Wirtsorganismus gegen den Erreger fehlen (Merkal et al. 1970; Chiodini et al. 1984; Winterhoff 2000). Eine antigen-spezifische T-Zell-Anergie ist auch bei Lepra und anderen mycobakteriellen Infektionen bekannt (zusammengefasst von Waters et al. 1999) und führt zu einem Fortschreiten der Erkrankung.

2.1.4 Klinik

Whitlock und Bürgelt (1996) unterscheiden vier Stadien der Paratuberkulose:

1. Eine Phase der stillen Infektion bei Tieren bis zu zwei Jahren, die noch nicht mit klinischer Symptomatik einhergeht.
2. Die Phase der subklinischen Infektion, die ebenfalls noch keine Krankheitszeichen erkennen lässt, aber zu teilweise messbaren Antikörpertitern führt und mit einer erhöhten Anfälligkeit für andere Krankheiten wie Mastitis oder Infertilität assoziiert ist.
3. Die Phase der klinischen Erkrankung.
4. Die Phase der fortgeschrittenen klinischen Erkrankung. Dritte und vierte Phase gehen ineinander über und beginnen nach einer Inkubationszeit von zwei bis zehn Jahren. In diesen Stadien sind viele, jedoch nicht alle, Tiere über eine Kotkultur identifizierbar. Laborparameter wie Albumin, Gesamtprotein und Triglyceride fallen unter den Referenzbereich, sind aber aufgrund ihrer Unspezifität nicht als Krankheitsindikatoren geeignet. Abmagerung, Ödeme, stumpfes Haarkleid sowie unstillbare Durchfälle sind die einprägsamsten Zeichen der klinischen Paratuberkulose-Erkrankung. Der Schweregrad der klinischen Symptomatik korreliert nicht mit der Schwere der histologisch feststellbaren Läsionen im Intestinum (Clarke 1997).

In der klinischen oder exkretorischen Phase kommt es zu massenhafter Ausscheidung der Mycobakterien in Kot, Kolostrum und Milch, die bis zu 5×10^{12} Erreger pro Tag ausmacht (Chiodini et al. 1984). Je jünger das Tier zum Zeitpunkt der Infektion war, desto früher sind klinische Symptome der Erkrankung zu erwarten (Clarke 1997). Gewöhnlich treten klinische Symptome nicht vor dem zweiten bis fünften Lebensjahr auf.

2.1.5 Nachweis

Zum Nachweis der Paratuberkulose bestehen zwei Möglichkeiten:

1. der Nachweis des Erregers bzw. seiner DNA (direkter Nachweis),
2. der Nachweis einer stattfindenden bzw. stattgefundenen Immunreaktion auf MAP-Antigene (indirekter Nachweis).

Die Diagnostik ist nicht nur abhängig von der Sensitivität bzw. Spezifität der verwendeten Methoden, sondern auch vom Stadium der Erkrankung des getesteten Tieres, das einen Einfluss auf die Serokonversion hat (Gasteiner et al. 2000; Nielsen et al. 2002b). In Herden mit einer geringeren Krankheitsprävalenz besteht ein erhöhtes Risiko der falschen Klassifizierung von Einzeltieren, da der prädiktive Wert eines Tests auch von der Prävalenz der Erkrankung in der Population beeinflusst wird (Hendrick et al. 2005b).

2.1.5.1 Direkter Nachweis

2.1.5.1.1 Kotkultur

Die Kotkultur gilt als Goldstandard (Chacon et al. 2004). Die Kultivierungsdauer beträgt 8–12 Wochen. Vorteil der Methode ist die hohe Spezifität. Nachteilig zu bewerten ist jedoch, dass diese Methode teuer, durch wochen- bis monatelange Anzuchtdauer zeitaufwendig und störanfällig ist, da die Begleitkeime zerstört werden müssen (Collins 1994). Zudem weist sie eine geringe Sensitivität von ca. 50 % auf (Homuth 2002), da aufgrund der langen Inkubationszeit und der intermittierenden Ausscheidung der Erreger nicht alle MAP-positiven Tiere erkannt werden. Während der ersten 300 Tage einer Laktation ist die Testsensitivität erhöht (Nielsen und Ersboll 2006), daher empfiehlt sich eine Testdurchführung in frühen Laktationsstadien. Des Weiteren sind falsch positive Ergebnisse durch passagere Mycobakterien (Sweeney et al. 1992a) im Kot der Tiere möglich, denkbar bei hoher Keimbelastung im Bestand.

2.1.5.1.2 Mikroskopie

Die Ziehl-Neelsen-Färbung ist aufgrund der wachsartigen Mykolsäuren in der Bakterienzellwand geeignet, MAP in Abklatschpräparaten der Rektumschleimhaut sowie in Kotasstrichen darzustellen (Homuth 2002).

Der mikroskopische Nachweis von Nestern des Erregers ist einfach, schnell und kostengünstig, aber trotzdem nur bei Tieren mit klinischer Symptomatik anzuraten, da nur dann eine ausreichend hohe Sensitivität des Verfahrens zu erwarten ist. Die Spezifität ist gering, nur ein Drittel der Fälle kann mit einer Kotprobe bestätigt werden (OIE 2006).

2.1.5.1.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die häufigste angewendete PCR-Methode detektiert das Insertionselement IS900 (Bull et al. 2003). Dieses Verfahren ist im Gegensatz zur Kultur sehr schnell durchführbar, allerdings lässt es keine Aussage über die Vermehrungsfähigkeit der Erreger zu (Naser et al. 2004), sondern beweist nur das Vorhandensein von MAP-DNA im untersuchten Probenmaterial. Falsch positive Ergebnisse sind jedoch möglich. So konnten schon Cousins und Mitarbeiter (1999) IS900-artige PCR-Fragmente amplifizieren, die von anderen Mycobakterienspezies stammten.

2.1.5.1.4 Untersuchung des Ileozäkallymphknotens

Aufgrund der bevorzugten und frühen Kolonisation des Ileozäkallymphknotens ist die Kultur dieses Lymphknotens zur Detektion der Infektion mit MAP gut geeignet (Wu et al. 2007). Demgegenüber stehen die Ergebnisse einer Studie von Sweeney et al. (2006a). Bei zwei von sechs respektive 15 von 20 experimentell infizierten Kälbern, bei denen entweder aus Geweben oder aus dem Jejunallymphknoten die kulturelle Anzucht des Erregers gelang, erbrachte die Kultur des Ileozäkallymphknotens negative Ergebnisse. Minimalinvasive

Verfahren zur Biopsie von Darmlymphknoten bei Kälbern könnten zukünftig eine wichtige Erweiterung und Verbesserung der Diagnostik der MAP-Infektion darstellen (Seeger et al. 2007).

2.1.5.2 Indirekter Nachweis

2.1.5.2.1 Serologie

Die zum serologischen Nachweis prinzipiell geeigneten Testverfahren sind die Komplementbindungsreaktion (KBR), die Agargelimmunodiffusion (AGID) sowie der Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), deren gemeinsamer Nachteil in der späten Einsatzmöglichkeit im Verlauf der Infektion liegt (Harris und Barletta 2001). Der ELISA ist von den genannten Methoden am sensitivsten (Collins 1996) und das am häufigsten verwendete Testsystem im Herdensingreening (Gasteiner et al. 1999; Muskens et al. 2003). Es handelt sich um eine kostengünstige und für große Probenzahlen geeignete Methode. Allerdings herrscht die humorale Typ-2-Immunantwort mit messbarer IgG1-Produktion erst in späten Stadien der Erkrankung vor (Coussens 2004). Der Nachweis spezifischer Antikörper hängt auch entscheidend von der Auswahl der verwendeten Isotypen und Antigene im Test ab (Waters et al. 2003). Die Methode der Antigenpräparation beeinflusst die Sensitivität und Spezifität (zusammengefasst von Harris und Barletta 2001). Problematisch ist die Einstufung der Tiere, die bei alleiniger serologischer Antikörpertestung, z. B. im Rahmen von Routineuntersuchungen, negativ reagieren, jedoch einen positiven Erregernachweis erlauben (Dreier et al. 2006).

Der Zeitpunkt der Antikörperproduktion hängt von der Infektionsdosis und dem Infektionsweg ab. Hohe Infektionsdosen führen zu einer schnelleren Produktion von humoralen Antikörpern (Waters et al. 2003). Den Autoren gelang es, 143 Tage nach der experimentellen Infektion von Kälbern mit MAP Antikörper mittels eines LAM-ELISA nachzuweisen, während mit einem kommerziellen ELISA zu keinem Zeitpunkt der Studie (320 Tage) die Infektion nachweisbar war. Die Menge des Inokulums, der Infektionszeitpunkt und der Infektionsweg entsprachen in dieser Studie indes keiner natürlichen Infektion, da MAP in die Krypten der Tonsillen instilliert wurde.

Ein Teil der infizierten Rinder tritt nie in das Stadium der klinischen Erkrankung ein, das von den typischen Symptomen geprägt ist (Toft et al. 2005), und es gibt aktuell auch kein Testsystem, das auf eine spätere klinische Erkrankung des getesteten Tieres hinweisen kann. Nielsen und Ersboll (2006) konnten in ihrer Untersuchung feststellen, dass wiederholte Tests mit dem ELISA-Verfahren 98 % der starken sowie 95 % der schwachen MAP-Ausscheider erkennen. Es konnten jedoch nur 72 % der im ELISA positiven Tiere durch Kotkultur als Ausscheider ermittelt werden. Die Autoren zogen den Schluss, dass die meisten infizierten Tiere Antikörper ausbilden. Die größte Wahrscheinlichkeit, im ELISA ein positives Testergebnis zu erreichen, liegt zwischen 2,5 und 4,5 Jahren, unter Berücksichtigung der

Kotkultur bei 2,5–5,5 Jahren. Bei Tieren unter vier Jahren ergibt sich bei monatlicher Testung mit ELISA eine Erhöhung der Wahrscheinlichkeit, Antikörper zu detektieren, von 19 %, verglichen mit der Testung in halbjährlichen Intervallen.

Kommt es im ersten oder zweiten Trimester der Gravidität zu einer Infektion des Fetus, kann sich eine Immuntoleranz entwickeln (Chiodini et al. 1984). Die betroffenen Tiere sind entweder in der Serologie falsch negativ oder weisen nur in der zellvermittelten Abwehr Defizite auf, während sie eine physiologische humorale Immunantwort entwickeln. Es wird empfohlen, jeweils eine serologische Testmethode mit der Detektion des Antigens zu kombinieren, um die Sensitivität zu erhöhen (Gasteiner et al. 2000).

2.1.5.2.2 Sonstige Methoden

Weitere indirekte Nachweismethoden, die von geringerer Bedeutung sind, zeigt Tabelle 2.

Tabelle 2: Indirekte Nachweismethoden für *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* nach Homuth (2002) und OIE (2006).

	Methode	Vorteile	Nachteile
Johnin-Hauttest	Hautdickenzunahme, Typ-IV-Reaktion vom Spättyp nach Applikation von MAP-Antigen	–	geringe Sensitivität und Spezifität, nicht standardisierbar
Interferon-Test	Nachweis der zellulären Immunantwort durch IFNgamma-Messung	–	geringe Sensitivität und Spezifität, erhöhte sowie erniedrigte Spiegel bei MAP infizierten Tieren möglich, nicht standardisierbar
Agargel-Immunodiffusionstest (AGID)	Inkubation von MAP-Antigen mit Test- und Kontrollseren, Vergleich der Präzipitationszonen	einfach, kostengünstig, hohe Spezifität, v. a. bei Schafen und Cameliden	bei Rindern geringe Sensitivität
Komplementbindungsreaktion (KBR)	verschiedene Testverfahren zur Messung humoraler Immunantwort	geeignet bei klinisch verdächtigen Tieren	geringe Sensitivität und Spezifität, nicht standardisierbar, in manchen Ländern vorgeschrieben

2.1.6 Therapie und Impfung

Die Paratuberkulose-Erkrankung ist nicht heilbar, obwohl der Erreger *in vitro* gegenüber anti-tuberkulösen Medikamenten empfindlich ist. Es kann zwar eine zeitlich begrenzte Abschwächung der klinischen Symptome durch Antibiotika erreicht werden, aber die

Erregerausscheidung konnte durch Medikamente nicht beeinflusst werden (Chiodini et al. 1984).

In Deutschland ist zurzeit kein Impfstoff gegen Paratuberkulose zugelassen. Die Impfung führt zu einer verminderten Ausscheidung des Erregers und einer geringeren Anzahl klinisch kranker Tiere, verhindert jedoch nicht die Infektion und induziert eine Immunantwort, die eine Differenzierung zwischen geimpften und natürlich infizierten Tieren und somit die serologische Diagnostik unmöglich macht (zusammengefasst von Muskens et al. 2000).

2.1.7 Erbllichkeit

Es gab frühzeitig Hinweise darauf, dass die Anfälligkeit für Paratuberkulose von einer genetischen Komponente beeinflusst wird. Schon 1959 berichteten Hole und Maclay vom unterschiedlich häufigen Auftreten der Paratuberkulose-Erkrankung in bestimmten Rinderfamilien derselben Rasse und unter identischen Haltungsbedingungen. Im selben Jahr untersuchte Withers (1959) das Vorhandensein von Paratuberkulose in britischen Gebieten und ermittelte eine erhöhte Inzidenz bei der Rasse Jersey. Cetinkaya et al. (1997) berichteten ebenfalls in Großbritannien ein gehäuftes Vorkommen der klinischen Paratuberkulose in den beiden von den Kanalinseln stammenden Rassen Jersey und Guernsey, verglichen mit Holstein und anderen Rassen sowie deren Kreuzungen. Clarke (1997) sieht keine rassespezifischen Empfänglichkeitsunterschiede und erklärt die Häufung von Erkrankungen bei manchen Rinderrassen mit deren vermehrtem Vorkommen in spezifischen Regionen. Chiodini et al. (1984) sehen ebenfalls die Häufung der Paratuberkulose-Infektion in bestimmten Rassen proportional zur Häufigkeit der Rasse und interpretieren dies nicht als Verschiedenheit in der Resistenz gegenüber MAP, sondern als rasseabhängig unterschiedlichen Ausbreitungsgrad. Ferner führen die Autoren die geringere Inzidenz bei Fleischrindern auf deren extensivere Haltungsformen und den dadurch resultierenden geringeren Kontakt mit kontaminierten Fäzes zurück.

Vom Schloß (2000) wies für Schwarzbunte Rinder in Niedersachsen und Nordrhein-Westfalen eine signifikante Rassedisposition ($p = 0,0029$) nach, an Paratuberkulose zu erkranken. Gestützt wird dieses Ergebnis durch Gasteiner und Mitarbeiter (2000), die für die Rasse Holstein-Friesian in Österreich einen signifikant höheren Anteil an seropositiven Reagenten, verglichen mit anderen Rinderrassen, ermittelten.

Die Heritabilität in zwei verschiedenen indischen Ziegenrassen variiert von 0,01–0,15 (Singh et al. 1990). Grundlage der Einteilung war die kulturelle Kotuntersuchung über drei Jahre sowie die postmortale Untersuchung der Tierkörper einschließlich der Ileozäkal- und Mesenteriallymphknoten.

Beim Rind wurde die erste Heritabilitätsschätzung von Koets et al. (2000) an niederländischen Milchrindern durchgeführt. Die Einstufung der Tiere erfolgte auch hier basierend auf der mikrobiellen und histologisch-pathologischen Untersuchung geschlachteter Kühe. Die

Erblichkeit für die Population der geimpften Tiere betrug 0,09, die für die ungeimpften Tiere 0,01. In der Gesamtpopulation (3020 Tiere) betrug die Heritabilität 0,06.

Eine weitere Studie an 11535 dänischen Kühen unter Berücksichtigung der täglichen Milchmenge sowie der optischen Dichte als abhängigen Variablen ergab im Tiermodell eine Heritabilität von 0,10. Grundlage hierfür war die Einteilung des Paratuberkulosestatus beim lebenden Tier durch einen ELISA an Milchproben und damit die Höhe des Antikörpertiters. Die tägliche Milchmenge und die Antikörpermenge waren geringfügig korreliert, allerdings nicht signifikant (-0,037). Unter Anwendung des Vatermodells betrug die geschätzte Erblichkeit 0,09 (Mortensen et al. 2004).

Gonda et al. (2006a) untersuchten die Töchter von zwölf Holstein-Bullen mit einer kombinierten Methode aus ELISA-Tests und Kotkultur auf eine Infektion mit MAP. Basierend hierauf schätzten sie Heritabilitäten und fanden eine Erblichkeit von 0,102 bei Berücksichtigung beider Testverfahren sowie 0,153 für die Kotkultur. Sie ermittelten Heritabilitäten von 0,09–0,16 für den Antikörpertiter.

2.1.8 Wirtschaftliche Bedeutung

Die wirtschaftliche Bedeutung der Paratuberkulose erstreckt sich nicht nur auf direkte Verluste, die durch Todesfälle bedingt sind, sondern vor allem auf die verringerte Mast- bzw. Milchleistung der Tiere und erhöhte Kosten für die Remontierung (Ott et al. 1999). Verglichen mit nicht infizierten Rinderherden kommt es bereits bei subklinisch infizierten Kühen zu einem Rückgang der Milchleistung und zur Verschlechterung reproduktionsassoziierter Parameter (Abbas et al. 1983; Nordlund et al. 1996; Johnson-Ifeorunlu et al. 2000). Hendrick et al. (2005b) untersuchten Kühe mittels Kotkultur, Milch- und Serum-ELISA. Tiere, die in Kultur und Milchserologie positive Ergebnisse aufwiesen, hatten geringere Milchleistung sowie Fett- und Proteinmengen als negativ getestete Herdenmitglieder. Die 305-Tagesleistung von allen blutserologisch positiven Rindern unterschied sich nicht von der Milchleistung negativ getesteter Kühe, jedoch zeigte sich eine signifikante Reduktion der Proteinmenge. Tiere mit positiven Testergebnissen in einem der drei verwendeten Tests hatten ein höheres Risiko, vorzeitig aus der Herde entfernt zu werden.

In einer Herde von Angus-Brahman-Kreuzungstieren sowie Reinzuchttieren hatten Kühe, die im ELISA höhere Antikörpertiter aufwiesen, einen höheren Gewichtsverlust von der Kalbung bis zum Absetzen der Kälber sowie eine längere Günstzeit und kleinere Kälber als Rinder mit negativem ELISA-Ergebnis oder geringeren Antikörpertitern (Elzo et al. 2006). Die wirtschaftlichen Verluste wurden von Benedictus et al. (1987) auf 209 £ pro subklinisch infiziertem Tier in Europa geschätzt.

2.2 Paratuberkulose bei anderen Wiederkäuern

MAP betrifft nicht nur die Hauswiederkäuer Rind, Schaf und Ziege, sondern wurde auch bei

Dickhornschafen (Williams et al. 1983), Tule-Wapitis, einer Unterart des Rothirsches (Cook et al. 1997), Weißwedelhirschen (Chiodini und Van Kruiningen 1983), Bisons (Buergelt et al. 2000) und Antilopen (Dukes et al. 1992) beschrieben, was vor allem im Hinblick auf die Übertragungswege des Erregers von Bedeutung ist.

2.3 Paratuberkulose bei Nichtwiederkäuern

Die Infektion mit MAP wurde bei einigen Nichtwiederkäuern nachgewiesen. Betroffene Spezies waren unter anderem Hund, Fuchs, Hermelin, Mauswiesel, Feldhase, Dachs, verwilderte Hauskatzen sowie verschiedene Rabenvögel (Vogel 1970; Beard et al. 1999; Beard et al. 2001; Palmer et al. 2005). Greig und Mitarbeiter (1997) fanden sowohl die charakteristischen Befunde im Darm von Kaninchen als auch den Erreger im Kot der Tiere.

Erkrankungsfälle wurden ebenfalls in einer Kolonie von Makaken durch IS900-PCR dokumentiert, ein Teil der betroffenen Tiere starb an ähnlicher Symptomatik wie an Paratuberkulose erkrankte Rinder (McClure et al. 1987). Bei einem Mandrill wurde intermittierende, wässrige Diarrhö und fortschreitender Gewichtsverlust beschrieben. In der pathologischen Untersuchung wurden eine generalisierte Lymphknotenschwellung und eine granulomatöse Entzündung der intestinalen Mucosa festgestellt. Die Ziehl-Neelsen-Färbung ergab hohe Zahlen von Mycobakterien in den betroffenen Arealen, welche durch kulturelle Anzucht und nachfolgende IS900-PCR als MAP identifiziert wurden (Zwick et al. 2002).

2.4 Morbus Crohn – Paratuberkulose beim Menschen?

Seit Morbus Crohn entdeckt (Dalziel 1913) und als eigenes Krankheitsbild beschrieben wurde (Crohn et al. 1932), gibt es Spekulationen über die Mitwirkung des *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* an der Ätiologie der Erkrankung.

Morbus Crohn gehört zur Gruppe der chronischen entzündlichen Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes (Inflammatory Bowel Diseases, IBD). Ein Hauptsymptom der Erkrankung ist schwere Diarrhö, die meist in Schüben verläuft. Prinzipiell kann jeder Abschnitt des Magen-Darm-Trakts betroffen sein, gesunde und kranke Gewebeabschnitte können sich benachbarn. Morbus Crohn ist – wie Paratuberkulose beim Rind – eine Erkrankung, die alle Schichten des Darms betrifft (Chacon et al. 2004).

Beim Menschen wurden drei Erkrankungsfälle unter Beteiligung von MAP beschrieben. Ein an AIDS erkrankter Mann entwickelte eine schwere Durchfallerkrankung, woraufhin unter anderem in Darmbiopaten Mycobakterien gefunden und sowohl kulturell als auch durch PCR nachgewiesen werden konnten (Richter et al. 2002). Bei einem 7-jährigen Jungen wurde MAP in einem Halslymphknoten nachgewiesen, fünf Jahre später entwickelte dieser die Symptome eines Morbus Crohn (Hermon-Taylor et al. 1998).

Ein 21-jähriger Kanadier, bei dem drei Jahre zuvor M. Crohn diagnostiziert worden war, litt unter terminaler Ileitis und granulomatöser Kolitis, die sich als resistent gegenüber allen

gängigen Therapieversuchen zeigten. Mithilfe der IS900-PCR von entnommenen Gewebeproben konnte MAP nachgewiesen werden, woraufhin der Patient einer Therapie mit den antibiotisch wirksamen Medikamenten Clarithromycin und Rifabutin unterzogen wurde. Dies resultierte nach einer Erstverschlimmerung unter Entwicklung von Symptomen, die aus der Tuberkulosetherapie bekannt sind, in einer deutlichen Verbesserung des Gesundheitszustands (Behr et al. 2004). MAP wurde bereits in Geweben nachgewiesen, die von Crohn-Patienten stammten (u. a. Bull et al. 2003; Autschbach et al. 2005; Romero et al. 2005), ebenso in der pelletierten Fraktion aus Muttermilch von zwei stillenden Crohn-Patientinnen (Naser et al. 2000). Sechi et al. (2005) detektierten MAP in Biopsaten der intestinalen Mukosa von 25 aus 30 Crohn-Patienten, allerdings auch in drei Kontrollproben, durch IS900-PCR und teilweise durch kulturelle Anzucht. Der kulturelle Nachweis aus Blut von Crohn-Patienten gelang Naser et al. (2004), was für eine systemische Infektion spricht. In dieser Studie waren auch vier Probanden mit ulzerativer Kolitis und drei gesunde Individuen ohne IBD in der PCR positiv, wogegen aus keiner der entnommenen Proben der Kontrollgruppe die kulturelle Anzucht gelang. Diese Ergebnisse spiegeln allerdings auch die weite Verbreitung des Bakteriums in der Umwelt wider und sind nicht beweisend für die ätiologische Beteiligung von MAP an der Entwicklung eines Morbus Crohn, da der Erreger auch jeweils innerhalb der Kontrollgruppen auftrat.

Gegen eine ursächliche Beteiligung des MAP an Morbus Crohn spricht die Tatsache, dass die Erkrankung in ländlichen Gebieten seltener auftritt als in städtischen, wobei auf dem Land eine höhere Exposition der Bevölkerung durch die Kontamination mit MAP besteht. Ferner scheinen mangelhafte Hygienebedingungen, endemischer Parasitenbefall und Überbevölkerung – Situationen, die eigentlich eine Übertragung von Infektionskrankheiten begünstigen – vor einer Erkrankung mit Morbus Crohn zu schützen. Gene, die unter mangelhaften Hygienebedingungen zur Resistenz beitragen, scheinen in modernen Umwelten ein Risiko für immunbedingte entzündliche Prozesse darzustellen (Anonymus 2004).

Es gibt keine Anhaltspunkte für eine Übertragbarkeit der Erkrankung beim Menschen (Anonymus 2004). Durch eine immunsuppressive Behandlung mit Anti-TNF- α steigt zwar das Risiko einer disseminierten Tuberkulose, es erfolgt aber keine Streuung von MAP im Organismus von an Morbus Crohn erkrankten Personen (Shanahan und O'Mahony 2005). Ein infektiöses Agens, das eine hochgradige Entzündungsreaktion im Darm wie bei Morbus Crohn verursacht, würde vermutlich auch eine starke zelluläre bzw. humorale Immunantwort des Organismus gegen MAP auslösen, was bei Crohn-Patienten nicht der Fall ist (Anonymus 2004). Der alleinige Nachweis von MAP-DNA könnte auch durch eine reine Passage des Erregers, z. B. nach Aufnahme kontaminierter Lebensmittel, durch den Darm erklärt werden (Greenstein 2003). Es könnte sich um eine reine Kolonisation durch MAP oder um eine Sekundärinfektion handeln (Grant 2005).

2.5 Zucht auf Krankheitsresistenz beim Rind

Da eine Therapie bzw. sichere Prophylaxe durch Impfung für die Infektion mit MAP und die Paratuberkulose-Erkrankung nicht möglich ist (Kapitel 2.1.6), stellt sich die Frage nach weiteren Maßnahmen zur Eindämmung der Paratuberkulose. Neben technischen und Managementmaßnahmen, die zwar teilweise wirkungsvoll (Goodger et al. 1996; Johnson-Ifearewande und Kaneene 1998), jedoch von der Durchführung auf einzelnen Betrieben abhängig und daher anfällige bzw. kurzfristige Maßnahmen sind, stellt sich die Frage nach tiefgreifenden Methoden der Vorbeugung, wie sie die Zucht auf geringere Empfänglichkeit für Paratuberkulose ermöglichen könnte. Die mögliche ursächliche Beteiligung des Erregers *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* am M. Crohn des Menschen gibt weitere Veranlassung zur Bekämpfung der Infektion des Rindes im Sinne des vorbeugenden Verbraucherschutzes.

Krankheitsresistenz ist definitionsgemäß die ererbte Fähigkeit eines vorher nicht exponierten Tieres, widerstandsfähig gegen eine Erkrankung zu sein, nachdem es einem Pathogen ausgesetzt wurde (Adams und Templeton 1998).

Ein Teil der Varianz von Resistenzmerkmalen ist auf Umweltfaktoren zurückzuführen, ein Teil jedoch ist erblich und wird daher auf die Nachkommen übertragen. Die meisten Merkmale, die Krankheitsanfälligkeit und Fruchtbarkeit betreffen, haben eine geringe Heritabilität (Lyons et al. 1991; Uribe et al. 1995; Heringstad et al. 2005; Snowden et al. 2005). Der züchterische Effekt in Bezug auf Resistenzmerkmale ist daher geringer als bei hoch erblichen Merkmalen, die beispielsweise das Exterieur betreffen. Dennoch, gerade bei Merkmalen, die schwierig durch eine klassische Selektion zu beeinflussen sind, ermöglicht die markergestützte Selektion (MAS) eine direkte Selektion auf erwünschte genetische Varianten und damit Fortschritte in der Tierzucht (Dekkers und Hospital 2002; Raadsma und Fullard 2006). Der erfolgreiche Einsatz molekulargenetischer Methoden in der Tierzucht gelang unter anderem beim Maligne-Hyperthermie-Syndrom des Schweins (Fujii et al. 1991), bei der Bovinen Leukozyten Adhäsionsdefizienz (BLAD) des Rindes (Kehrli et al. 1990) oder bei der Zucht auf Scrapieresistenz beim Schaf (Hunter 2003).

Die schwierige Merkmalerfassung und -definition, die niedrige Heritabilität sowie die lange Inkubationszeit der Paratuberkulose machen sie zu einem überaus interessanten Gebiet für die MAS (Dekkers 2004), gleichwohl sich die Frage nach der Wirtschaftlichkeit dieser kostenintensiven Methode stellt (Dekkers und Hospital 2002). Es gibt verschiedene genetische Marker, die in der MAS angewendet werden. Dies sind 1.) direkte Marker, die für eine funktionelle Mutation kodieren und in der gengestützten Selektion (GAS) angewendet werden, 2.) LD-Marker (Marker, die sich populationsweit im Kopplungsungleichgewicht mit der funktionellen Mutation befinden und abhängig von der Populationsstruktur 1–5 cM nahe der Mutation liegen sollten), sowie 3.) Marker, die sich populationsweit im Kopplungsungleichgewicht mit der funktionellen Mutation befinden (LE-Marker). LE-Marker sind durch

genomweite Untersuchungen in Halbgeschwisterfamilien oder an Kreuzungstieren zu finden. Direkte Marker und bis zu einem gewissen Grad auch LD-Marker erlauben es, direkt auf einen bestimmten Genotyp zu selektieren, da die Assoziation zwischen Genotyp und Phänotyp populationsweit konsistent ist (Dekkers 2004). In jeder untersuchten Population, in der ein LD-Marker angewendet wird, muss die Kopplung dieses Markers mit der funktionellen Variante, die zwischen Populationen unterschiedlich sein kann, abgeschätzt werden (Dekkers und Hospital 2002).

Aufgrund der bisher ermittelten Heritabilitäten gäbe es grundsätzlich die Möglichkeit, auf eine verbesserte Resistenz gegenüber MAP zu züchten, da es sich hier um eine sehr nachhaltige, von Umwelteinflüssen unabhängige Möglichkeit handelt. Mit klassischen Zuchtmethoden, die auf phänotypischer Ausprägung von Merkmalen basieren, ist der Zuchtfortschritt aufgrund der hohen Umwelteffekte begrenzt (Wolf 2005). Die Erblichkeit der Paratuberkulose von rund 10 % deutet darauf hin, dass entsprechende Polymorphismen im Genom einen Einfluss auf die Infektion mit MAP nehmen. Spezifische Gene bzw. Genprodukte, die für die Infektion mit MAP und den Verlauf der Paratuberkulose verantwortlich sind, sind bisher nicht bekannt.

2.5.1 Voraussetzungen für genetische Studien

Jede genetische Analyse der variierenden Krankheitsresistenz ist davon abhängig, dass die betroffenen Tiere auch als resistent bzw. empfänglich identifiziert werden können. (Adams und Templeton 1998). Einfluss auf die Infektion der Kälber haben nicht nur der Infektionsweg und die Infektionsdosis, sondern auch der MAP-Stamm, das Alter des Tieres sowie dessen Immunstatus und genetische sowie umweltbedingte Faktoren (Clarke 1997). Besonders hervorzuheben ist die Wirkung des Hygienemanagements der betroffenen Betriebe, die schwer zu standardisieren bzw. schwer messbar ist. (Goodger et al. 1996; vom Schloß 2000).

Um den genetischen Hintergrund der Beziehungen zwischen Pathogen und Wirtsorganismus analysieren zu können, müssen verschiedene Faktoren beachtet werden. Im Idealfall herrschen konstante Umweltbedingungen, die Infektionsdosis ist standardisiert und gewährleistet eine gleich bleibende Infektiosität des Erregers, eine gleich bleibende Infektionsroute, sowie eine geeignete einheitliche Merkmalerfassung (Adams und Templeton 1998). Voraussetzung ist weiterhin die Polymorphie untersuchter Mikrosatelliten bzw. Genloci, die besteht, wenn mindestens zwei Varianten existieren und die häufigste Variante in einer Allelfrequenz unter 99 % auftritt (Landegren et al. 1998).

Es bestehen in der Hauptsache zwei Möglichkeiten, genetische Varianten, die das Krankheitsrisiko beeinflussen, zu analysieren. Bei der Kopplungsanalyse werden genomweit Marker innerhalb von Familien analysiert, in denen das Merkmal nachgewiesen wurde. Hierdurch können Marker, die in Verwandten häufiger als erwartet mit dem Merkmal segregieren, verwendet werden, um krankheitsverursachende Gene zu finden. Das Potenzial, Allele mit moderatem Effekt auf die Merkmalsausprägung zu identifizieren, ist bei diesem

Ansatz meist gering (Hirschhorn 2005).

Assoziationsstudien haben mehr Potential, den Effekt von Genvarianten auf ein Merkmal zu erfassen als Kopplungsanalysen (Hirschhorn 2005). Der Marker muss jedoch im Kopplungsungleichgewicht mit dem empfänglichmachenden Allel (disease susceptibility allele, DSA) stehen. Aus diesem Grund ist eine große Tierzahl wichtig, um bei erwarteten Polymorphismen mit geringem Effekt zu aussagekräftigen Ergebnissen zu kommen. Es sind Probenzahlen von 500 (Long und Langley 1999) bis 1000 und mehr (Zondervan und Cardon 2004; Hirschhorn 2005) erforderlich, um in einer Assoziationsstudie allein nominell signifikante p-Werte ($p < 0,05$) zu erzielen. Die Wahrscheinlichkeit, eine Assoziation feststellen zu können, steigt ebenfalls mit dem Anteil des verantwortlichen Genortes an der phänotypischen Variation und mit der Zahl untersuchter Polymorphismen in einer Kandidatengenregion (Long und Langley 1999).

Studientypen, die sich eignen, die Assoziation von Krankheiten und Risikofaktoren zu ermitteln, sind Kohorten- oder Längsschnittstudien, Querschnittstudien und Fall-Kontrollstudien (Klug et al. 2007). Eine Assoziation liegt vor, wenn ein spezifisches Allel eines genetischen Markers in einer Population häufiger bei erkrankten als bei gesunden Individuen vorkommt (Böddeker und Ziegler 2000). In Fall-Kontroll-Studien werden erkrankte und nicht erkrankte Individuen bezüglich verschiedener Risikofaktoren verglichen. Wichtig ist die Anpassung (Matching) der Kontrolle nach Alter, Betrieb und Geschlecht (Klug et al. 2007), um die Gefahr systematischer Fehler, die zu einer Verzerrung (bias) von Ergebnissen führen, zu verringern.

2.6 Kandidatengenansatz

Kandidatengene sind Gene, die aufgrund ihrer (möglichen) biologischen Funktion oder bedingt durch ihre Position innerhalb eines QTLs möglicherweise für die phänotypische Ausprägung eines Merkmals verantwortlich sind (Böddeker und Ziegler 2000). Da eine morphologische und klinische Ähnlichkeit zwischen M. Crohn beim Menschen und Paratuberkulose beim Rind besteht (Chacon et al. 2004), kann man davon ausgehen, dass ähnliche immunologische Mechanismen in der Krankheitsentstehung eine Rolle spielen. Daher kann davon ausgegangen werden, dass Gene, die einen Einfluss auf die Ausprägung von M. Crohn haben, geeignete Kandidatengene zur Untersuchung von Paratuberkulose sind.

Andere *Mycobacteria* spp. als MAP verursachen Erkrankungen, bei denen ein genetischer Einfluss bewiesen ist. Bei der Lepra ist eine Punktmutation im *TLR2*-Gen des Menschen mit der schweren Verlaufsform assoziiert (Bochud et al. 2003, Kang et al., 2001), auch bei humaner Tuberkulose beeinflussen genetische Varianten die Krankheitsausprägung (Bellamy und Hill 1998; Bellamy et al. 1998; Bellamy 2000; Greenwood et al. 2000; Ben-Ali et al. 2004).

Die vermehrte bzw. verminderte Expression einzelner Gene in verschiedenen Stadien der

Paratuberkulose ist in zahlreichen Studien an Schafen (Alzherri et al. 1996; Burrells et al. 1999) und Rindern (Lee et al. 2001; Coussens et al. 2002; Aho et al. 2003; Buza et al. 2003; Coussens et al. 2004b; Khalifeh und Stabel 2004a; Coussens et al. 2005) untersucht worden.

2.6.1 Interleukin-12 (*IL12*)

IL-12 wird von aktivierten Makrophagen ausgeschüttet und ist essentiell für die Abwehr intrazellulärer Erreger. Weiss und Mitarbeiter (2002) untersuchten die Immunantwort boviner Makrophagen und fanden eine verringerte Expression von Interleukin-12, Interferon- γ und TNF- α nach Inkubation mit *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*. Beim Menschen besteht eine erhöhte Empfänglichkeit für mycobakterielle Infektionen bei Mutationen im *IL12*-Gen und bei Mutationen im *IL12*-Rezeptor (Basu et al. 2004).

IL12-defiziente Mäuse zeigen eine erhöhte Anfälligkeit für Erkrankungen, die durch Mycobakterien ausgelöst werden. *IL12B* kodiert für die p40-Untereinheit des IL12, *IL12A* für die p35-Untereinheit (Döffinger et al. 2006), daher wurden die Mikrosatelliten *BB719* in Locus *IL12B* sowie *BB704* in Locus *IL12A* zur Untersuchung ausgewählt (Tabelle 3).

2.6.2 Natural Resistance associated Macrophage Protein 1 (*NRAMP1*)

Synonym: Solute Carrier Family 11 (Proton-coupled divalent Metal Ion Transporters), Member 1

NRAMP1 ist ein integrales Membranprotein mit 12 transmembranären Domänen, das von Makrophagen exprimiert wird und am Transport divalenter Kationen beteiligt ist (Govoni und Gros 1998). Nach erfolgter Phagozytose befindet sich das Protein in der Membran des reifenden Phagosoms und modifiziert direkt oder indirekt die Umweltbedingungen für intrazelluläre Pathogene, indem es die Replikation beeinflusst (Gruenheid et al. 1997).

NRAMP1 ist assoziiert mit natürlicher Resistenz gegenüber Infektionen mit *Salmonella* sp., *Leishmania* sp. und *Mycobacterium* sp. bei der Maus (Vidal et al. 1993). Im Unterschied zur Maus, bei der *NRAMP1* die Fähigkeit vermittelt, in frühen Stadien einer Infektion mit *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin (BCG) zu kontrollieren, ist das menschliche *NRAMP1* vermutlich an der Ausprägung einer offenen Tuberkulose beteiligt. Die Ausbildung einer symptomatischen Tuberkuloseerkrankung wurde von Greenwood et al. (2000) untersucht. Die Autoren vermuten, dass die Empfänglichkeit von einem in der Nähe des *NRAMP1*-Gens liegenden, aber davon verschiedenen Gen beeinflusst wird. Beim Rind konnten Adams und Templeton (1998) sowie Barthel et al. (2001) eine Assoziation mit der Resistenz gegen *Brucella abortus* nachweisen, jedoch war keine Assoziation von Polymorphismen im *NRAMP1*-Gen mit der natürlichen Resistenz gegen Tuberkulose herstellbar (Barthel et al. 2000). Auch Estrada-Chavez et al. (2001) konnten beim Rind zwar eine Erhöhung der Expression des *NRAMP1*, jedoch keine protektive Wirkung gegen Tuberkulose feststellen. Daher scheinen zumindest beim Rind andere Genorte für die Resistenz gegen Tuberkulose verantwortlich zu sein (Chacon et al. 2004). Reddacliff et al. (2005) fanden eine mögliche Assoziation eines *NRAMP1*-Mikrosatellitenallels mit schwerer klinischer Paratuberkulose-Erkrankung beim Schaf.

2.6.3 Interferon- γ (*IFNG*)

Interferon- γ (*IFNG*) ist ein proinflammatorisches Zytokin. Es wirkt makrophagenaktivierend und ist der stärkste Gegenspieler des Interleukin-4. Es wird bei vielen Spezies zur Abwehr von Mycobakterieninfektionen und anderen intrazellulären Pathogenen wie *Leishmania* spp. oder *Listeria monocytogenes* benötigt (Flynn et al. 1993; Coussens 2004). *IFNG* wird von aktivierten T-Zellen und natürlichen Killerzellen sezerniert. Bei der menschlichen Tuberkulose gilt *IFNG* als wichtigstes Zytokin bei der Zellaktivierung (Cooper und Flynn 1995). Menschen mit einem Defekt des *IFNG*-Rezeptors sind hochempfindlich gegenüber Mycobakterieninfektionen (Altare et al. 1998a; 1998b).

Die *IFNG*-Genexpression in Geweben subklinisch infizierter Rinder ist signifikant höher als bei Tieren, die sich im klinischen Stadium der Erkrankung befinden (Stabel 1996; Sweeney et al. 1998; Khalifeh und Stabel 2004b). Die Expression in Geweben mit aktiver MAP-Infektion ist ebenfalls erhöht, allerdings wird sie teilweise durch eine erhöhte Produktion von TGF β in infizierten Geweben eingedämmt (Coussens et al. 2004c). Eine verringerte Produktion von *IFNG* führt zu einer erleichterten Ausbreitung der Infektion, da neu produzierte Makrophagen nicht ausreichend aktiviert werden (Coussens 2004). Zur Analyse ausgewählt wurde der Mikrosatellit *BMS1617* im *IFNG* (Tabelle 3).

2.6.4 Interleukin-4 (*IL4*)

Interleukin-4 (*IL-4*) ist ein antiinflammatorisches Typ-2-Zytokin. Es beschränkt die zellulären Abwehrmechanismen gegen Mycobakterien durch Eindämmung der Makrophagenaktivität und unterstützt die Entwicklung einer humoralen Immunantwort (Basu, 2004). *IL-4* defiziente Mäuse entwickeln gesteigerte pathologische Läsionen im Zusammenhang mit mykobakteriellen Infektionen (Sugawara et al. 2000), während sich die Behandlung mit exogenem *IL-4* hemmend auf die Entwicklung von Granulomen auswirkt. Daher wurde der Mikrosatellit *BOBT24* (Tabelle 3) zur Untersuchung ausgesucht.

2.6.5 Interleukin-18 (*IL18*)

Interleukin-18 (*IL-18*) stimuliert synergistisch mit Interleukin-12 die Produktion von IFN- γ (Sugawara et al. 1999). Ein Polymorphismus im *IL18* ist mit einem erhöhten Risiko für M. Crohn assoziiert (Tamura et al. 2002). *IL-18*-defiziente Mäuse haben nur eingeschränkte Fähigkeiten, Infektionen mit diversen Mycobakterien zu bekämpfen und zeigen verminderte *IFNG*-Level im Vergleich mit Wildtyp-Mäusen. Erst nach Behandlung mit exogenem *IL-18* waren diese Mäuse in der Lage, die granulomatösen Läsionen einzudämmen. Ein Mangel an *IL-18* kann nicht durch *IL-12* oder andere Zytokine kompensiert werden (Sugawara et al. 1999). Für die Studie wurde daher der Mikrosatellit *BB702* gewählt (Tabelle 3).

2.6.6 Interleukin-10 (*IL10*)

Khalifeh und Stabel (2004) vermuten, dass der Eintritt in das klinische Stadium der Paratuberkulose-Erkrankung durch die Expression von *TGF β* und *IL10* vermittelt wird, begleitet von einer verminderten *IFNG*-Genexpression. IL-10-defiziente Mäuse sind in der Lage, mycobakterielle Infektionen besser zu kontrollieren als Wildtyp-Mäuse (Murray und Young 1999).

Die *IL10*-Expression von *in vitro* mit MAP infizierten Rindermakrophagen ist gegenüber nicht infizierten Makrophagen verstärkt (Coussens et al. 2002; Weiss et al. 2002; Coussens 2004; Berger und Griffin 2006). Makrophagen MAP-infizierter Rinder produzieren ohne vorherige Stimulation mehr IL-10 als Makrophagen gesunder Rinder (Coussens et al. 2004c). Insgesamt gibt es starke Hinweise auf eine Beteiligung des Interleukin-10 in der Abwehr von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*, es wurde der Mikrosatellit *BB717* untersucht (Tabelle 3).

2.6.7 Tumor Necrosis Factor- α (*TNF*)

Tumor Necrosis Factor- α (TNF) ist ein Hauptaktivator der Entzündungsreaktion und initiiert eine protektive Immunantwort bei Mycobakterieninfektionen. Die Expression von TNF ist bei mit *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* subklinisch infizierten Tieren geringer als bei gesunden Vergleichstieren (Buza et al. 2003). Zur Analyse kam der Mikrosatellit *BB705* in Locus *TNF* (Tabelle 3).

2.6.8 Toll-like-Rezeptoren (*TLR*)

Toll-like-Rezeptoren sind wichtige Vermittler der angeborenen Immunität, die spezifische, hochkonservierte Strukturen von Erregergruppen, sogenannte pathogenassoziierte molekulare Muster, Pathogen associated molecular Patterns (PAMPs) erkennen (Janeway und Medzhitov 1998). Daher spielen sie eine zentrale Rolle bei der Initiierung der Immunantwort gegenüber vielen Pathogenen. Sie gehören zur Multigenfamilie von „Pattern Recognition“-Rezeptoren, Molekülen der Zelloberfläche, die Teil der TLR-Interleukin-1-Superfamilie sind (Aderem und Ulevitch 2000; Medzhitov 2001; Lien und Ingalls 2002; Akira 2004; Krutzik und Modlin 2004). Bis jetzt sind mindestens 13 dieser Toll-like-Rezeptoren bei Säugetieren bekannt, zehn davon wurden beim Rind bereits physisch kartiert (White et al. 2003a; McGuire et al. 2006).

Die Bindung an PAMPs induziert die Sekretion von Zytokinen und Chemokinen, die Effektorzellen der angeborenen Immunität (Neutrophile, Monozyten) rekrutieren. Diese sind nicht nur an der entzündlichen Reaktion beteiligt, sondern regulieren auch die nachfolgende Immunantwort (Werling und Jungi 2003; Sharma et al. 2006). Jeder Rezeptor erkennt ein spezifisches Muster von PAMPs, bei TLR4 sind dies Lipopolysaccharide gramnegativer Bakterien sowie Hitzeschockproteine, Fibrinogen, Fibronectin und Oligosaccharide des Hyaluronan (Lien und Ingalls 2002).

Lebendes *Mycobacterium tuberculosis* enthält ebenfalls Liganden, die über TLR4 Zellen aktivieren. Im Tierversuch zeigte sich die protektive Funktion des TLR4 in der Immunantwort gegen *Mycobacterium tuberculosis* (Means et al. 1999; Means et al. 2001) und gegen *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (Ferwerda et al. 2007).

TLR4 wird unter anderem im Golgi-Apparat von Zellen des Intestinalepithels exprimiert (Hornef et al. 2003). Beim Menschen konnte in einer Studie ein SNP im *TLR4*-Gen mit erhöhter Inzidenz für Morbus Crohn assoziiert werden (Franchimont et al. 2004).

Im *TLR4* des Rindes wurden drei SNPs identifiziert, die einen Einfluss auf die Laktationspersistenz sowie die somatische Zellzahl in der Milch in der kanadischen Holsteinpopulation aufweisen (Sharma et al. 2006). Diese Austauschungen liegen in der Promotorregion (P-226) sowie in Exon III (E3+1656, E3+2021) und wurden mittels Tetra-Primer Amplification-Refractory-Mutation-System-PCR (Tetra-Primer ARMS) untersucht (Ye et al. 2001). Exon I und II waren in dieser Studie nicht polymorph. Kühe mit einer flacheren Milchleistungskurve werden als langlebiger angesehen verglichen mit Tieren, die zwar dieselbe Milchmenge, jedoch einen hohen Leistungspeak mit starkem Leistungsabfall aufweisen, da sie geringeren Stoffwechselbelastungen ausgesetzt sind und daher als krankheitsresistenter gelten.

Beim Huhn liegt *TLR4* innerhalb eines QTL für Resistenz gegen *Salmonella enterica* ser. Typhimurium (Leveque et al. 2003), einem fakultativ intrazellulären Pathogen.

2.6.9 Caspase Recruitment Domain, Member 15 (*CARD15*)

Synonym: *NOD2*, Nucleotide binding Oligomerization Domain.

NODs bilden eine Proteinfamilie, die an der intrazellulären Erkennung pathogener Komponenten beteiligt ist und Mechanismen der angeborenen und erworbenen Immunität verbindet (Inohara und Nunez, 2001; Inohara und Nunez, 2003).

CARD15 ist ein zytoplasmatisches Protein, das in peripheren Blutmonozyten und intestinalen Epithelzellen und Leukozyten exprimiert wird (Berrebi et al. 2003; Ogura et al. 2003) und die Abwehr gegen mikrobielle Pathogene vermittelt. Es besteht aus einer aminoterminalen effektorbindenden Domäne (CARD), einer nukleotidbindenden Domäne (NBD) und der carboxyterminalen ligandenerkennenden Domäne (LRRs), die ein Fragment erkennt, das auch Bestandteil der Zellwand grampositiver Bakterien ist (Inohara und Nunez 2003).

CARD15 liegt innerhalb der ersten identifizierten, mit entzündlichen Darmerkrankungen assoziierten Region IBD 1 auf Chromosom 16 des Menschen (Hugot et al. 1996) und wurde 2001 als erstes Gen, dessen Varianten mit erhöhter Empfänglichkeit für Morbus Crohn assoziiert sind, nachgewiesen (Hugot et al. 2001; Ogura et al. 2001). Bei der Maus wurden durch Sequenzierung des *CARD15*-Gens vielfältige Polymorphismen in allen zwölf Exons gefunden (Ogura et al. 2003).

Drei funktionelle Genvarianten beim Menschen, die mit einer erhöhten Empfänglichkeit für Morbus Crohn assoziiert sind (R675W, G881R, 980fs) liegen in Exon III, VII und X (Hugot et al. 2001; Ogura et al. 2001). Menschen mit Mutationen im *CARD15* sind häufiger mit MAP infiziert als unter IBD leidende Patienten ohne diese Mutationen (Sechi et al. 2005).

Schmid et al. (2004) vermuten einen Zusammenhang mit einer verminderten Expression von alpha-Defensin, einem endogenen antimikrobiellen Peptid. Das Risiko, an bestimmten Formen von M. Crohn zu erkranken, ist bei heterozygoten Trägern einer der drei Mutationen 2- bis 4-fach, bei homozygoten 20- bis 40-fach erhöht (Bonen und Cho 2003).

Eine molekulargenetische Untersuchung bezüglich der Suszeptibilitätsallele (R675W, G881R, 980fs) des *CARD15*-Gens bei einem kanadischen Patienten (siehe Kapitel 2.4) ergab für zwei dieser Bereiche den homozygot empfänglichen Genotyp und eine heterozygote Substitution für G881R. Die Autoren zogen den Schluss, dass bei diesem Patienten die Infektion eines genetisch empfänglichen Wirtes mit MAP in Morbus Crohn resultierte (Behr et al. 2004).

2.6.10 Interleukin-2 (*IL2*)

Interleukin-2 ist ein wichtiger Wachstums- und Differenzierungsfaktor für aktivierte T-Zellen. Eine Ausweitung von proinflammatorischen T-Zellen innerhalb der Lymphknoten wird durch eine verstärkte Expression von IL-2 und IL-2/CD25-Signalwege stimuliert (Coussens et al. 2004c). Die Ausbreitung von Supressor-T-Zellen erfolgt vermutlich durch denselben Signalweg, bleibt jedoch anfangs hinter der Expansion der proinflammatorischen Zellen zurück. Solange das Gleichgewicht zugunsten der proinflammatorischen Zellpopulation verschoben ist, zeigen infizierte Rinder positive Ergebnisse im *In-vitro*-IFNG-Assay (Coussens 2004). Bei Menschen dominieren Th1-like Zellen, die IFNG und IL-2 exprimieren, bei der tuberculoiden oder paucibazillären Form der Lepra, während IL-4 und IL-10 exprimierende Th2-like Zellen bei der lepromatösen (multibazillären) Lepra, die mit einer ineffizienten Immunabwehr einhergeht, vorherrschen (Yamamura et al. 1991). Untersuchungen an Lymphozyten von klinisch an Paratuberkulose erkrankten Schafen zeigten, dass bei mykobakteriellen Infektionen initial ein Th1-Zytokin Sekretionsprofil besteht (Burrells et al. 1999).

Im Promotorbereich und in Introns des bovinen Interleukin-2-Gens (*IL2*) wurden 12 Nukleotidaustausche und eine Insertion identifiziert (Lühken 2007), jedoch noch nicht im Zusammenhang mit der Infektion mit MAP untersucht.

2.6.11 GATA binding protein 3 (*GATA3*)

GATA3 gehört zur Familie der GATA-Transkriptionsfaktoren (Weiss und Orkin 1995) und ist ein wichtiger Regulator der Th2-Zell-Entwicklung und -Funktion (Kim et al. 2006; Ho und Pai 2007). Alle GATA-Proteine enthalten zwei hochkonservierte Zinkfinger, die an DNA mit der Konsensussequenz „WGATAR“ binden (zusammengefasst von Ho und Pai 2007).

Die Expression von GATA3 ist in peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) subklinisch mit MAP infizierter Rinder erhöht, verglichen mit PBMC von nicht infizierten Kontrolltieren (Coussens et al. 2005).

Tabelle 3: Kandidatengene und die zur Analyse ausgewählten Mikrosatellitenmarker, ihre genetische und physische Position und deren Referenzen.

Locus/ Gen	Marker	BTA	relative Position Marker (cM)	Referenz
<i>IL12A</i>	<i>BB704</i>	1 q34–q36	100,083	Band et al. 2000; Sonstegard et al. 2000
<i>IL12B</i>	<i>BB719</i>	7 q23–q24	83,466	Band et al. 2000; Sonstegard et al. 2000
<i>NRAMP1</i>	<i>BMC9006</i>	2 q43–q44	95,570	Feng et al. 1996; Sonstegard et al. 1997
<i>IFNG</i>	<i>BMS1617</i>	5 q23	56,303	Stone et al. 1995
<i>IL4</i>	<i>BOBT24</i>	7 q15–q21	32,045	Buitkamp et al. 1995; Buitkamp et al. 1996
<i>IL18</i>	<i>BB702</i>	15 q13–q14	19,526	Sonstegard et al. 2000
<i>IL10</i>	<i>BB717</i>	16 q12	2,685	Sonstegard et al. 2000
<i>TNF</i>	<i>BB705</i>	23 q14d–q15p	43,103	Sonstegard et al. 2000
*	<i>RM106</i>	20	3–5,500	Kappes et al. 1997; Gonda et al. 2006b
*	<i>BM1225</i>	20	8,238	Kappes et al. 1997; Gonda et al. 2006b

BTA, chromosomale Lokalisation auf dem bovinen Chromosom; *, Mikrosatelliten innerhalb eines QTL

2.7 Mikrosatellitenanalyse

Mikrosatelliten sind eine Form der VNTRs (variable nucleotide tandem repeats), kurze repetitive Sequenzen des Genoms, die vor allem in nicht kodierenden Bereichen des Genoms auftreten und kodominant vererbt werden (Litt und Luty 1989). Mikrosatelliten zeichnen sich durch eine im Vergleich mit Punktmutationen kodierender Gene hohe Mutationsrate von 10^{-2} bis 10^{-6} /Locus/Generation (Li et al. 2002) und einen hohen Polymorphiegrad aus. Ein Großteil der Mikrosatelliten gilt als selektionsneutral und zufällig über das euchromatische Genom verteilt (Tachida und Izuka 1992; Schlötterer 2000). Li et al. (2002) postulieren eine nicht zufällige Verteilung der Mikrosatelliten und deren Beteiligung an der Regulierung der Genaktivität, der DNA-Replikation und des Zellzyklus sowie an der chromosomalen Organisation. Sind Mikrosatelliten mit Kandidatengenen gekoppelt, können sie für Untersuchungen der Kosegregation mit dem Zielmerkmal verwendet werden (Rothuizen et al. 1999). Variationen in der Repeatanzahl von Mikrosatelliten der UTRs und Introns können signifikante Effekte auf die Genexpression haben und zu phänotypischen Modifikationen

führen (Li et al. 2004). Dinukleotid-Sequenzen sind aufgrund ihrer hohen Affinität zu Rekombinationsenzymen bevorzugte Orte der Rekombination (Biet et al. 1999).

Die beiden hauptsächlich zugrunde liegenden Mutationsmechanismen von Mikrosatelliten sind DNA-Slippage (Levinson und Gutman 1987) während der Replikationsphase (Tachida und Izuka 1992) sowie Rekombination zwischen DNA-Strängen bei ungleichem Crossing-over oder Genkonversion (Harding et al. 1992). Durch ihren hohen Polymorphiegrad, die kodominante Vererbung und die gleichmäßige Verteilung über das Genom sind Mikrosatelliten gut geeignet für molekulargenetische Untersuchungen an landwirtschaftlichen Nutztieren. Weitere Vorteile der Mikrosatellitenanalyse liegen in der effektiven Typisierbarkeit durch Multiplex- und Multiloading-Verfahren (Peter 2005).

Beispiele für den Einsatz von Mikrosatelliten sind die Identifizierung von quantitative trait loci (QTL) (Kühn et al. 2003) sowie die Erstellung genetischer Karten (Kappes et al. 1997; Ihara et al. 2004). Weitere erfolgreiche Anwendungsgebiete sind die Durchführung von Abstammungskontrollen (Glowatzki-Mullis et al. 1995), Diversitätsstudien (Ibeagha-Awemu und Erhardt 2005; Freeman et al. 2006) und Studien zur Populationsgenetik (Cymbron et al. 2005).

Ferner seien die Bedeutung der Trinukleotidblock-Expansionserkrankungen, beispielsweise Chorea Huntington (MacMillan et al. 1993), oder Fragile X Syndrom (White et al. 1999) erwähnt, die mit einer unphysiologisch erhöhten Anzahl an Trinukleotid-Repeats einhergehen. Darüber hinaus wird in der Literatur die Assoziation eines bestimmten (CA)_n-Repeats eines Mikrosatelliten oberhalb des humanen Aldose Reduktase-Gens mit diabetischer Retinopathie (Fujisawa et al. 1999; Becker 2002) beschrieben. Beim Rind konnte die Assoziation eines Dinukleotid-Repeats in der 3'UTR des *NRAMP1*-Gens mit der Resistenz gegen *Brucella abortus* nachgewiesen werden (Adams und Templeton 1998; Barthel et al. 2000).

3 Material und Methoden

3.1 Tiere und Probenmaterial

3.1.1 Vergleichsgruppe

Zur Ermittlung von rasseabhängigen Allel- und Genotypfrequenzen der Mikrosatellitenmarker wurden als Vergleichsgruppe Proben der Rassen Dt. Holstein (n = 84), Dt. Angus (n = 116), Dt. Fleckvieh (n = 99) und Jersey (n = 41) untersucht. Die Rassen Dt. Holstein, Dt. Angus und Dt. Fleckvieh wurden aufgrund ihrer in Deutschland vorherrschenden Bedeutung ausgewählt. Die Vergleichsgruppe ist unselektiert, nicht verwandt und stellt einen Populationsquerschnitt in Deutschland dar. Blutproben dieser Tiere lagen in der Probenbank des Instituts für Tierzucht und Haustiergenetik vor bzw. wurden auf der Lehr- und Forschungsstation Oberer Hardthof und dem Lehr- und Versuchsbetrieb Rudlos der Universität Gießen gesammelt.

3.1.2 Proben verschiedener Rinderrassen

Zur Charakterisierung von Kandidatengen und zur Identifikation von Polymorphismen wurden in der Probenbank des Instituts für Tierzucht und Haustiergenetik vorliegende DNA-Proben von Rindern der Rassen Gelbvieh, Pinzgauer, Jersey, Angler, Braunvieh, Brown Swiss, Dt. Fleckvieh, Dt. Angus, Dt. Schwarzbuntes Niederungsrind, Limousin, Anatolisches Schwarzvieh, Ostanatolisches Rotvieh, Brahman und N'Dama verwendet (siehe Anhang Abbildung A).

3.1.3 Proben von Tieren mit MAP-Status

Die Proben von Tieren mit bekanntem MAP-Status stammten aus Betrieben, die am Thüringer Sanierungsprogramm für von Paratuberkulose betroffene landwirtschaftliche Betriebe freiwillig teilnehmen. Das Programm besteht seit dem Jahr 2000. Alle Rinder über 18 Monate werden halbjährlich serologisch mittels ELISA-Tests (Svanovir® ParaTB Ab ELISA Kit; IDEXX HerdChek™ M. pt. Ab ELISA-Test Kit) vom Tiergesundheitsdienst Thüringen e. V. (TGD) auf ihren Antikörperstatus gegen den Erreger *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* untersucht. Die Ergebnisse wurden als kontinuierliche Variable (optische Dichte, OD) gemessen und anschließend durch den Vergleich mit einem vom Hersteller definierten Grenzwert (sogenannter „Cut-off-Wert“, IDEXX: S/P-Wert 0,0–0,09 negativ, 0,10–0,24 verdächtig, > 0,25 positiv; Svanovir OD-Wert ≤ 31 % negativ, 32–52 % verdächtig, ≥ 53 % positiv) trichotomisiert, sodass die Einteilung aller beprobten Tiere in testpositive (MAP-positiv), testnegative (MAP-negativ) und verdächtige Tiere (MAP-verdächtig) vorlag. Serologisch negative und verdächtige Tiere werden einem weiteren turnusgemäßen serologischen Screening unterzogen, während vom Kot der positiven Tiere ebenso zyklisch Kulturen zum Erregernachweis durch Anzucht angelegt werden.

Im Rahmen dieses Programms wurden für diese Arbeit 6165 im Frühjahr 2005 gewonnene Vollblutproben (EDTA-Vollblut) von Rindern der Rassen Dt. Holstein (Schwarzbunt; Rotbunt), Dt. Fleckvieh, Dt. Angus, Limousin und Jersey sowie von Kreuzungstieren zur Verfügung gestellt.

Für 4524 dieser Tiere der Rasse Dt. Holstein stellten die Vereinigten Informationssysteme Tierhaltung w. V. (VIT) in Verden Pedigreedaten (Lebensohrmarkennummer des Tieres, Abstammung [Vater/Mutter], Rasse, Geburtsdatum und Betriebszugehörigkeit) und Leistungsdaten (Daten zur letzten Kalbung, Laktationsanzahl, Laktations-Melktage, Laktationsmilchmenge, -fettmenge und -eiweißmenge) zur Verfügung. Abbildung 1 zeigt die Infrastruktur und den Informationsfluss zwischen dem Institut für Tierzucht, dem Tiergesundheitsdienst sowie dem VIT in Verden. Die Pedigree- und Leistungsdaten der beprobten Tiere wurden neben den Typisierungsergebnissen in einer Datenbank zusammengefasst (Datensatz 1).

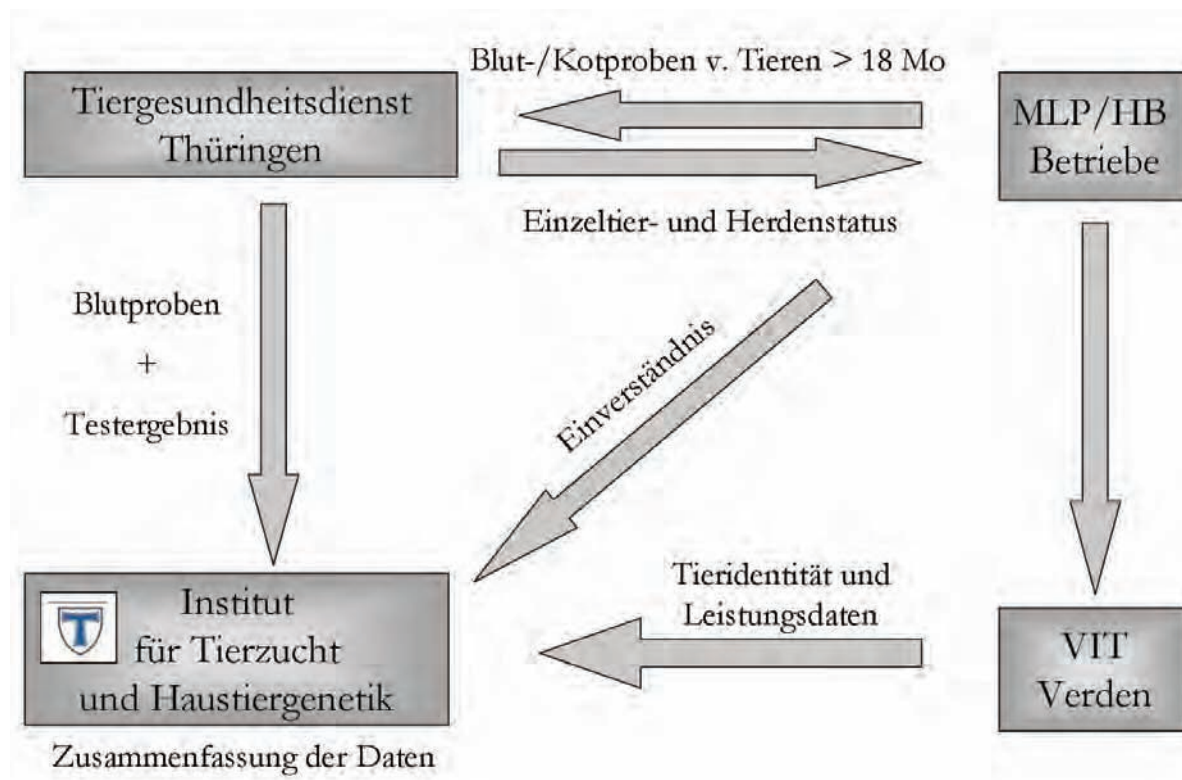


Abbildung 1: Infrastruktur und Vernetzung zur Durchführung der Studie.

In den unterschiedlichen Betrieben (A bis L) lag die Anzahl der auf Paratuberkulose untersuchten Tiere im Frühjahr 2005 zwischen 192 und 655 Tieren, der Anteil serologisch MAP-positiver Tiere lag zwischen 3,2 und 36,9 % (Tabelle 4). Von 2084 Tieren aus sechs Betrieben lag zusätzlich zum MAP-Status (positiv, negativ, verdächtig) der gemessene OD-Wert (optische Dichte, ODV) aus dem LAM-ELISA (Svanovir® ParaTB Ab ELISA Kit) vor (Datensatz 2, Tabelle 5).

MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 4: Anteil (%) serologisch MAP-negativer (n = 3113), MAP-positiver (n = 637) und MAP-verdächtiger (n = 774) Tiere der Rasse Dt. Holstein, aufgeschlüsselt nach Betrieben sowie gesamte Tierzahl je Betrieb (n=).

Betrieb-Nr.	Tierzahl (n=)	MAP-Status		
		negativ (%)	positiv (%)	verdächtig (%)
A	528	41,48	36,93	21,59
B	311	78,14	7,40	14,47
C	655	89,16	3,21	7,63
D	486	61,93	15,23	22,84
E	139	92,81	5,04	2,16
F	490	67,55	14,49	17,96
G	641	62,71	13,10	24,18
H	323	75,23	13,93	10,84
I	225	76,89	10,22	12,89
J	234	56,84	28,63	14,53
K	192	75,52	5,21	18,27
L	300	70,00	5,67	24,33

Tabelle 5: Beschreibung des zur Auswertung verwendeten Datenmaterials mit Tierzahl, Anzahl der eingesetzten Bullen sowie der Zahl der Töchter pro Vater.

	Datensatz 1		Datensatz 2	
	Tiere mit MAP-Status		Tiere mit MAP-Status und ODV	
Tierzahl	4524		2084	
Anzahl der Betriebe	12		6	
Anzahl der Väter	564		297	
Anzahl der Töchter/Vater	8,0		7,0	
Spanne	1–161		1–117	
MAP-Status in %	positiv	14,1	14,1	
	verdächtig	17,1	22,7	
	negativ	68,8	63,2	

Datensatz 1, Tiere mit MAP-Status positiv, negativ, verdächtig (Anteile in Prozent); Datensatz 2, Tiere mit gemessenem OD-Wert aus dem ELISA

Um das Niveau der untersuchten Betriebe im Bezug auf die Milchleistung darzustellen, sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Milchleistungsdaten ohne Berücksichtigung des Paratuberkulosestatus der einzelnen Kühe aufgeführt (Tabelle 6).

Tabelle 6: Rohmittelwerte (\bar{x}) und Standardabweichungen (Std) der Milchleistungsdaten der ersten Laktation von Kühen der Rasse Dt. Holstein in MAP-positiven Betrieben.

	Gesamt (n=4524)	
	\bar{x}	Std
Milchmenge (kg)	8397,8	1780,0
Milchfett (kg)	337,5	69,0
Milchprotein (kg)	283,0	54,9

Gesamt, alle Tiere mit Pedigree- und Laktationsdaten, nur Laktationen über 250 Tagen wurden berücksichtigt

3.1.3.1 Auswahl der Proben für Assoziationsanalysen

Für die Assoziationsstudien wurde aus der Gesamtheit der serologisch positiven Tiere (n = 637) die Fallgruppe (n = 594) ausgewählt. Hierbei wurden nur Rinder der Rasse Dt. Holstein mit zusätzlichen Pedigreeinformationen berücksichtigt, die im Frühjahr 2005 oder davor serologisch MAP-positiv getestet wurden und zum Testzeitpunkt noch im Betrieb vorhanden waren.

Dreiundvierzig der serologisch positiven Kühe hatten keine väterlichen Halbgeschwister und wurden daher nicht in der Fall-Kontroll-Studie einbezogen.

Als Kontrollgruppe (n = 585) wurde anhand gleicher väterlicher Abstammung und unter Berücksichtigung des Alters der Rinder möglichst zu jedem Positiven ein Tier aus dem selben Betrieb, jedoch mit negativem serologischen MAP-Status, gewählt. War kein Kontrolltier im gleichen Alter (± 3 Monate) wie das MAP-positive Tier vorhanden, wurde ein älteres, serologisch negatives Halbgeschwister aus demselben Betrieb, bei Bedarf aus dem gesamten Tiermaterial ausgewählt. Für insgesamt 116 der serologisch positiven Tiere waren keine negativ getesteten Halbgeschwister im gleichen Betrieb vorhanden.

Die Differenz von neun Tieren zwischen der Fall- und der Kontrollgruppe erklärt sich dadurch, dass in wenigen Fällen mehrere väterliche Halbgeschwister positiv getestet worden waren und nicht die gleiche Anzahl an negativen väterlichen Halbgeschwistern zur Verfügung stand.

Das Alter der Tiere lag zwischen zwei und elf Jahren, der prozentual höchste Anteil davon (29,6 %) entfiel auf die Altersgruppe von drei Jahren. Die Zahl der aus dem Gesamtkollektiv für die Assoziationsstudie ausgewählten Tiere, aufgeschlüsselt nach Geburtsjahr und serologischem MAP-Status, zeigt Tabelle 7.

Tabelle 7: Altersstruktur der Fall- und Kontrollgruppe (MAP-pos., n = 594; MAP-neg., n = 585).

Geburtsjahr	MAP-pos. (n)	MAP-neg. (n)	gesamt
1994	0	4	4
1995	2	8	10
1996	6	14	20
1997	11	16	27
1998	34	33	67
1999	51	51	102
2000	129	93	222
2001	185	156	341
2002	157	192	349
2003	19	18	37

MAP-neg, serologisch negativ getestete Tiere; MAP-pos, serologisch positiv getestete Tiere

3.2 Verbrauchsmaterialien

3.2.1 Chemikalien und Puffer

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

Acrylamid/Bisacrylamid 29:1 (30 % v/w)	<i>Bio-Rad Laboratories GmbH, München</i>
Agar	<i>Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe</i>
Agarose low EEO	<i>Applichem GmbH, Darmstadt</i>
Ammoniumchlorid	<i>Merck AG, Darmstadt</i>
Ammoniumpersulfat (APS)	<i>Merck AG, Darmstadt</i>
Ampicillin	<i>Applichem GmbH, Darmstadt</i>
Bacto Tryptone	<i>Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe</i>
Bacto Yeast Extract	<i>Applichem GmbH, Darmstadt</i>
5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal)	<i>Applichem GmbH, Darmstadt</i>
Bromphenolblau	<i>Merck AG, Darmstadt</i>
Dimethylsulfoxid (DMSO)	<i>Merck AG, Darmstadt</i>
dNTP Mix 100mM	<i>ABgene Advanced Biotechnologies Ltd., Hamburg</i>
5x Enhancer Solution P	<i>Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen</i>
Ethanol absolut	<i>Merck AG, Darmstadt</i>
Ethidiumbromid	<i>Serva Feinbiochemica GmbH & Co, Heidelberg</i>
Ethylendiamintetraessigsäure-Na ₂ -Salz	<i>Merck AG, Darmstadt</i>

(EDTA)	
Formamid	<i>Applichem GmbH, Darmstadt</i>
Glycerol	<i>Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe</i>
Harnstoff	<i>Bio Rad, München</i>
Isopropanol	<i>Merck AG, Darmstadt</i>
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	<i>Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe</i>
Natriumacetat	<i>Merck AG, Darmstadt</i>
Natriumchlorid	<i>Merck AG, Darmstadt</i>
Natriumhydroxid	<i>Merck AG, Darmstadt</i>
NuSieve®GTG®Agarose	<i>Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf</i>
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	<i>Serva Feinbiochemica GmbH & Co, Heidelberg</i>
10x <i>Taq</i> Reaktionspuffer advanced 5U/ μ l	<i>Eppendorf AG, Hamburg</i>
10x TBE (0,89 mM Tris; 0,02 mM EDTA- $\text{Na}_2\text{H}_2\text{O}$; 0,89 mM Borsäure)	<i>Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe</i>
N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (<i>TEMED</i>)	<i>Amresco, Ohio, USA</i>
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	<i>Merck AG, Darmstadt</i>
Trypton	<i>Applichem GmbH, Darmstadt</i>
HPLC-Wasser	<i>J.T. Baker, Deventer, Niederlande</i>
Wasser für die Molekularbiologie	<i>Applichem GmbH, Darmstadt</i>
Xylencyanol FF	<i>Merck AG, Darmstadt</i>

3.2.2 Reaktionskits

ABI PRISM® BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	<i>Applied Biosystems Applera Dtl. GmbH, Darmstadt</i>
ABsolute™QPCR Mix	<i>ABgene Advanced Biotechnologies Ltd., Hamburg</i>
Invisorb® Blood Mini HTS 96-Kit/C-SHEEP	<i>Invitek GmbH, Berlin</i>
MSB Spin PCRapace-Kit	<i>Invitek GmbH, Berlin</i>
ProMega pGEM®-T Easy Vector System II	<i>Promega GmbH, Mannheim</i>
QIAGEN Multiplex PCR Kit	<i>Qiagen, Hilden</i>
Wizard®SV Gel and PCR clean up system	<i>Promega GmbH, Mannheim</i>

3.2.3 Enzyme

Proteinase K (10 mg/ml Stock)	<i>Biometra, biomedizinische Analytik, Göttingen</i>
<i>Taq</i> -(<i>Thermus aquaticus</i>) DNA-Polymerase (5 U/ μ l)	<i>Eppendorf AG, Hamburg</i>
Restriktionsendonukleasen:	
<i>Taq</i> I, <i>Taa</i> I, <i>Bsu</i> RI (<i>Hae</i> III), <i>Pst</i> I	<i>Fermentas GmbH, St. Leon-Rot</i>
<i>Nla</i> III, <i>Hpy</i> 188III	<i>New England Biolabs, Frankfurt am Main</i>

3.2.4 Oligonukleotide

unmarkierte Oligonukleotide	<i>Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe; biomers.net GmbH, Ulm; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München</i>
VIC- bzw. NED- markierte Oligonukleotide	<i>Applied Biosystems Applera Dtl. GmbH, Darmstadt</i>
6-FAM- bzw. Cy5-markierte Oligonukleotide	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München</i>

3.2.5 Längen- und Konzentrationsstandards

FastRuler™ DNA Ladder Low Range, ready-to-use	<i>MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot</i>
FastRuler™ DNA Ladder, High Range, ready-to-use	<i>MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot</i>
GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus	<i>MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot</i>
Größenstandard ROX 500	<i>Applied Biosystems Applera Dtl. GmbH, Darmstadt</i>
pUC Mix Marker 8 (67–1116 bp), pUC Mix Marker 19 (26–501 bp)	<i>MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot</i>

3.2.6 Plastikwaren, Glaswaren, Handschuhe, Filter und Tücher

Borosilikat-Glasplatten (36 cm Länge)	<i>Applied Biosystems Applera Dtl. GmbH, Darmstadt</i>
EDTA Monovetten (9 ml)	<i>Sarstedt AG & Co., Nümbrecht</i>
Filterspitzen	<i>Biozym Scientific, Hess. Oldendorf; Molecular BioProducts, Inc., San Diego, Kalifornien, USA</i>
Haifischzahnkamm 36-well/48-well (mylar, 0,2 mm stark)	<i>Applied Biosystems Applera Dtl. GmbH, Darmstadt</i>
Handschuhe	<i>Safeskin GmbH, Neufahrn; Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe</i>
Kimwipes®	<i>Kimberly Clark, Roswell, USA</i>
Membranfilter (Porengröße 0,2 µm)	<i>Schleicher & Schuell, Dassel</i>
mylare Spacer (0,2 mm stark)	<i>Applied Biosystems Applera Dtl. GmbH, Darmstadt</i>
Pasteurpipetten	<i>Hilgenberg, Malsfeld</i>
PCR-Cups Soft Tubes® mit Deckel Soft Strips®	<i>Biozym, Hess. Oldendorf</i>
PCR-Platten 96-Well ohne bzw. mit Rahmen und Deckel	<i>G.Kisker GbR Produkte f. d. Biotechnologie, Steinfurt</i>
Petrischalen	<i>Sarstedt AG & Co., Nümbrecht</i>
Pipettenspitzen	<i>Sarstedt AG & Co., Nümbrecht; Biozym, Hess. Oldendorf; Gilson Medical Electronics, Villiers-le-Bel, Frankreich</i>
Reagenzröhrchen 13 ml	<i>Sarstedt AG & Co., Nümbrecht</i>

Reagiergefäße 1,5 ml und 2 ml	<i>Sarstedt AG & Co., Nümbrecht</i>
Reaktionsgefäße für PCR, 0,2 ml	<i>Biostep GmbH, Jahnsdorf</i>
Thermowellplatten, 96-well	<i>Corning Inc., Corning, New York, USA</i>

3.3 Geräte

ABI PRISM [®] 377 DNA Sequencer	<i>Applied Biosystems Applera Dtl. GmbH, Darmstadt</i>
A.L.F.express DNA Sequencer	<i>Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg</i>
Analysenwaage AC211S	<i>Sartorius AG, Göttingen</i>
Autoklav	<i>Webeco, Bad Schwartau</i>
Bidestanlage Bi Dest 2302	<i>Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel</i>
Brutschrank	<i>Heraeus Instruments GmbH, Hanau</i>
Eismaschine Scotsman, AF 10	<i>Kälte Mack, Maintal</i>
Elektrophoreseeinheit CBS Kammer Modell SGU-030	<i>C.B.S.Scientific Company, Del Mar, Kalifornien, USA</i>
Elektrophoreseeinheit IBI Kammer Modell HRH	<i>International Biotechnologies Inc., New Haven, Connecticut, USA</i>
Gradientencycler iCycler	<i>Bio-Rad Laboratories GmbH, München</i>
Heizblock, Techne Dri-Block, DB 3	<i>Thermo Dux, Wertheim/Main</i>
Heizplatte mit Magnetrührer MR2002	<i>Heidolph, Kehlheim</i>
Netzgeräte für Elektrophoreseeinheit Power Pac 1000, 3000	<i>Bio-Rad Laboratories GmbH, München</i>
Netzgeräte E321, E443, E425	<i>Consort, Turnhout, Belgien</i>
pH-Meter pH 537	<i>Wissenschaftlich technische Werkstätten, Weilheim</i>
Pipetten:	
Distriman	<i>Gilson S.A.S, Villiers le belle, Frankreich</i>
Multipette Pipetman 8 x 200	<i>Gilson S.A.S, Villiers le belle, Frankreich</i>
Pipette Pipetman [®] P2, P10, P20, P200, P1000	<i>Gilson S.A.S, Villiers le belle, Frankreich</i>
Pipette Research Pro 8 x 10	<i>Eppendorf AG, Hamburg</i>
Transferpette [®] 8 (2,5 bis 25 µl)	<i>Brandt GmbH & Co. KG, Wertheim</i>
Präzisionswaage EW Serie	<i>Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe</i>
Spektralphotometer GeneQuant II	<i>Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg</i>
Spektralphotometermikrozelle (10 mm Pfadlänge)	<i>Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg</i>
Sterilwerkbank Kojair	<i>Cleanair Reinraumtechnik GmbH, Rielasingen Worblingen</i>
Thermocycler PE 9600	<i>Applied Biosystems Applera Dtl. GmbH, Darmstadt</i>
Wasserbad Julabo 22A	<i>Julabo Labortechnik, Seelbach</i>

Wasserbad 3047	<i>Köttermann, UtzeHänsingen</i>
Zentrifugen:	
Centrifuge 5810 R	<i>Eppendorf AG, Hamburg</i>
Minizentrifuge Combispin FVL-2400 mit Vortex	<i>Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen</i>
Zentrifuge Beckmann 2-21M/E Centrifuge	<i>Beckmann Instruments, München</i>
Zentrifuge Biofuge 13R	<i>Heraeus Instruments GmbH, Hanau</i>

3.4 Dokumentation

Photodokumentation <i>BioDocAnalyze</i>	<i>Biometra, Göttingen</i>
Sony Digital Graphic Printer UP-D895	<i>Biometra, Göttingen</i>
Sony Photopapier Type V UPP-110HG	<i>MS Laborgeräte Schröder, Wiesloch</i>
Transilluminator, TM 20	<i>UVP, San Gabriel, USA</i>

3.5 Computerprogramme

3.5.1 Molekulargenetik

AlleleLocator V 1.03	<i>Amersham Biosciences, Freiburg</i>
BioDocAnalyze	<i>Biometra, Göttingen</i>
BLAST	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
Chromas Pro 1.3	<i>Technelysium Pty Ltd, Tewantin</i>
GeneDoc Multiple Sequence Alignment Editor & Shading Utility V 2.6.002	www.psc.edu/biomed/genedoc
Genotyper V 3.7 NT, GeneScan Analysis Software	<i>Applied Biosystems Applera Dtl. GmbH, Darmstadt</i>
Mutation Surveyor V 2.60	<i>SoftGenetics, LLC., State College, USA</i>
NEBcutter V 2.0	http://www.neb-online.de/techInfo_d_fs.html
Primer 3	http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi
SIFT	http://blocks.fhcrc.org/~pauline/SIFT.html
TFSEARCH Searching Transcription Factor Binding Sites (V 1.3)	http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html

3.5.2 Statistische Analysen

ASReml	<i>VSN International Ltd, Hemel Hempstead, Großbritannien</i>
POPGENE Version 1.32	http://www.ualberta.ca/~fyeh/index.htm
SAS System 8.1	<i>SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA</i>

3.6 Labors

Gentechnische Arbeiten nach § 7 des Gentechnikgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 16.12.1993, zuletzt geändert durch Artikel 1 des Gesetzes vom 01.04.2008, wurden in Labors der Sicherheitsstufe I des Instituts für Tierzucht und Haustiergenetik der Justus-Liebig-

Universität, Ludwigstraße 21B, 35390 Gießen, durchgeführt (Reg.-Bescheide Nr. AI3/19/1/1374/90 und Nr. AI3/25/1/1492/90).

3.7 Verwendete Referenzsequenzen

Sequenzen, die in der Datenbank des National Center for Biotechnology Information, NCBI, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) öffentlich zugänglich sind, wurden zur Ableitung von PCR-Primern sowie für *In-silico*-Analysen genutzt. In Tabelle 8 sind die verwendeten GenBank-Sequenzen dargestellt.

Tabelle 8: Referenzsequenzen der untersuchten Genregionen aus der GenBank.

Gen	Genbereich	GenBank-Eintrag
<i>NRAMP1</i>	<i>Bos taurus</i> mRNA	U12862
	<i>Bos taurus</i> Intron 5	AY398762
	<i>Bos taurus</i> chromosome 2, reference assembly, whole genome shotgun sequence	NC_007300
<i>TLR4</i>	<i>Bos taurus</i> mRNA	AY634630
	<i>Bos taurus</i> ExonIII, complete cds	AY297043
	<i>Homo sapiens</i> mRNA	U88880
	<i>Homo sapiens</i> ExonIV	AF172171
	<i>Homo sapiens</i> mRNA	U93091
<i>CARD15</i>	<i>Bos taurus</i> , Exon I–XII	AY518738–AY518748
	<i>Bos taurus</i> , Protein	AAS09826
	<i>Bos indicus</i> , Protein	AAS09827
	<i>Bison bison</i> , Protein	AAS09828
	<i>Homo sapiens</i> , Protein	CAC42117
	<i>Pan troglodytes</i> , Protein	AAS89991
	<i>Saguinus oedipus</i> , Protein	AAS89989
	<i>Mus musculus</i> , Protein	AAM76073
	<i>Rattus norvegicus</i> , Protein	XP_226330
	<i>Canis familiaris</i> , Protein	XP_544412
<i>GATA3</i>	<i>Bos taurus</i> mRNA	XM_873370
	<i>Bos taurus</i> mRNA	NM_001076804
	<i>Homo sapiens</i> , genomisch	AY497006

3.8 Molekularbiologische Methoden

3.8.1 Isolation von DNA aus Vollblut und Gewebe

Aus den Vollblutproben wurde mit dem kommerziellen DNA-Extraktionskit „Invisorb Blood Mini HTS 96-Kit/C-Sheep“ genomische DNA nach Vorgaben des Herstellers gewonnen.

3.8.2 Isolation von Kern-DNA aus Vollblut

Zur Gewinnung der Leukozyten aus Vollblut wurden die ungekühlten, mit etwa 9 ml Vollblut gefüllten EDTA-Monovetten 20 min bei 2500 rpm zentrifugiert. Der „Buffy coat“, sichtbar als weiße Schicht zwischen Plasma und Erythrozyten, wurde mit einer Pipette in 1,5 ml Reagiergefäße überführt und bis zur weiteren Verwendung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Nachfolgend wurde aus diesen Proben genomische DNA entsprechend der modifizierten Hoch-Salz-Methode gewonnen (Montgomery und Sise 1990). Die Lyse der Erythrozyten wurde durch Zugabe von 2,5 ml Lyselösung erreicht, im Anschluss erfolgte die Pelletierung und Resuspendierung der Leukozyten in 10 ml Waschlösung. Auf die Zugabe von EDTA vor Proteinase-K-Inkubation wurde verzichtet. Weitere Modifikationen des Protokolls betrafen die Zentrifugierzeit und -geschwindigkeit, die statt 2000 rpm 4200 rpm, bzw. statt 1000 rpm für 3 min, 3000 rpm für 5 min betrug. Im Anschluss an die Aussalzung der Proteine wurde der Überstand in 250 ml-Erlenmeyerkolben mit absolutem Ethanol (30 ml) überführt und die nun sichtbare DNA in ein 1,5 ml Reagiergefäß gegeben und zweimal mit 1000 μl Ethanol (70 % v/v) gewaschen. Nach der Trocknung der DNA wurde diese in 1x TE-Puffer (abhängig vom optisch geschätzten DNA-Volumen) gelöst.

Verwendete Lösungen:

Lyselösung:

150 mM NH_4Cl , 10 mM KCl, 0,1 mM Na-EDTA, pH 5,0

Waschlösung:

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

TE-Puffer:

1 mM Tris-HCl, pH 7,4, 0,1 mM EDTA, pH 8,0

3.8.3 Ermittlung der Qualität bzw. Quantität von DNA

Die Erfassung der DNA-Konzentration und -Qualität von genomischer DNA erfolgte stichprobenartig im Spektralphotometer (Sambrook et al. 1989).

Zur visuellen Schätzung der Konzentration und Qualität von PCR-Amplifikaten wurden je 5 μl PCR-Produkt mit 2 μl Ladebuffer (0,25 % [v/v] Bromphenolblau, 0,25 % [v/v] Xylencyanol FF, 30 % [v/v] Glycerol, 69,5 % [v/v] Wasser) versetzt und auf ein Agarosegel geladen, dessen Konzentration (w/v) entsprechend der Größe der zu erwartenden Fragmente

ausgewählt wurde (Prinzenberg 1998). Anschließend wurden die Produkte elektrophoretisch aufgetrennt und die Agarosegele mit Ethidiumbromid gefärbt (Sambrook et al. 1989).

Zur Größenschätzung der amplifizierten Kandidatengenregionen und Mikrosatelliten sowie zur Auswertung der Restriktionsverdau wurden die Marker FastRuler™ DNA Ladder Low Range bzw. High Range, ready-to-use sowie pUC Mix Marker 8 bzw. pUC Mix Marker 19 als Größenmarker eingesetzt. Für die Konzentrationsschätzung von aufgereinigten Amplifikationsprodukten aus der Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Sequenzierung wurden 5 µl des Markers GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus eingesetzt.

3.8.4 Sequenzanalyse spezifischer Regionen in Kandidatengen

3.8.4.1 Primerauswahl

Die Auswahl der Oligonukleotide (Tabelle 9) für die PCR-Amplifikation von Kandidatengenregionen erfolgte mithilfe des Programms „Primer 3“ (Rozen und Skaletsky 2000).

Natural Resistance associated Macrophage Protein (NRAMP1)

Grundlage der Primerauswahl für das Kandidatengen *NRAMP1* waren die von Feng et al. (1996) und Coussens (2004a) ermittelten Sequenzen. Zielregionen waren Teile der Promotorregion sowie der die Introns 4 bis 6 umspannende Bereich.

Toll-like Receptor 4 (TLR4)

Die Primer zur Amplifizierung eines 990 bp großen Bereichs des Exons III des *TLR4* basierten auf der Sequenz von White und Mitarbeitern (2003b) und wurden nach Vergleichen mit der humanen Sequenz ausgewählt.

Caspase Recruitment Domain Family, Member 15 (CARD15)

Für die PCR-Amplifikation der Exons II, IV, VIII und XI sowie von Teilen der flankierenden Introns des bovinen *CARD15* wurde nach Vergleichen mit den homologen humanen Sequenzen Primer aus den von Taylor et al. (2006) publizierten GenBank-Sequenzen abgeleitet.

Gata-binding protein 3 (GATA3)

Grundlage für die Primerauswahl waren die genomischen Sequenzen des Menschen sowie des Rindes (GenBank-Sequenzen XM_873370 und AY497006).

Tabelle 9: Primer zur Sequenzanalyse von spezifischen Regionen der Kandidatengene *NRAMP1*, *TLR4*, *CARD15* und *GATA3* sowie deren Sequenzen, optimale Annealingtemperatur (AT) und Produktgrößen (bp) der Fragmente.

Name	Primersequenz (5' → 3')	AT (°C)	bp
NRAMP1-1065_F	TGGCACCATGAAGCCAAC	60,0	833
NRAMP1-In6_R	GCTCTTCTCCCAGTTCACCA		
NRAMP1-Prom_F	AACAAGGTCAGAGACAAGACGTG	64,0	958
NRAMP1-Prom_R	TCCCAGATCTACTTCTCTCTCCAC		
TLR4-ExonIII_F	TGAAAGAGCTTAATGTGGCTCA	60,0	990
TLR4-ExonIII_R	AGTTGCCTGCCATTTTCAAG		
CARD15-ExonII_F	AGCTTGCCTTGGTGTCTGAG	59,0	695
CARD15-ExonII_R	GAGGACTATGACCCACATCTCC		
CARD15-ExonIV_F	CCCCTTATCAGGTCCCATT	57,5	794
CARD15-ExonIV_R	CCGCTTCCTCAGGTACAGTT		
CARD15-ExonVIII 748_F	CCAGAGCTCATTAAGTGTTCACC	58,0	748
CARD15-ExonVIII 748_R	TTACCTGAGCCACCTCAAGC		
CARD15-ExonXI 434_F	TTCATTGGGAATCTCAGACAG	60,0	434
CARD15-ExonXI 434_R	CAATTTAAAAACGAGACAGTTGG		
GATA3-BT Ex5_F	GACCCCTGACTATGAAGAAGGA	60,0	474
GATA3-BT/OA 3'UTR_R	CGGGGAGTGAGAACACAGAC		

3.8.4.2 PCR-Amplifikation von DNA-Fragmenten für Sequenzanalysen

Unter Verwendung eines Gradientencyclers wurde jedes ausgewählte Primerpaar in einem Standardansatz (Tabelle 10) mit einem Gesamtvolumen von 45 µl getestet. Für die Amplifikation von *CARD15* Exon VIII, *NRAMP1* und *GATA3* waren zusätzliche Komponenten in der PCR-Reaktion erforderlich. Im Einzelnen war dies der Zusatz von 25 mM Mg Solution bis zu einer Endkonzentration von 3,5 mM bei *CARD15* Exon VIII, der Zusatz von bovinem Serumalbumin 0,8 mg/ml für die Amplifikation der Promotorregion des *NRAMP1*. Zur Amplifikation des Exon V und der 3'UTR von *GATA3* war es erforderlich, die Endkonzentration der Primer im Reaktionsansatz auf je 0,4 µM zu verringern.

Das verwendete Standard-PCR-Profil ist in Tabelle 11 dargestellt.

Die individuelle Annealingtemperatur wurde für jedes verwendete Primerpaar mittels eines Temperaturgradienten ermittelt. Im Anschluss wurden nach visueller Überprüfung durch Agarosegelelektrophorese und anschließende Färbung die Bedingungen der PCR entsprechend modifiziert.

Tabelle 10: Volumenanteil und Konzentration der Reaktionsbestandteile im Standard-PCR-Ansatz.

Komponenten der Reaktion	Anteil in μl	Endkonzentration im Reaktionsansatz
Wasser für die Molekularbiologie	24,9–26,9	-
10x <i>Taq</i> Buffer advanced ²	4,5	1x konz.
20 mM dNTP Mix	5,0	2,2 mM
Vorwärtsprimer	3,15	0,7 μM
Rückwärtsprimer	3,15	0,7 μM
<i>Taq</i> DNA Polymerase (5 U/ μl) ¹	0,3	1,5 U
Template-DNA ³	2,0–4,0	
Gesamtvolumen	45,0	-

¹*Taq* DNA Polymerase-Puffer: 20 mM Tris-HCl pH 8,0 bei 25 °C, 100 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 50 % Glycerol, 0,5 % Tween®20, Igepal® CA-630

²Self-adjusting magnesium buffer, maximale Kapazität 2,0 mM Mg²⁺

³Konzentration 3 bis 15 ng/ μl

Tabelle 11: Standard PCR-Profil zur Amplifizierung der PCR-Produkte in Kandidatengen

Zyklus	Temperatur (°C)	Dauer in min	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	1:30	1
Denaturierung	94 °C	0:15	
Annealing	variabel	0:30	35
Elongation	72 °C	1:30	
Finale Elongation	72 °C	5:00	

3.8.4.3 Direktsequenzierung von PCR-Fragmenten

Die Sequenzierung erfolgte am *ABI PRISM*[®] 377 DNA Sequencer unter Verwendung des *ABI PRISM*[®] BigDye[®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit. Grundlage war das enzymatische Sequenzierungsverfahren nach Sanger et al. (1977.)

3.8.4.3.1 Aufreinigung von PCR-Produkten

Die zu sequenzierenden PCR-Produkte wurden mit dem Wizard[®]SV-Gel and PCR-clean-up-System nach den Vorgaben des Herstellers aufgereinigt. Modifikationen betrafen die Zentrifugierzeit und -Geschwindigkeit, die jeweils 2 min bei 11900 rpm betrug. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei Raumtemperatur ausgeführt. Nach dem zweiten Waschvorgang mit Ethanol wurde eine zusätzliche Zentrifugation bei 11900 rpm über fünf min durchgeführt. Waren mehr als 20 PCR-Produkte zur Aufreinigung vorhanden, wurden diese mit dem MSB Spin PCRapace-Kit gemäß Herstellerprotokoll aufgereinigt. Anschließend wurde ein Aliquot (5 μl) der Produkte auf ein 1%iges Agarosegel geladen und einer

Elektrophorese unterzogen. Als Marker wurde 5 µl (Konz. 0,1 µg/µl) Gene Ruler 100+ verwendet, um die Konzentration der Produkte zum Einsetzen in die Sequenzierreaktion schätzen zu können.

3.8.4.3.2 Durchführung der Sequenzierreaktion

Die Komponenten der Sequenzierreaktion gibt Tabelle 12 wieder. Da bei der Sequenzierung nur ein DNA-Strang amplifiziert wird, wurde jeweils nur ein Primer (Vorwärts- oder Rückwärtsprimer) in die Sequenzierreaktion eingesetzt. Der „Cycle Sequencing Mix“ enthielt fluoreszenzfarbstoffmarkierte Didesoxynukleotide, deren zufälliger Einbau neben unmarkierten dNTPs im Verlauf der Reaktion einen Kettenabbruch bewirkte. Die Bedingungen der Sequenzierreaktion sind in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 12: Volumenanteil und Konzentration der Reaktionsbestandteile für die Sequenzierreaktion

Komponenten der Reaktion	Anteil in µl
Premix	4,0
Verdünnungspuffer	2,0
Primer (5 pM)	1,0
PCR-Produkt ¹	1,0–5,0
Wasser für die Molekularbiologie	ad 20,0

¹nach Schätzung der Konzentration mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese

Tabelle 13: Standard-Profil zur Sequenzierung der PCR-Produkte aus Kandidatengen.

Zyklus	Temperatur (°C)	Dauer in min	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	96 °C	1:00	1
Denaturierung	96 °C	0:10	25
Annealing	50–60 °C	0:05	
Elongation	60 °C	4:00	
Finale Elongation	72 °C	5:00	1
Kühlung	4 °C	∞	1

Nach durchgeführter Sequenzierreaktion wurden sofort 50 µl Ethanol absolut und 2 µl 3 M Natriumacetat (pH 4,6) zugegeben, vermischt und nach einem Zentrifugationsschritt von 15 min bei 11900 rpm bei Raumtemperatur pelletiert. Der Überstand wurde mittels einer Wasserstrahlpumpe entfernt und das Pellet zweimalig durch Zugabe von 70%igem Ethanol gereinigt, anschließend luftgetrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei –20 °C gelagert.

3.8.4.3.3 Herstellung eines Polyacrylamidgels für die Sequenzierung

Für die Sequenzanalyse wurde ein 5%iges (w/v) Polyacrylamidgel (7 M Urea) gefertigt. Hierfür wurde eine Gellösung hergestellt, entgast und anschließend TEMED sowie APS dazupipettiert. Anschließend wurde das Gel gegossen und ein Vorkamm gesetzt. Die weitere

Vorgehensweise erfolgte wie von Lühken (2007) beschrieben.

Gellösung (Gesamtvolumen 46,3 ml):

- 21 g Harnstoff
- 8,4 ml Polyacrylamid (Acrylamid/Bisacrylamid 29:1)
- 20 ml HPLC-gereinigtes Wasser
- 6 ml 10x TBE
- 20 µl TEMED
- 300 µl 10%iges (w/v) Ammoniumpersulfat (APS)

Loading Buffer:

- 50 mg Blue Dextran 2000 in 1 ml EDTA (25 mM) durch Ultraschall gelöst
- verdünnt 5:1 mit Dimethylformamid

3.8.4.4 Klonierung von PCR-Produkten

Die Klonierung von PCR-Produkten wurde mit dem ProMega pGEM®-T Easy Vector System II (*Promega GmbH, Mannheim*) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Bei der Ligation werden A-Überhänge am 3'-Ende des PCR-Produkts, die bei der Verwendung von *Taq*-Polymerase entstehen, mit den T-Überhängen des Vektors verbunden. Der Gesamtansatz von 10 µl enthielt 5 µl 2x Rapid Ligationspuffer, 1 µl pGEM-T Easy Vector, 2 µl des PCR-Produkts, 1 µl t4-Ligase, 1 µl deionisiertes Wasser und wurde bei Raumtemperatur eine Stunde inkubiert.

Danach erfolgte die Transformation des Plasmids in chemisch kompetente, hitzeaktivierte JM 109 *E. coli*-Zellen (Bestandteil des ProMega pGEM®-T Easy Vector System II) und deren Ausplattierung (1x 50 µl, 1x 150 µl) auf zwei LB- Agarplatten pro Tier mit je 20 ml LB-Medium.

Pro 100 ml LB-Medium wurden 100 µl Ampicillin (Endkonzentration im LB-Medium 100 mg/ml), 200 µl X-Gal (0,5 mM/ml), 500 µl IPTG (80 µg/ml) dazugegeben und gemischt. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 37 °C über Nacht im Brutschrank.

Die Auswahl der Kolonien erfolgte auf Basis der Blau/weiß-Selektion. Die erfolgreiche Ligation führt zu einer Veränderung im LacZ-Gen und verhindert die Expression aktiver β-Galactosidase und damit die Substratumsetzung. Dadurch bleiben die Bakterienkolonien weiß. Blaue Bakterienkolonien entstehen, wenn nach erfolgloser Ligation das Substrat X-Gal zu blauem Farbstoff umgesetzt wird (Mühlhardt 2003).

Flüssigkulturen von je 3 ml Luria-Bertani-Medium low salt mit Ampicillinzusatz

(100 µl/100 ml) wurden mit gepickten Einzelkolonien versetzt, bei 37 °C und 220 rpm über Nacht inkubiert und bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

LB (Luria Bertani)-Medium low salt:

- 10 g Bacto Tryptone
- 5 g Bacto Yeast
- 5g NaCl ad 1l H₂O, eingestellt auf pH 7

LB (Luria Bertani)-Medium low salt mit Agarzusatz:

- 10 g Bacto Tryptone
- 5 g Bacto Yeast
- 5g NaCl ad 1l H₂O, eingestellt auf pH 7
- 15 g Agar

3.8.5 Genotypisierungsmethoden

3.8.5.1 Fragmentlängenanalysen

3.8.5.1.1 Mikrosatellitenanalyse

Die PCR-Amplifikation der ausgewählten Mikrosatelliten *BMC9006*, *BB705*, *BB717*, *BB704*, *BB719*, *BMS1617*, *BB702*, *BOBT24*, *RM106* und *BM1225* erfolgte in Multiplex-Ansätzen. Die Genotypisierung wurde am *ABI PRISM® 377* DNA Sequencer unter Verwendung der GeneScan Software und des Programms Genotyper 3.7 NT durchgeführt.

Eine Standardisierung der Mikrosatellitenanalysen wurden mithilfe einer Referenzprobe (Dt. Holstein Bulle O2A) erreicht. Zusätzlich wurde in jeder PCR-Charge eine Kontrollprobe amplifiziert, die alle Komponenten des Reaktionsansatzes abzüglich des DNA-Templates enthielt, um Kontaminationen mit Fremd-DNA auszuschließen (Negativkontrolle). Die Sequenzen der verwendeten Primer sowie die Allelgrößen sind der Tabelle 14 zu entnehmen. Zur Detektion der Fragmente am *ABI PRISM® 377* DNA Sequencer wurde jeweils der Rückwärtsprimer mit einem der Farbstoffe VIC[®], NED[®] (eingetragene Marken der Firma *Applied Biosystems Appliedera Dtl. GmbH, Darmstadt*) oder 6-FAM 5'-fluoreszenzmarkiert (Tabelle 14). Bei den untersuchten Mikrosatelliten *BB704* und *BMC9006* war durch das Auftreten von Stotterbanden die Typisierbarkeit erschwert. Um das Auftreten von Stotterbanden, die als PCR-Artefakte durch partielle Denaturierung des Primer-Template-Komplexes während der Elongation und ein dadurch bedingtes Verrutschen des Templates zum neu synthetisierten Strang (Gerstenberger 2002) vor allem in Multiplex-Ansätzen entstehen (Clayton et al. 1998), zu verhindern, wurde den betreffenden Markern daher ein „PIGTail“, bestehend aus den sieben Basen „GTTTCTT“, an das 5'-Ende des Vorwärtsprimers

angehängt (Brownstein et al. 1996; Peter et al. 2005).

Für den Marker *BMC9006* wurde zur Amplifizierung eines 231 bp großen PCR-Produkts das Primerpaar GTTTCTTGTGGAATGAGTGGGCACAG (modifiziert nach Horin et al. 1999) und 6-FAM-CCTTCCAGAACTCCCTCTCC (modifiziert nach Sonstegard et al. 1997), abgeleitet aus der Sequenz U12862, verwendet. Dieses beinhaltet drei GT-Repeatmotive (Abbildung 2). Zur Verifizierung der Ergebnisse wurde eine weitere PCR unter Verwendung des Vorwärtsprimers GTTTCTTAAGGCAGCAAGACAGACAGG mit dem o. g. Rückwärtsprimer durchgeführt, deren Produkt nur zwei Repeats enthielt. Das hier amplifizierte PCR-Produkt war 163 bp groß.

Tabelle 14: Primersequenzen und Allelgrößen (bp) der untersuchten Mikrosatelliten. VIC[®], NED[®], 6-FAM= Fluoreszenzmarkierungen der verwendeten Mikrosatellitenprimer; for= Vorwärtsprimer; rev= Rückwärtsprimer; unterstrichene Sequenzen= PIGtail.

Mikrosatellit		Primersequenz (5' → 3')	bp
<i>BMC9006#9</i> ⁷	for	<u>GTTTCTT</u> AAGGCAGCAAGACAGACAGG	163
<i>BMC9006#5</i> ¹	for	<u>GTTTCTT</u> GTGGAATGAGTGGGCACAG	223-231
<i>BMC9006rev</i> ⁷	rev	6-FAM-CCTTCCAGAACTCCCTCTCC	
<i>BB705</i> ²	for	GGGAGGTCTTTCCTACAGTGC	118-128
	rev	6-FAM-CACAAAGAGTCAGACACAGTTTAGC	
<i>BB717</i> ²	for	TGAGTCACCTGCAAGTTTGA	152-164
	rev	VIC [®] -GTCTGGTCCCAGTTTTGCA	
<i>BB704</i> ²	for	<u>GTTTCTT</u> TTTAAGCAGGGACGAACGTG	107-145
	rev	NED [®] -AATTGCCAGGAAGATTGTGG	
<i>BB719</i> ²	for	AAATGCCAGGACCTCACAG	254-284
	rev	VIC [®] -GCTAGGAGATGTTGCTGCTG	
<i>BMS1617</i> ³	for	GCCTGCATGTGTCTGTGG	143-165
	rev	6-FAM-TCTGTGTCCGGAATACCCTCC	
<i>BB702</i> ²	for	TAGCCACTGGACCATCAGG	186-198
	rev	VIC [®] -TGGCATTAGACCATGACAGC	
<i>BOBT24</i> ⁴	for	GAGCAAGGGAATTCAGTGGAGC	146-165
	rev	NED [®] -TGTATTTTACATTCAGGTCTGTGATCC	
<i>RM106</i> ⁵	for	TGCAGTTCGGACCATGGTGGGA	122-136
	rev	6-FAM-CAAATGCTATCATTTCTTGGACAA	
<i>BM1225</i> ⁶	for	TTTCTCAACAGAGGTGTCCAC	227-255
	rev	6-FAM-ACCCCTATCACCATGCTCTG	

¹Horin et al. (1999), ² Sonstegard et al. (2000) ³ Stone et al. (1995), ⁴ Buitkamp et al. (1996), ⁵ Barendse et al. (1994), ⁶ Bishop et al. (1994); ⁷ Sonstegard et al. (1997)

Tabelle 16: Reaktionsansätze für die Multiplex-PCR-Reaktionen Nr. 1, Nr. 2 und Nr. 3.

Komponenten der Reaktion	Volumen	Konzentration
ABsolute QPCR-Mix	7,5 µl	1x
10x Primermix	1,5 µl	1x
DNA-Template	1,0 µl	~3-15 ng/µl
H ₂ O für Molekularbiologie	5,0 µl	-
Gesamtvolumen	15,0 µl	

Diese Multiplex-Ansätze unterschieden sich lediglich in den Annealingtemperaturen. Die Amplifikationsbedingungen der einzelnen Reaktionen sind in Tabelle 17 erläutert.

Tabelle 17: PCR-Profil für die Multiplex-PCR-Reaktionen Nr. 1, Nr. 2 und Nr. 3.

Zyklus	Temperatur (°C)	Dauer in min	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	15:00	1
Denaturierung	94 °C	0:30	30
Annealing	MP Nr.1: 63 °C	1:30	
	MP Nr.2: 62 °C MP Nr.3: 62 °C		
Elongation	72 °C	1:00	
Finale Elongation	60 °C	30:00	1

3.8.5.1.1.2 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Bestimmung der Fragmentlängen der amplifizierten Mikrosatelliten erfolgte durch eine Polyacrylamidgelelektrophorese mit lasergestützter Detektion am *ABI PRISM[®] 377* DNA Sequencer wie von Peter (2005) dargestellt. Die Dauer der Elektrophorese betrug zwei Stunden bei 3000 V, 60 mA, 200 W und einer Temperatur von 51 °C. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Genotyper 3.7 NT. Zur Standardisierung und Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurde eine Standard-DNA-Probe (Bulle O2A) in jedem Lauf mit analysiert.

Gellösung:

- 18 g Harnstoff
- 7,5 ml Polyacrylamid (Acrylamid/Bisacrylamid 29:1)
- 23 ml HPLC-gereinigtes Wasser
- 6 ml 10x TBE
- 20 µl TEMED
- 300 µl 10%iges (w/v) Ammoniumpersulfat (APS)

Mastermix (Volumenverhältnis der Komponenten 5:1:2):

- 99,5%iges Formamid

ROX 500 (*Applied Biosystems Applied Biosystems GmbH, Darmstadt*)

Ladepuffer

3.8.5.1.2 Analyse der Insertion im Interleukin2-Gen (*IL2*)

Die Typisierung der Insertion im Intron 2 des *IL2*-Gens (*IL2In2+28 Ins [aatt]*) erfolgte mittels Polyacrylamidgelelektrophorese und Laserdetektion am A.L.F.*express* DNA Sequenziergerät wie bei Lühken (2007) beschrieben. Als Längenstandard wurde der A.L.F.-Leitermix des Instituts für Tierzucht und Haustiergenetik mit 74 bp; 124 bp; 170 bp; 202 bp und 266 bp (Markierung: Cy5) verwendet (Hiendleder et al. 1998).

3.8.5.2 PCR-RFLP und ACRS-Analysen

3.8.5.2.1 Auswahl der Restriktionsenzyme

Basenaustausche innerhalb der amplifizierten Genabschnitte wurden mit Hilfe des NEBcutter V 2.0 (Vincze et al. 2003) auf Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme untersucht. Veränderte ein gefundener Basenaustausch die Erkennungssequenz, wurde das Enzym ausgewählt. Falls keine natürliche Schnittstelle im Bereich des Polymorphismus vorhanden war, wurde durch Modifikation der Basenabfolge eines Primers in der Nähe des 3'-Endes eine künstliche Erkennungssequenz (amplification created restriction site, ACRS) geschaffen (Haliassos et al. 1989). In Tabelle 18 sind die verwendeten Restriktionsenzyme sowie deren Inkubationstemperaturen und Erkennungssequenzen beschrieben.

Tabelle 18: Restriktionsenzyme für PCR-RFLP und PCR-ACRS, deren Bezugsquellen, verwendete Puffer, die jeweiligen erforderlichen Inkubationstemperaturen und Erkennungssequenzen.

Enzym	Hersteller	Puffer	Inkubations- temperatur	Erkennungssequenz
<i>TaqI</i>	Fermentas	Buffer <i>TaqI</i>	65 °C	5'-T ^A C G A-3' 3'-A G C ^A T-5'
<i>NlaIII</i> ¹	New England Biolabs	10x NEB Buffer4	37 °C	5'-C A T G ^A -3' 3'- ^A G T A C-5'
<i>TaaI</i>	Fermentas	10x Buffer Tango	65 °C	5'-A C N ^A G T-3' 3'-T G ^A N C A-5'
<i>BsuRI</i> (<i>HaeIII</i>)	Fermentas	10x Buffer R	37 °C	5'-G G ^A C C-3' 3'-C C ^A G G-5'
<i>PstI</i>	Fermentas	10x Buffer O	37 °C	5'-C T G C A ^A G-3' 3'-G ^A A C G T C-5'
<i>Hpy188III</i>	New England Biolabs	10x NEB Buffer4	37 °C	5'-T C ^A N N G A-3' 3'-A G N N ^A C T-5'

¹Zusatz von 1 x BSA im Reaktionsansatz

Buffer TaqI:

10 mM Tris-HCL (pH 8,0), 5mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 0,1 mg/ml BSA

NEB Buffer 4:

50 nM Kalium-Acetat, 20 mM Tris-Acetat, 10 mM Mg-Acetat, 1 mM DTT

Buffer Tango:

33 mM Tris-Acetat (pH 7,9), 10 mM Mg-Acetat, 0,1 mg/ml BSA

10X Buffer R:

10 mM Tris-HCl (pH 8,5 at 37°C), 10 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 0,1 mg/ml BSA

10x Buffer O:

50mM Tris-HCl (pH 7,5 at 37°C), 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 0,1 mg/ml BSA

3.8.5.2.2 Auswahl der Primer für PCR-RFLP

Nach Auswahl des Restriktionsenzym wurden Primerpaare ermittelt, die eine Produktgröße der Amplifikate von rund 200 Basenpaaren ergaben. Die ausgewählten Primerpaare gibt Tabelle 19 wieder. Ebenfalls aufgeführt sind die Sequenzen der von Lühken (2007) entwickelten Primer zur Typisierung zweier Nukleotidaustausche im Promotor (*IL2* Promotor -146) und im Intron 2 (*IL2*In2+148) des *IL2*.

Tabelle 19: Primer für die RCR-RFLP in Kandidatengen (PCR Nr. 1 bis 7) sowie die Produktgrößen der Amplifikate (bp) und optimale Annealingtemperatur (AT).

PCR Gen Nr.	Name	Primersequenz (5' → 3') oben: Vorwärtsprimer, unten: Rückwärtsprimer	bp	AT (°C)
1	<i>NRAMP1</i> BT NRAMP1-RFLP_F ¹	GAAACACAGACCCAGATATGTAAAtC	150	59
	BT NRAMP1-RFLP_R	CCAGGGTGCTGGAGACCTA		
2	<i>TLR4</i> TLR4-RFLP_586_F	GACAAATTCTCAGGGGACGAT	188	57
	TLR4-RFLP_586_R	AACTTTTGTGAGAGAACTGAGCTTCAc		
3	<i>CARD15</i> NOD2-IN10_F3	AGCATCCTCAAAGTTCACCATaC	137	59
	NOD2-IN10_R5	TGCCCAGGATCTTACCAGAC		
4	<i>CARD15</i> NOD2-ExIV RFLP+271_F	GTCCAAGCTGAGGACCGTTA	220	56
	NOD2-ExIV RFLP+271_R	CAGCACAGTGTCTGCCTCTT		
5	<i>IL2</i> For3 Rind_Cy5 ²	Cy5-AAGCTCTCCAGGATGCATAC	218	59
	BT <i>IL2</i> IN2 RFLP +148 (R) ²	ACTGCAAAGCCATTTTTTCAGAg		
6	<i>IL2</i> BT <i>IL2</i> Prom 340bp (F) ²	TCTTGTCCACCACAACATGG	340	63
	BT <i>IL2</i> Prom 340bp (R)	TGATGGGGGTGTCAAATGT		
7	<i>GATA3</i> GATA3-BT ExV_F2	ACCTCACCACCCTTCCAGTA	268	59
	GATA3-BT 3'UTR_R2	TGAATGGCTTATTCACAAATGG		

¹Zusatz von 2x Enhancer-Solution P in der Reaktion; ² Lühken 2007; eingefügte Fehlpaarungen sind in Kleinbuchstaben dargestellt; Cy-5, Fluoreszenzfarbstoff Indidodicarboyanin

3.8.5.2.3 Durchführung der Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Komponenten der PCR-Ansätze sind in Tabelle 20 dargestellt. Es wurde jeweils eine Standardprobe pro PCR-Reaktion mit amplifiziert, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten.

Tabelle 20: Volumenanteil und Konzentration der Reaktionsbestandteile im Standard-PCR-Ansatz für die Amplifikation von PCR-Produkten für den Restriktionsverdau.

Komponenten der Reaktion	Endkonzentration im Reaktionsansatz					
	PCR 1	PCR 2	PCR 3	PCR 4	PCR 5/6	PCR 7
Wasser für die Molekularbiologie	–	–	–	–	–	–
10x <i>Taq</i> Buffer advanced ¹	1x	1x	1x	1x	1x	–
25 mM Mg-Solution	–	–	–	–	2,5 mM	–
2 mM dNTPs ²	0,13 mM	0,13 mM	0,2 mM	0,2 mM	0,2 mM	0,2 mM
Enhancer Solution 5 x konz.	1 x	1x	–	–	–	–
DMSO 100 %	–	–	–	–	–	5 %
Vorwärtsprimer	0,7 mM	1 mM	0,6 mM	0,4 mM	0,4 mM	0,7 mM
Rückwärtsprimer	0,7 mM	1 mM	0,6 mM	0,4 mM	0,4 mM	0,7 mM
<i>Taq</i> DNA Polymerase (5 U/μl)	1 U	0,5 U	1 U	1 U	1 U	0,5 U
Template-DNA ³	2 μl	2 μl	4 μl	4 μl	4 μl	1 μl
Gesamtvolumen	30 μl	15 μl	25 μl	25 μl	25 μl	15 μl

¹Konzentration *Taq* Buffer advanced bis zu 2,0 mM Mg²⁺; ²dNTPs (Konz. je Base dATP, dGTP, dTTP, dCTP 2 mM); ³Konzentration 3 bis 15 ng/μl

Die Cyclerbedingungen der Standard-PCR veranschaulicht Tabelle 21. Davon abweichend erforderte die Amplifikation des *IL2*Prom340bp eine initiale Denaturierung von 1:30 min bei 94°C und 35 Zyklen mit je 0:15 min Denaturierung bei 94°C, 0:30 min Annealing bei 63 C sowie 0:45 min Elongation.

Tabelle 21: Standard PCR-Profil zur Amplifikation von PCR-Produkten für den anschließenden Restriktionsverdau

Zyklus	Temperatur (°C)	Dauer in min	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	2:00	1
Denaturierung	95 °C	0:20	35
Annealing	variabel	0:20	
Elongation	72°C	0:20	
Finale Elongation	72 °C	5:00	1
Kühlung	6 °C	∞	1

3.8.5.2.4 Spaltung von DNA mittels Restriktionsenzymen

Anschließend wurde zu jedem PCR-Produkt ein Mix von Enzym und weiteren erforderlichen Komponenten gegeben und gemäß den erforderlichen Bedingungen (Tabelle 22) inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden zu jeder Probe 2 µl Ladepuffer gegeben und diese Mischung auf ein Agarosegel (low melting Agarose und Standard-Agarose im Verhältnis 1:6) aufgetragen. Die Agarosegelkonzentration betrug 2,5 % für Verdau Nr. 1 und 2 bzw. 3,5 % für Verdau Nr. 3 bis 5 und 7. Nach erfolgter Trennung der Fragmente bei 0,5 °C in 1x TBE-Puffer und einer Spannung von 7,5 V/cm wurden die Gele im Ethidiumbromidbad gefärbt und die Banden unter UV-Licht dargestellt (Sambrook et al. 1989).

Die fluoreszenzmarkierten PCR-Fragmente aus Restriktionsverdau Nr.6 wurden durch Elektrophorese und Laserdetektion am A.L.F.*express* DNA Sequenziergerät wie bei Lühken et al. (2007) dargestellt (siehe auch Kapitel 3.8.5.1.2).

Tabelle 22: Ansätze für den Restriktionsverdau und eingesetzte Menge einzelner Komponenten.

Verdau von PCR Nr.	Enzym (Einheiten)	Puffer	BSA	Wasser (µl)	Gesamtvolumen (µl)
1	<i>Taq</i> I (10)	1 x	–	–	10,0
2	<i>Pst</i> I (10)	1 x	–	–	10,0
3	<i>Taa</i> I (3)	1 x	–	0,7	10,0
4	<i>Nla</i> III (10)	1 x	1x	0,4	14,0
5	<i>Bsu</i> RI (10)	1 x	–	–	12,0
6	<i>Hpy</i> 188III (10)	1 x	1x	–	10,0
7	<i>Taa</i> I (3)	1 x	–	0,7	10,0

BSA, bovines Serumalbumin

3.8.5.3 Tetra-Primer Amplification-Refractory-Mutation-System-PCR

Die Typisierung des Probenmaterials mittels einer Tetra-Primer Amplification-Refractory-Mutation-System-PCR (Tetra-Primer ARMS) (Ye et al. 2001) erfolgte mit den publizierten Primern (Tabelle 9) für den Basenaustausch *TLR4* E3+2021 (Sharma et al. 2006). Abweichend vom veröffentlichten Protokoll wurde die Konzentration der beiden Outer Primer auf je 5 pmol erhöht, die DNA-Konzentration betrug 15–30 ng im Ansatz.

Tabelle 23: Primer für die Tetra-Primer ARMS-PCR mit Touchdown-Protokoll zum Nachweis des Basenaustausches *TLR4* E3+2021 (Sharma et al. 2006).

Name	Primersequenz (5' → 3')	Produktgrößen
TLR4_E3+2021_In-F	AAAAAGTATGGCAGGGGCGAGAGAAT	T-Allel: 272 bp
TLR4_E3+2021_In-R	CGAGTAGATGACAAAGGCATCATCGG	C-Allel: 380 bp
TLR4_E3+2021_Out-F	TCATGGCCTCTAAGGAGCAAGAACTACAG	600 bp
TLR4_E3+2021_Out-R	GGGCAATCTCATACTCGAAGATACACCA	

3.9 Bioinformatische Analyse von Nukleotidsequenzdaten

Die Auswertung der Sequenzen, die Überprüfung der Qualität und die Suche nach Sequenzvarianten erfolgten mithilfe der Programme „ChromasPro Version 1.3 beta 1“ und „MutationSurveyor™ Version 2.60“. Zur Gegenüberstellung von Aminosäuresequenzen wurde zusätzlich das Programm GeneDoc V 2.6.002 (Nicholas und Nicholas 2000) verwendet. Die Analyse des Einflusses von Basenaustauschen auf Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren in nicht kodierenden Bereichen erfolgte mit dem Programm TFSEARCH (Heinemeyer et al. 1998).

Die vergleichende Untersuchung von Aminosäureaustauschen wurde *in silico* mittels SIFT-Software (Ng und Henikoff 2001; 2002; 2003) und der BLOSUM62-Matrix (Henikoff und Henikoff 1992) durchgeführt. Basierend auf der Voraussetzung, dass wichtige Aminosäuren in einer Proteinfamilie zwischen Spezies konserviert sind, wird nach dem Alignment homologer Sequenzen untersucht, ob es sich bei dem gefundenen Austausch wahrscheinlich um ein DSA handelt. Die SIFT-Software kalkuliert einen Score, der angibt, ob ein Aminosäureaustausch vermutlich toleriert wird oder ob er die Funktion des Proteins beeinträchtigt. SIFT Werte < 0,08 deuten an, dass die Proteinfunktion durch den Austausch beeinträchtigt wird. Der Wert 0,00 zeigt die höchste Wahrscheinlichkeit einer funktionellen Bedeutung an.

Die BLOSUM62-Matrix berücksichtigt die chemischen und physikalischen Eigenschaften der Aminosäure-Seitenketten zur Abschätzung, ob es sich um konservative oder nichtkonservative Aminosäureaustausche handelt. Positive BLOSUM62-Werte deuten neutrale Aminosäureaustausche an, negative Werte nichtkonservative Austausche.

3.10 Statistische Methoden

3.10.1 Varianzkomponentenschätzung

Anhand der Daten des Thüringer Sanierungsprogramms und der Abstammungsdaten des VIT Verden wurden für die Rasse Dt. Holstein Heritabilitäten für die Antikörperantwort der MAP-Infektion geschätzt, wobei $n = 4524$ Kühe mit Abstammungsinformationen aus 12 Betrieben zur Schätzung der Heritabilität genutzt wurden. Für 2084 dieser Tiere aus sechs Betrieben lag auch der gemessene OD-Wert vor. Um eine Normalverteilung dieser Werte zu erreichen, wurde folgende Umwandlung vorgenommen: $ODV_T = \log_e(ODV)$.

Die Schätzung der Varianzkomponenten erfolgte mittels Tier- bzw. Vatermodellen mit dem Programm ASREML (Gilmour et al. 2002). Unter Verwendung eines Schwellenwertmodells und unter Annahme einer Binomialverteilung wurden die verdächtigen Tiere jeweils einmal den positiven (QPOS) sowie einmal den negativen (QNEG) Tieren zugeteilt. In einem linearen Modell mit Normalverteilung für MAP-Status und ODV_T und im Schwellenwertmodell wurden als fixe Einflussfaktoren der Betrieb und das Alter der Kühe zum Zeitpunkt der Beprobung neben dem zufälligen Effekt des Vaters (Vatermodell) oder des Tieres (Tiermodell mit Verwandtschaftsmatrix) berücksichtigt. Aufgrund der Altersverteilung der beprobten Kühe wurden sechs Altersklassen (bis zwei Jahre, drei, vier, fünf, sechs Jahre sowie älter als sechs Jahre) gebildet. Die zugrunde liegenden Modelle lauteten wie folgt.

Modell 1: Vatermodell

$$y_{ijkl} = \mu + B_i + AK_j + V_k + e_{ijkl}$$

y_{ijkl} = Beobachtungswert des Tieres

μ = Mittelwert

B_i = fixer Effekt des Betriebes ($i = 1-12^a$ / $i = 1-6^b$)

AK_j = fixer Effekt der Altersklasse ($j = 1-6$)

V_k = zufälliger Effekt des Vaters ($k = 1-564^a$ / $k = 1-297^b$)

e_{ijkl} = zufälliger Resteffekt

^a= bei Tieren mit MAP-Status ($n = 4524$)

^b= bei Tieren mit MAP-Status und ODV ($n = 2084$)

Modell 2: Tiermodell

$$y_{ijk} = \mu + B_i + AK_j + a_{ijk} + e_{ijk}$$

y_{ijk} = Beobachtungswert des Tieres

μ = Mittelwert

B_i = fixer Effekt des Betriebes ($i = 1-12^a / i = 1-6^b$)

AK_j = fixer Effekt der Altersklasse ($j = 1-6$)

a_{ijk} = zufälliger Tiereffekt

e_{ijk} = zufälliger Resteffekt

^a= bei Tieren mit MAP-Status (n = 4524)

^b= bei Tieren mit MAP-Status und ODV (n = 2084)

Die Heritabilität wurde im Vatermodell wie folgt geschätzt:

$$h^2 = \frac{4 \sigma_s^2}{\sigma_s^2 + \sigma_e^2} \quad (\text{im Schwellenwertmodell ist } \sigma_e^2 = 1)$$

wobei σ_s^2 und σ_e^2 die geschätzten Vater- bzw. Restvarianzen darstellen.

3.10.2 Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWG) wurden geschätzt unter Verwendung des Programms POPGENE: Population Genetic Analysis (Yeh et al. 1997).

3.10.3 Assoziationsstudien

Die Genotyp- und Allelfrequenzen wurden berechnet mittels der Prozedur FREQ (SAS System 8.1).

Die mögliche Assoziation zwischen dem untersuchten Kandidatengen bzw. Mikrosatellitenallel und dem MAP-Status wurde über den Vergleich der Allelfrequenzen zwischen Fall- und Kontrollgruppe mittels χ^2 - und Fishers Exakt-Test geprüft.

Anhand der Fall- und Kontrollgruppe wurde der Einfluss des MAP-Status auf die Milchleistungsparameter mit Hilfe eines linearen Modells mit der Prozedur GLM (SAS System 8.1) untersucht. Als fixe Effekte wurden der Effekt des Betriebes und der Altersklasse sowie der MAP-Status berücksichtigt.

4 Ergebnisse

4.1 Zusammenhänge zwischen verschiedenen Parametern und MAP-Status

4.1.1 Einfluss des MAP-Status auf die Milchleistung

Die Analyse der Laktationsdaten unter Berücksichtigung des MAP-Status ergab keine signifikanten Unterschiede in der Milchleistung zwischen Fall- und Kontrollgruppe (Tabelle 24).

Der MAP-Status hatte ebenfalls keinen signifikanten Einfluss auf die Milchprotein-, jedoch auf die Milchfettmenge ($p < 0,05$).

Tabelle 24: LSQ-Mittelwerte (LSM) und Standardfehler (SE) für den Einfluss des MAP-Status auf Milchleistungsparameter von Kühen der Fall- und Kontrollgruppe.

	n	Milchmenge (kg)		Milchfett (kg)		Milchprotein (kg)	
		LSM	SE	LSM	SE	LSM	SE
Fallgruppe	497	7704,2	72,6	304,2*	2,5	259,5	2,2
Kontrollgruppe	496	7788,7	71,9	310,7	2,5	262,6	2,2

nur Laktationen über 250 Tagen wurden berücksichtigt;

*, signifikant bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 %

4.1.2 Einfluss von Betrieb und Alter auf den MAP-Status

Die Betriebsmittelwerte des Anteils MAP-positiver Kühe in den untersuchten betroffenen Betrieben (A bis L) sind in Abbildung 3 aufgezeigt. Es war in allen Modellen ein höchst signifikanter ($p < 0,001$) Einfluss des Betriebes auf den MAP-Status nachweisbar.

Im Schwellenwertmodell lag der höchste Anteil positiv getesteter Tiere in einem Betrieb bei 63 % (verdächtige wurden den positiven Tieren zugeschlagen, QPOS) bzw. 38 % (verdächtige Tiere wurden den negativen zugeschlagen, QNEG), der geringste Anteil positiver Tiere bei 5 % resp. 3 % in einem Betrieb.

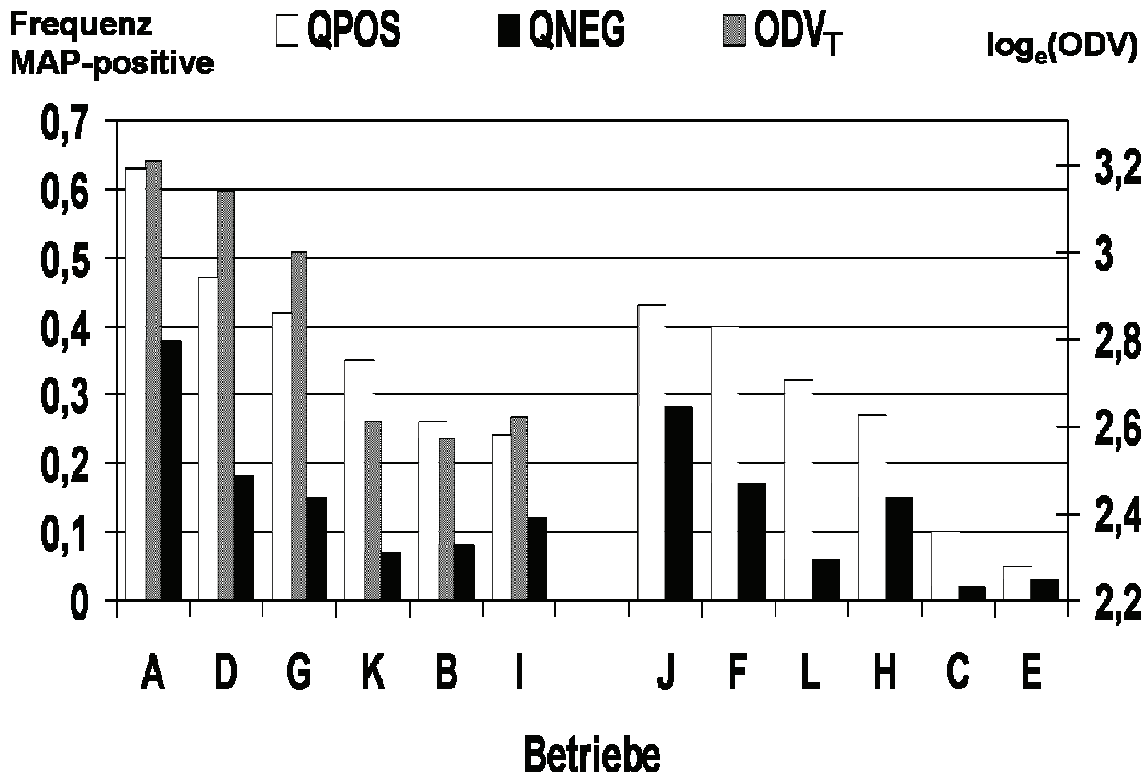


Abbildung 3: Darstellung der geschätzten Betriebsmittelwerte (Betrieb A bis L) des Anteils MAP-positiver Kühe der Rasse Dt. Holstein, basierend auf dem serologischen MAP-Status und dem OD-Wert.

QPOS: die verdächtig getesteten Tiere sind den positiven, bei QNEG den negativen Tieren zugeordnet (Schwellenwertmodell). Der ODV liegt als normalverteiltes Merkmal vor.

Die geschätzten Mittelwerte für die Altersklassen in Jahren mit dem serologischen MAP-Status als binomial verteiltes Merkmal sowie als normalverteiltes Merkmal sind in Abbildung 4 dargestellt. Die Altersklasse hat in allen Modellen einen statistisch höchst signifikanten ($p < 0,001$) Einfluss auf den MAP-Status der Rinder.

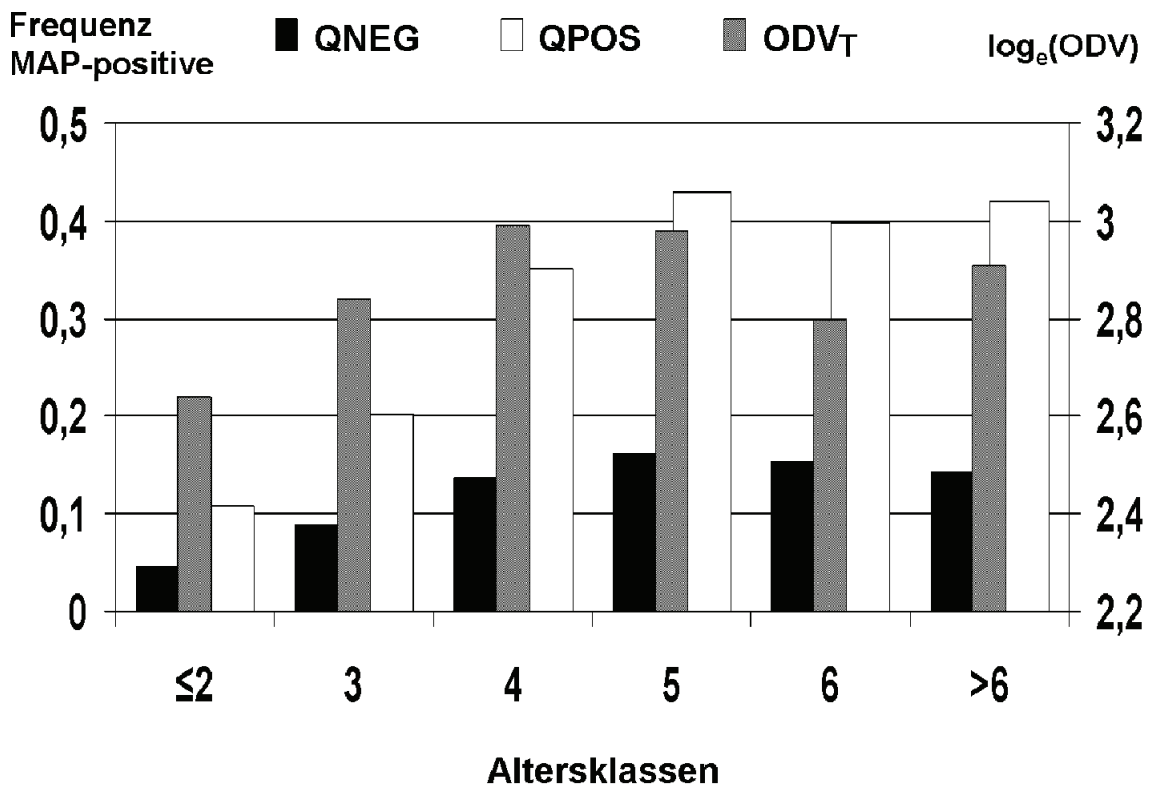


Abbildung 4: Darstellung der geschätzten Mittelwerte des Anteils MAP-positiver Tiere für Altersklassen (in Jahren) bei der Rasse Dt. Holstein, basierend auf dem serologischen MAP-Status und dem OD-Wert.

QPOS: die verdächtig getesteten Tiere sind den positiven, bei QNEG den negativen Tieren zugeordnet (Schwellenwertmodell). Der ODV liegt als normalverteiltes Merkmal vor.

Anhand von Abbildung 4 kann bei der Analyse mit den fraglichen Tieren in der Klasse der negativen Tiere ein linearer Anstieg des Anteils serologisch positiv getesteter Tiere von zwei Jahren bis zu einem Alter von fünf Jahren beobachtet werden. Danach sinkt der Anteil positiv getesteter Kühe leicht. Dieser Trend ist auch bei der Analyse mit den fraglichen Tieren innerhalb der Klasse der Positiven zu beobachten.

Die Differenz zwischen den beiden Schätzwerten innerhalb der Altersklassen gibt den Anteil an fraglichen Tieren wieder, der ebenfalls einen Anstieg bis zur Altersklasse 5 Jahre zeigt und dann auf dem gleichen Niveau bleibt. Im linearen Modell zeigen ebenfalls die 5-jährigen Tiere die höchsten OD-Werte, die bei den 6 Jahre alten leicht abfallen, bei den über 6-Jährigen jedoch wieder leicht ansteigen.

4.1.3 Varianzkomponentenschätzung und Heritabilitäten

Die geschätzten Heritabilitäten schwanken von 0,05 bis 0,14 und sind in Tabelle 25 dargestellt.

Tabelle 25: Geschätzte Heritabilitäten für das Merkmal der Antikörperbildung gegen *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* beim Dt. Holstein unter Berücksichtigung verschiedener Modelle und Datensätze.

Datensatz	Status	Merkmal	Modell	Heritabilität	SE
1	QPOS	binär	VM	0,1274	0,0508
1	QPOS	binär	TM	0,0617	0,0249
1	QNEG	binär	VM	0,1145	0,0603
1	QNEG	binär	TM	0,0519	0,0320
2	QPOS	binär	VM	0,1130	0,0644
2	QPOS	binär	TM	0,0652	0,0347
2	QNEG	binär	VM	0,1380	0,0926
2	QNEG	binär	TM	0,0518	0,0451
2	log(ODV)	normalverteilt	VM	0,0969	0,0483
2	log(ODV)	normalverteilt	TM	0,1018	0,0427

Datensatz 1, Tiere mit bekanntem MAP-Status positiv, verdächtig, negativ; Datensatz 2, Tiere mit MAP-Status und bekanntem OD-Wert aus dem Svanovir-ELISA; QPOS, verdächtige Tiere sind den positiven zugeordnet; QNEG, verdächtige Tiere sind den negativen zugeordnet; VM, Vatermodell; TM, Tiermodell; SE Standardfehler

Für die Schwellenwertmodelle wurden in den Vatermodellen immer höhere Heritabilitäten als in den Tiermodellen geschätzt. Im linearen Modell mit dem logarithmierten OD-Wert wurde dies nicht beobachtet. Unter Annahme von Normalverteilung war die Heritabilität im Tiermodell geringgradig höher. Innerhalb der Tier- bzw. Vatermodelle waren die Heritabilitäten zwischen den verschiedenen Datensätzen jedoch sehr ähnlich.

Den Anteil der additiv-genetischen Varianz und der Restvarianz in den einzelnen Modellen zeigt Abbildung 5. In den Vatermodellen ist die additiv-genetische Varianz höher, die Restvarianz jedoch geringer als in den Tiermodellen. Diese Unterschiede zwischen den beiden Modellen sind nicht nachzuweisen, wenn der logarithmierte OD-Wert als Merkmal zugrunde liegt.

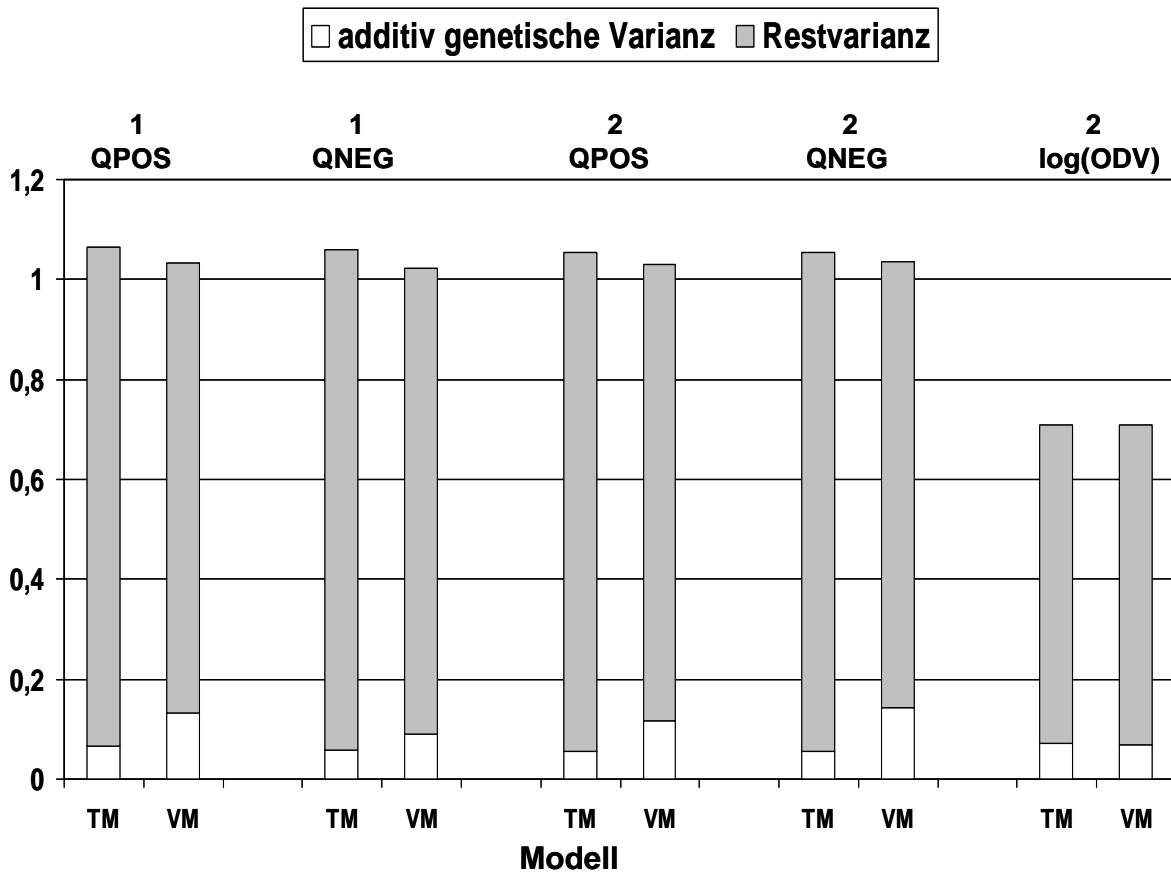


Abbildung 5: Varianzkomponentenschätzung, Darstellung der additiv-genetischen Varianz und der Restvarianz unter Verwendung verschiedener Datensätze (1, 2).

TM, Tiermodell; VM, Vatermodell; bei QPOS sind die verdächtig getesteten Tiere den positiven, bei QNEG den negativen Tieren zugeordnet; der logarithmierte ODV liegt als normalverteiltes Merkmal vor.

4.2 Mikrosatellitenanalyse

4.2.1 Typisierbarkeit der Mikrosatelliten

Es war für alle zehn untersuchten Mikrosatelliten möglich, sie im Rahmen von drei Multiplex-Reaktionen zu typisieren. Bis auf den Marker *BMC9006* waren alle Mikrosatelliten zuverlässig typisierbar. Bei allen Mikrosatelliten konnte bei einzelnen Proben kein Amplifikationsprodukt gewonnen werden. Dies betraf jedoch verschiedene Einzeltiere an unterschiedlichen Loci. In der Gelelektrophorese konnte lediglich für einzelne Mikrosatelliten kein Amplifikationsprodukt erhalten werden. Es gab keine Template-DNA, bei der alle Mikrosatellitenloci ausfielen.

4.2.2 Vergleichstiere

Die Zahlen der für acht Mikrosatelliten identifizierten Allele bei den Rassen der Vergleichsgruppe sind in Tabelle 26 dargestellt. Dabei wurden unter Durchführung des Fishers-Exakt-Tests höchst signifikante ($p \leq 0,001$) Rasseunterschiede festgestellt.

Die einzelnen Marker wiesen zwischen ein Allel (*BMC9006*) und zwölf Allele auf, wobei die höchste Anzahl an Allelen in allen Rassen beim Mikrosatelliten *BB719* beobachtet wurde. Es fällt weiterhin auf, dass bei der Rasse Dt. Angus die Allelanzahl in den meisten Fällen höher ist, als bei den anderen untersuchten Rassen. Bei den Vergleichstieren der Rasse Jersey waren die Marker *BMC9006* und *BB705* auf ein Allel fixiert. Die ermittelten Allelfrequenzen für die einzelnen Marker sind detailliert im Anhang Tabelle B aufgeführt.

Tabelle 26: Allelanzahl der in der untersuchten Vergleichsgruppe typisierten Mikrosatelliten und Zahl der untersuchten Tiere je Rasse (n).

Rasse	n	<i>BB704</i>	<i>BMC9006</i>	<i>BMS1617</i>	<i>BOBT24</i>	<i>BB719</i>	<i>BB702</i>	<i>BB717</i>	<i>BB705</i>
Dt. Angus	116	4	4	9	4	12	7	4	5
Dt. Fleckvieh	99	5	3	8	6	10	6	3	5
Dt. Holstein	84	4	2	8	6	11	5	4	3
Jersey	41	2	1	6	3	3	4	3	1

4.2.3 Fall- und Kontrollgruppe

Bei der Analyse konnten seltene Allele mit einer Frequenz von < 5 % identifiziert werden. Die Marker *BMC9006* und *BB705* wiesen beide nur drei Allele auf, wobei eines der Allele in der Population jeweils nahezu fixiert war (*BMC9006*, Allel 231 bp; *BB705*, Allel 118 bp). Die Mikrosatelliten *BB704*, *BMS1617*, *BOBT24*, *BB719*, *BB702*, *BB717*, *BM1225* und *RM106* zeigten zwischen sechs und zwölf Allele (Tabelle 27, Tabelle 28). Die Allelfrequenzen der Fall- und Kontrollgruppe wurden für jeden Mikrosatelliten unter Verwendung des χ^2 - und des Fishers-Exakt-Tests verglichen. Allele mit einer Frequenz unterhalb 5 % wurden für den χ^2 -Test zu einer Klasse zusammengefasst. Es konnten in keinem Fall signifikante Unterschiede in der Allelfrequenz zwischen Tieren der Fall- bzw. Kontrollgruppe nachgewiesen werden ($p > 0,05$).

Die Durchführung der PCR mit den Primern *BMC9006#9* und *BMC9006rev* und DNA von 33 Tieren der Rasse Dt. Holstein zur alleinigen Untersuchung des GT(13)-Repeats (Kapitel 3.8.5.1.1) ergab Monomorphie für alle untersuchten Proben. Für den Marker *BMC9006* wurde ein leichter Homozygotenüberschuss gegenüber dem Erwartungswert nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz nachgewiesen, alle anderen untersuchten Mikrosatelliten befanden sich im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

Tabelle 27: Anzahl der Allele (n_a) in der Fall- und Kontrollgruppe sowie erwartete (H_e) und beobachtete (H_o) Heterozygotie je Locus.

Locus	n_a	H_e	H_o
<i>BB704</i>	7	0,61	0,62
<i>BMC9006</i>	3	0,04	0,00
<i>BMS1617</i>	9	0,71	0,70
<i>BOBT24</i>	6	0,52	0,52
<i>BB719</i>	12	0,74	0,72
<i>BB702</i>	7	0,43	0,42
<i>BB717</i>	6	0,25	0,26
<i>BB705</i>	3	0,18	0,18
<i>BM1225</i>	8	0,66	0,67
<i>RM106</i>	7	0,58	0,58

ERGEBNISSE

Tabelle 28: Allelfrequenzen (%) der Mikrosatelliten in der Fall (Fall)- und Kontrollgruppe (Kont) sowie Zahl der je Marker genotypisierten Tiere (n).

Gruppe	n	Ermittelte Allele und Allelfrequenzen (%)												
<i>BB704</i> ^{n. s.}														
		118 ¹	120 ¹	146	148	150 ¹	154	158						
Fall	578	1,64	0,09	0,35	45,16	0,43	9,78	42,56						
Kont	571	2,10	0,00	0,70	41,94	0,09	11,38	43,78						
<i>BMC9006</i> ^{n. s.}														
		229	231	235										
Fall	418	2,27	97,61	0,12										
Kont	572	1,75	98,16	0,09										
<i>BMS1617</i> ^{n. s.}														
		148	152 ¹	154 ¹	156	158	160	162	164 ¹	166 ¹				
Fall	579	41,88	0,69	3,20	28,32	0,26	16,23	4,66	3,54	1,21				
Kont	573	42,67	0,70	1,75	28,80	0,09	14,49	5,76	3,84	1,92				
<i>BOBT24</i> ^{n. s.}														
		151 ¹	153	155 ¹	157 ¹	159 ¹	161							
Fall	579	2,68	64,68	2,33	5,79	1,47	23,06							
Kont	573	1,66	64,57	2,44	4,10	1,48	25,74							
<i>BB719</i> ^{n. s.}														
		258 ¹	264	266 ¹	268 ¹	276 ¹	278 ¹	280	284 ¹	286	288 ¹	290 ¹	292	
Fall	575	0,35	23,39	3,57	0,09	1,13	3,83	12,26	1,48	39,74	0,52	0,35	13,30	
Kont	568	0,53	20,77	3,87	0,00	0,53	4,31	11,97	1,32	44,01	0,18	0,53	11,97	
<i>BB702</i> ^{n. s.}														
		183 ¹	187	189	193	195 ¹	197	203 ¹						
Fall	583	0,34	5,49	6,95	74,79	0,43	7,63	4,37						
Kont	574	0,52	6,01	6,71	74,65	0,26	7,93	3,92						
<i>BB717</i> ^{n. s.}														
		158 ¹	164	166 ¹	168	170 ¹	174 ¹							
Fall	571	0,35	86,08	3,68	9,02	0,53	0,35							
Kont	559	0,45	85,42	3,85	9,93	0,18	0,18							
<i>BB705</i> ^{n. s.}														
		118	122	124										
Fall	582	90,64	7,73	1,63										
Kont	574	89,63	8,89	1,48										

(Fortsetzung nächste Seite)

Fortsetzung Tabelle 28

Gruppe	n	Ermittelte Allele und Allelfrequenzen (%)							
<i>BMI225</i> ^{n. s.}									
		236 ¹	244 ¹	246	248	250 ¹	252 ¹	258	260 ¹
Fall	573	1,57	1,05	38,05	41,36	0,70	0,17	16,75	0,35
Kont	570	1,40	1,32	38,16	38,77	1,93	0,09	17,54	0,79
<i>RM106</i> ^{n. s.}									
		134 ¹	138	140 ¹	142	144	146	148 ¹	
Fall	572	0,17	59,97	3,76	24,39	6,64	4,98	0,09	
Kont	570	0,26	58,07	4,82	24,30	6,84	5,70	0,00	

¹seltene Allele, die in Frequenzen unter 5 % der gesamten typisierten Tiere auftraten, wurden zusammengefasst für die statistische Auswertung mit χ^2 -Test

n. s.: nicht signifikant (p>0,05)

4.3 Kandidatengene

4.3.1 Natural Resistance associated Macrophage Protein 1 (*NRAMP1*)

4.3.1.1 PCR und Sequenzierung

Für das *NRAMP1*-Gen wurde eine PCR (Primerpaar *NRAMP1-1065_F*, *NRAMP1-In6_R*) etabliert, die den Genbereich zwischen dem Intron 4 und 6 abdeckte. Durch Sequenzierung konnte das PCR-Produkt von 833 bp verifiziert werden, das Teile des Introns 4 und 6 sowie Intron 5 und Exons V und VI komplett enthält. Die Analyse der Sequenzen verschiedener Rinder ergab Varianten an den Positionen E5(+103), E5(+163) sowie E5(+165), Referenz GenBank AY398762.

Tabelle 29: Identifizierte Sequenzvarianten im Intron 5 des *NRAMP1*-Gens

Tier	Rasse	E5(+103)	E5(+163)	E5(+165)
Liane	Jersey	tt	gg	ag
Anneliese	Jersey	tt	gg	aa
S3	Brown Swiss	tt	gg	ag
S5	Brown Swiss	tt	gg	ag
ND 7	N'Dama	tt	gt	gg
ND 13	N'Dama	ct	gg	ag

Zwei der gefundenen Sequenzvarianten zeigten sich in Proben der Rasse Brahman (*Bos indicus*) sowie N'Dama (Tabelle 29), der Polymorphismus an Position 165 im Intron 5 des

NRAMP1-Gens wurde in Proben der Rassen Jersey, Brown Swiss und N'Dama identifiziert und zur Etablierung einer Genotypisierungsmethode ausgewählt. In den Exons V und VI konnten keine Polymorphismen identifiziert werden.

4.3.1.2 Darstellung des Basenaustausches *NRAMP1* E5(+165) mittels PCR-RFLP

Im Bereich des Polymorphismus konnte mittels computergestützter Analyse der Sequenz keine natürliche Erkennungssequenz für Restriktionsendonukleasen identifiziert werden. Durch eine künstlich eingefügte Basenfehlpaarung (ACRS) im Vorwärtsprimer entstand eine Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease *TaqI* (Erkennungssequenz 5'-T^aCGA-3'), sofern ein g an der Position 165 vorhanden war. Die Primer (BT *NRAMP1*-RFLP_F und BT *NRAMP1*-RFLP_R) wurden entsprechend ausgewählt, um ein Fragment von 150 bp zu amplifizieren (Abbildung 6). Die Restriktionsspaltung ergab bei Tieren mit E5(+165) aa ein ungeschnittenes Fragment von 150 bp, bei homozygoten Proben für g ein 125 bp großes Fragment sowie ein Fragment von 25 bp. Heterozygote Tiere (ag) zeigten Fragmente von 150, 125 und 25 bp. Aus technischen Gründen werden die 25 bp-Fragmente auf dem Agarosegel nicht dargestellt, sie sind aber auch nicht diagnostisch relevant (Abbildung 7).

```

                                     a
1  tgaccaatctgccagatggggaaacacagaccagatatgtaaTcgacttgctgcaaat
61  cagacagatggttggtcatcttgcaggcttcaatactgcagccccaagctccctaccacgc
121  tggccccctgccagcatggaggtgccatttaggtctccagcaccctggctccccctctc

```

Abbildung 6: Sequenz des durch die Primer BT *NRAMP1*-RFLP_F und BT *NRAMP1*-RFLP_R begrenzten PCR-Produkts im Intron 5 des *NRAMP1*-Gens.

Die Primerpositionen sind in Fettdruck dargestellt, die eingefügte Fehlpaarung in Großbuchstaben. Die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *TaqI* ist unterstrichen. Der Basenaustausch ist in der oberen Zeile angegeben (g>a).

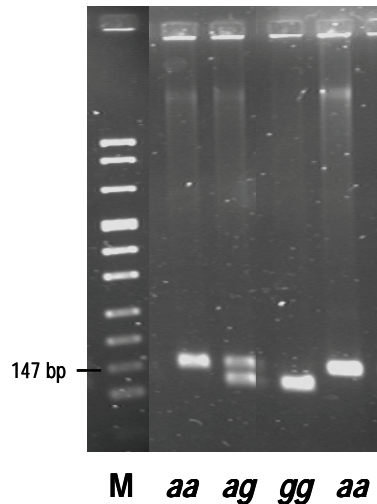


Abbildung 7: Darstellung von bovinen *NRAMP1* E5(+165)-Genotypen durch PCR-RFLP-Analyse mit Agarosegelelektrophorese; M, pUC Größenmarker 8.

4.3.2 Toll-like Receptor 4 (*TLR4*)

4.3.2.1 PCR und Sequenzierung

Es wurde unter Verwendung der Primer *TLR4*-Exon III_F und *TLR4*-Exon III_R ein 990 bp großes Fragment des Exon III des *TLR4* (GenBank AY297043) durch PCR amplifiziert. Über PCR-Direktsequenzierung konnten drei Nukleotidaustausche bei Rindern verschiedener Rassen, jedoch nur in heterozygoter Form identifiziert werden (Tabelle 30). Durch Klonierung und Sequenzierung des PCR-Produktes (ND 13) wurden die Austauschungen verifiziert. Nur die Variante an Position 1040 der mRNA (GenBank AY297040) führt zu einem Aminosäureaustausch (Substitution der aliphatischen Aminosäure Alanin (mögliche Codons gct, gcc, gca, gcg) mit der sauren Aminosäure Glutaminsäure (mögliche Codons gaa, gag).

Tabelle 30: Durch Sequenzanalyse ermittelte Sequenzvarianten an Pos. 1040, 1119 und 1167 (mRNA-Referenzsequenz GenBank AY297040) im Exon III des *TLR4*-Gens.

Tier	Rasse	Pos. 1040	Pos. 1119	Pos. 1167
OARV 2	Ostanatolisches Rotvieh	cc	ag	gt
Bh 151	Brahman	ac	ag	tt
Bh 157	Brahman	ac	gg	gt
ND 13	N'Dama	cc	ag	gt

4.3.2.2 Nachweis des Basenaustausches *TLR4* E3+1040 durch PCR-RFLP

Die Analyse der Sequenz des gefundenen Austausches *TLR4* E3+1040 (Kapitel 4.3.2.1) ergab eine natürliche Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *HpyCH4V*. Es wurde

jedoch durch eine Basenfehlpaarung im Rückwärtsprimer eine künstliche Schnittstelle (ACRS) eingefügt, die bei Vorhandensein des c-Allels an Pos. 1040 eine Schnittstelle für das Enzym *Pst*I ergab (Abbildung 8).

```

1  atagcgtacttggacaaaattctcaggggacgatacagacttatttaattgtttgcaaat
61  gtttctgtgatttctctggtgagtatatcttaggaagtctacaagcccttcttaaagat
    a
121  tttagatggcaacacttagaaattattaactgtgactttgacaagtttctgcaGtgaag
181  ctcagttctctcaaaaagtttgttttcacagacaacaagatataagcacttttactgag
    
```

Abbildung 8: Sequenz des 188 bp großen PCR-Produkts zur Darstellung der Sequenzvariante *TLR4* E3+1040.

Die Lokalisation der Primer ist fett gedruckt, die eingefügte Fehlpaarung in Großbuchstaben. Die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *Pst*I ist unterstrichen. Der Basenaustausch ist in der Zeile oberhalb angegeben (c>a).

Die Restriktionsspaltung (Abbildung 9) ergab Fragmente von 158 und 30 bp für das c-Allel. Heterozygote Proben weisen Fragmente von 188, 158 und 30 bp auf. Bei Durchführung der Typisierung in Teilen der Fall- und Kontrollgruppe (n = 192) erwies sich die untersuchte Position jedoch als monomorph und daher nicht für Assoziationsstudien geeignet. Sie wurde daher nicht weiter untersucht.

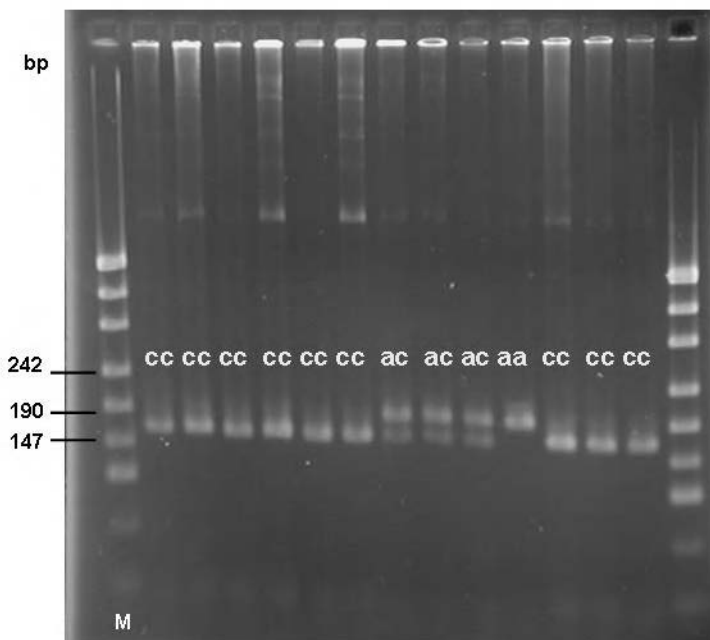


Abbildung 9: Darstellung von Genotypen an *TLR4* E3+1040 durch PCR-RFLP-Analyse und Agarosegelelektrophorese; M, pUC Größenmarker 19.

4.3.2.3 Nachweis des Basenaustausches *TLR4* E3+2021 durch Tetra-Primer Amplification-Refractory-Mutation-System-PCR

Die Schätzung der Genotyp- und Allelfrequenzen des Basenaustausches an Position 2021 (GenBank AY297040) des Exon III des *TLR4* erfolgte bei 1020 Tieren der Fall- und Kontrollgruppe mittels Tetra-Primer Amplification-Refractory-Mutation-System-PCR (Tetra-Primer ARMS). Heterozygote Tiere zeigen Fragmente von 380 (c-Allel) und 272 bp (t-Allel), homozygote entsprechend ein Fragment. Das Fragment der Outer Primer (600 bp) wird zur Kontrolle der Reaktion immer mit amplifiziert. Abbildung 10 zeigt Genotypen an Position E3+2021, die bei der Typisierung der Fall- und Kontrollgruppe dargestellt wurden.

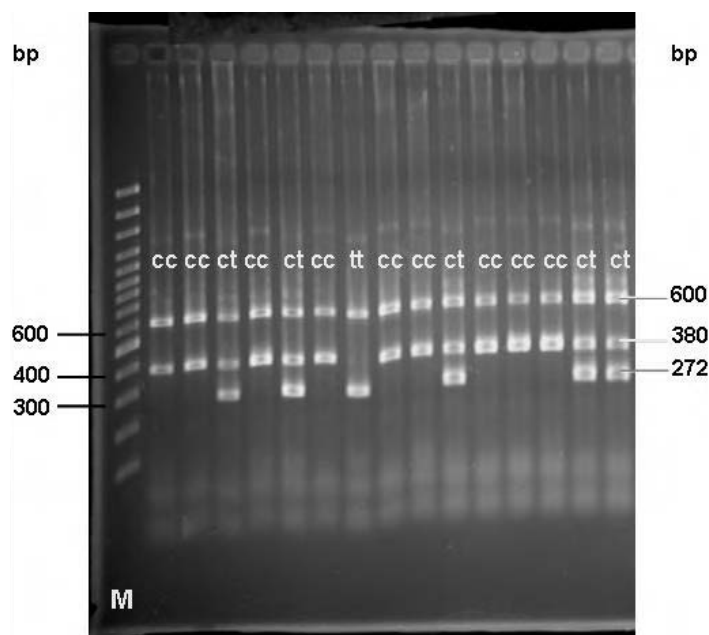


Abbildung 10: Nachweis der Genotypen an *TLR4* E3+2021 c>t durch Tetra-Primer ARMS-PCR und nachfolgende Auftrennung der Fragmente im 1,5%igen Agarosegel, M, Marker Gene Ruler 100+.

rechts: Größen der PCR-Fragmente

4.3.3 Caspase Recruitment Domain Family, Member 15 (*CARD15*)

4.3.3.1 Vergleich ausgewählter Bereiche der bovinen *CARD15*-Proteinsequenz mit Sequenzen anderer Spezies

Nach einer Gegenüberstellung der *CARD15*-Proteinsequenzen des Menschen (GenBank Acc.Nr. CAC42117) und des Rindes (GenBank AAS09826) mit dem Programm GeneDoc, Version 2.6.002 (Homologie 81 %) wurden die Exons von *Homo sapiens* und *Bos taurus* verglichen.

Das Sequenzalignment ergab eine Übereinstimmung des humanen Exon II mit Exon III des Rindes (Identität 88 %, beide 106 bp), des Exons III *Homo sapiens* mit Exon IV *Bos taurus* (Identität 83 %, beide 1816 bp), Exon IV *Homo sapiens* mit Exon V *Bos taurus* (Identität 85 %, beide 84 bp), Exon V *Homo sapiens* mit Exon VI *Bos taurus* (Identität 89 %, beide 84 bp), Exon VII *Homo sapiens* mit Exon VIII *Bos taurus* (Identität 96 %), Exon VIII *Homo sapiens* mit Exon IX *Bos taurus* (Identität 84 %), Exon IX *Homo sapiens* mit Exon X *Bos taurus* (Identität 84 %), Exon X mit Exon XI des Rindes (Identität 86 %) sowie des menschlichen Exon XI mit dem bovinen Exon XII (Identität 79 %).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden Primer für die PCR-Amplifikation der Exons II, IV und VIII sowie des die Introns 10 bis 11 abdeckenden Genbereichs des Kandidatengens *CARD15* entwickelt.

4.3.3.2 PCR und Sequenzierung

Exon II

Für Exon II gelang unter Verwendung der Primer *CARD15-Exon II_F* und *_R* die Darstellung eines 695 bp großen PCR-Produkts, dessen Identität mittels Sequenzierung bestätigt werden konnte.

Die Sequenzanalyse von 14 Tieren der Rasse Dt. Holstein sowie je einem Tier der Rassen Anatolisches Schwarzvieh, Dt. Fleckvieh, Pinzgauer, Gelbvieh, Dt. Angus, Dt. Schwarzbuntes Niederungsrind und Jersey sowie von zwei Tieren der Rasse N'Dama ergab mit der Referenzsequenz (GenBank AY518739) zu 100 % identische Sequenzen

(Abbildung 11).

Hier trugen gleichermaßen alle Tiere den homozygoten Genotyp *gg* an der Position des SNP *CARD15 E2(-32)*, daher wurde auf die Untersuchung zusätzlicher Proben verzichtet.

```

1  ccttgcatggcaggcagattcttaaccactgaaccaccaaggaagtcataaacctgtta
61  aaccaggcatgacgcatagatgtgggagccaggggccttaatttaattcctggctgcttc
121 agactctctgtgagaccacaagccagtttgccctctctgggcctcagtttgaacacctgt
181 acaatggggagcttgccttgggtgctgagggtacagccgtggctggcttggctctcaggg
241 ggggcagacttgcctctccactaccctccgctgctttctgagaagccctgcctgacc
301 tcattctcctcccagattgtgaaatgtgcgcacagatgcttttcagacacagagaagcc
361 aactggtggagttgctggtctcggggtccctggagggccttgagagtattctggaccggc
421 tgctttcccggaagtcctctcctgggaggactatgaggggcttagcctcgtggggcagc
481 ccatctcccacttggccaggcgcctcctggacaccatctggaataagggacttggggct
541 gtgaacaactgactgcagctgtgctgggagggccaggccgacagccagcccccgagcttc
601 ccagctcctgggacccccactcaccacaccagcccgtgacctgcagagtcaccgaccag
661 ccattgtcaggagactctacggccacgtggaggggtgtgctggacctgacacagcagcggg
721 gtttcatcagccagctacgaaactgatgaaatcaggcggcccatcttcacttcatcccagc
781 ggtaagcacttccctctaagcacttttcagaggaaaagtgtgcttagttactgagacta
841 gttcatgaaatcaggcctgtggggagatgtgggtcatagtcctcctcctttaaaggtgcg
901 tgggtgtgtgcatgcatgtgtgt

```

Abbildung 11: Sequenz des 695 bp großen PCR-Produkts zur Darstellung des *CARD15* Exon II (grau unterlegt) und dessen flankierender Intronsequenzen beim Rind.

unterstrichen: Position des SNP *CARD15* E2(-32), Primerpositionen sind fett gedruckt

Exon IV

Für einen 794 bp großen Bereich des Exon IV sowie von Teilen des Intron 3 des *CARD15*-Gens, den das Primerpaar *CARD15*-Exon IV_F/*CARD15*-Exon IV_R flankierte, wurden eine PCR etabliert und die PCR-Produkte sequenziert. Die Sequenz des PCR-Produkts ist in Abbildung 12 aufgezeigt.

Sequenzvarianten an fünf Nukleotidpositionen konnten in der Vergleichsgruppe identifiziert werden, drei davon bei Tieren der Rasse Brahman (*Bos indicus*). An Position E4(-16) unterschieden sich alle untersuchten Tiere (n = 20) bis auf ein Tier der Rasse Brahman (Bh 187) durch einen g→t-Austausch von der Referenzsequenz (GenBank AY518741). Ein SNP an Position 921, bezogen auf die mRNA-Referenzsequenz (GenBank AY518737), wurde

ERGEBNISSE

		1190
CARD15Ex4 PCR794	<u>ggccccgaccttggccccagacgtcttccaggtcctccttgaccaccctgagcgcacct</u>	
Bh_187	-----	
Bh_171	-----	
D_13	-----	
D_16	-----	
		1250
CARD15Ex4 PCR794	<u>tcttaacctttgatggctttgatgagttcaggttcaggttcacggatcaggagcgtcact</u>	
Bh_187	-----	
Bh_171	-----	
D_13	-----	
D_16	-----	
		1310
CARD15Ex4 PCR794	<u>gctgtccgaccgccccacgtcagtcagagtcctgctcttcaaccttctgcagggcaacc</u>	
Bh_187	-----	
Bh_171	-----	
D_13	-----	
D_16	-----	
		1370
CARD15Ex4 PCR794	<u>tgctaaagaatgcccgcaaggtgttgaccagccgccccagcgcggtatcggcgagcctcc</u>	
Bh_187	-----	
Bh_171	-----	
D_13	-----	
D_16	-----	
		1430
CARD15Ex4 PCR794	<u>gaaagcacgtgcgcacggaactcagcctcaagggcttctcggaagagggcatcga<u>actgt</u></u>	
Bh_187	-----	
Bh_171	-----	
D_13	-----	
D_16	-----	
		1457
CARD15Ex4 PCR794	<u>acctgaggaagcggcatcgcgagcctg--</u>	
Bh_187	-----	
Bh_171	-----	
D_13	-----	
D_16	-----	

Abbildung 12: Sequenz des 749 bp großen, durch die Primer CARD15-Exon IV_F und_R (Positionen unterstrichen) begrenzten PCR-Produkts des *CARD15*.

Die Primersequenz von CARD15-ExonIV_F und_R ist in Normalschrift und unterstrichen dargestellt, die Position der Primer CARD15ExIV-RFLP+271_F/_R, welche für die Typisierung durch PCR-RFLP verwendet wurden, ist in der Sequenz fett gedruckt. Die Position der ermittelten Sequenzvarianten ist in Fettdruck dargestellt, in Normalschrift gedruckte Ziffern zeigen die Position in der mRNA-Referenzsequenz (GenBank AY518737). Der Beginn des Exon IV ist grau unterlegt. Das für Arginin codierende Basentriplett ist mit * aufgezeigt. Die Erkennungssequenz für das Enzym *NlaIII* ist jeweils unterstrichen und kursiv herausgestellt.

Intron 10

Im Intron 10 des *CARD15* wurde durch PCR-Direktsequenzierung ein SNP an Position E11(-14) (a>g) bei Tieren der Rassen Gelbvieh und Pinzgauer (heterozygot) sowie Anatolian Black (homozygot gg) ermittelt. Die Sequenz des PCR-Produktes ist im Anhang Abbildung A dargestellt.

4.3.3.3 Nachweis der Basenaustausche im *CARD15*-Gen

4.3.3.3.1 Darstellung des SNP E4+921 in Exon IV durch PCR-RFLP

Zum Nachweis des Nukleotidaustausches wurde ein PCR-RFLP unter Verwendung des Enzyms *Nla*III entwickelt. Das Primerpaar *CARD15* ExIV-RFLP+271_F/_R begrenzte ein 220 bp großes PCR-Produkt, in dem eine Testschnittstelle zum sicheren Nachweis der Enzymaktivität, die eine Bande von 127 bp im Agarosegel erbrachte, lag. Die Restriktionsspaltung (Abbildung 13) ergab zusätzlich Fragmente von 61 bp und 32 bp (homozygot aa), 93 bp (homozygot gg) und 93 bp, 61 bp und 32 bp (heterozygot ag), siehe Abbildung 13.

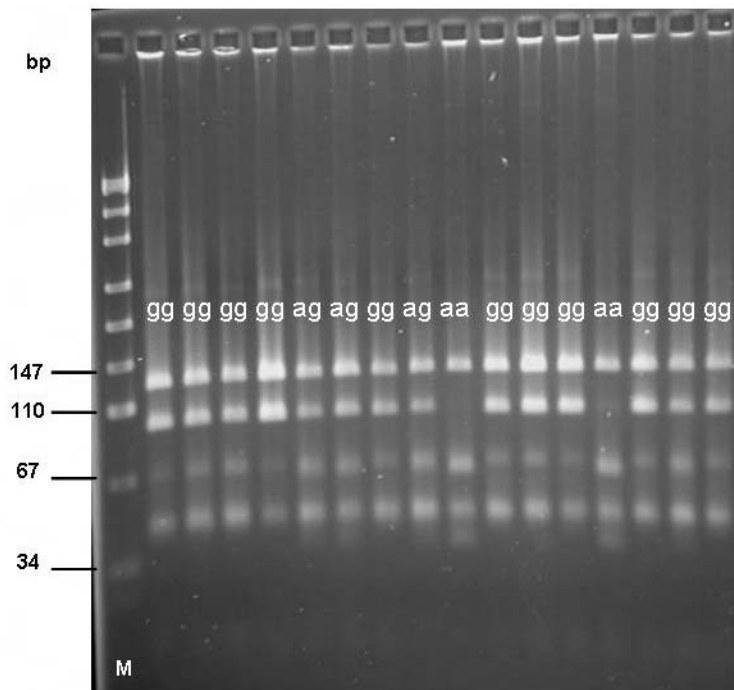


Abbildung 13: Darstellung der Varianten an Position 921 im Exon IV des *CARD15*-Gens durch PCR-RFLP-Analyse und Agarosegelelektrophorese

M, pUC Größenmarker 19.

4.3.3.3.2 Darstellung des SNP E11(-14) im Intron 10 durch PCR-RFLP-Analyse

Unter Verwendung der Primer *CARD15*-In10_F3/ *CARD15*-In10_R5 wurde eine PCR etabliert, die ein 137 bp großes Produkt amplifizierte. Der Vorwärtsprimer wurde modifiziert, um eine artifizielle Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Taa*I zu schaffen (Abbildung 14).

```

61 caggagtccagctcccaaagtctcctttaattgaatagactagcccaaaaccaagcatcc
      a
121 tcaaagttcaccatActgtcttcctctcttaggctgtctaacaaccacatcagctccctag
181 gggcagagggcctcctcgccggcccttgaaaagaatgacaccattctggaaggtctggtaag
241 atcctgggcaggcctctttaacctctctgagcctcagttttccaacgtataacttgaggt
    
```

Abbildung 14: Sequenz des durch BT_ CARD15-In10_F3 und BT_ CARD15-In10_R5 begrenzten PCR-Produkts im Intron 10 des *CARD15*-Gens.

Die Primerpositionen sind in Fettdruck dargestellt, die eingefügte Fehlpaarung in Großbuchstaben. Die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *TaaI* ist unterstrichen, die häufigere Variante (a>g) ist in der Zeile darüber dargestellt.

Die Darstellung der Genotypen durch PCR-RFLP-Analyse und Agarosegelelektrophorese zeigt Abbildung 15. Bei heterozygoten Tieren (ag) entstehen Fragmente von 137, 113 und 24 bp; bei Homozygoten (aa) ein Fragment von 137 bp, bei Homozygoten (gg) Fragmente von 113 bp und 24 bp gekennzeichnet. Das Fragment von 24 bp ist aus technischen Gründen nicht immer darstellbar, jedoch für die Diagnose auch nicht relevant.

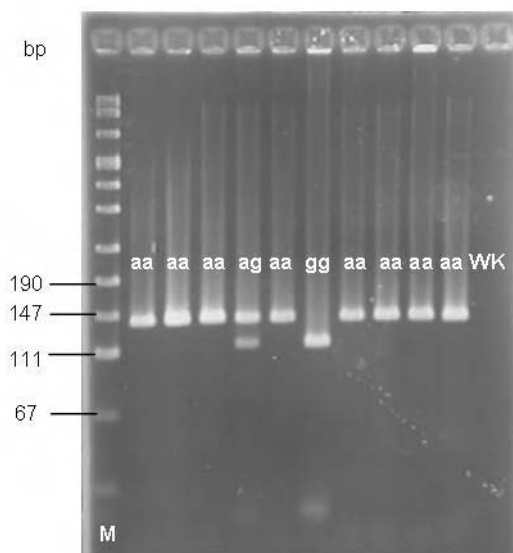


Abbildung 15: Nachweis der Varianten an Position *CARD15* E11(-14) durch PCR-RFLP-Analyse und Agarosegelelektrophorese.

Heterozygote Tiere (ag) zeigen Fragmente von 137, 113 und 24 bp; homozygote (aa) zeigen ein Fragment von 137 bp, homozygote (gg) sind durch Fragmente von 113 bp und 24 bp gekennzeichnet. M, pUC Größenmarker 8; WK, Negativkontrolle ohne DNA.

4.3.4 Interleukin 2 (*IL2*)

Proben der Vergleichsgruppe wurden bezüglich der drei *IL2*-Polymorphismen *IL2*In2+148, *IL2*In2+28 Ins [aattt] und *IL2*Promotor-146 genotypisiert.

Nur ein SNP (*IL2*In2+148) konnte in der Vergleichsgruppe nachgewiesen werden. Damit war er geeignet für Assoziationsstudien an Proben von MAP-positiven und -negativen Rindern. Die Genotypisierung erfolgte durch PCR-RFLP-Analyse mit der Restriktionsendonuklease *Hae*III mittels Elektrophorese von fluoreszenzfarbstoffmarkierten PCR-Fragmenten am A.L.F.*express*.

4.3.5 Gata-binding Protein 3 (*GATA 3*)

4.3.5.1 PCR und Sequenzierung

Basierend auf der bovinen mRNA-Sequenz wurde nach Vergleich mit der Genstruktur des humanen *GATA3* eine PCR zur Amplifikation des fünften Exons und der 3'UTR des *GATA3* etabliert und die PCR-Produkte sequenziert. In der 3'UTR wurde ein Basenaustausch (a>t) identifiziert.

4.3.5.2 Nachweis des Basenaustausches durch PCR-RFLP

Nach Entwicklung neuer Primer (*GATA3* BT Ex5_F2 und *GATA3* BT 3'UTR_R2, siehe Abbildung 16) wurde eine PCR-RFLP-Analyse mit einer Schnittstelle für das Enzym *TaaI* etabliert, die Fragmente von 268 bp (t-Allel), 211 und 57 bp (a-Allel) bzw. bei heterozygoten Proben alle drei Fragmente ergab (Abbildung 17).

```

1  tccttcggacctcaccacccttccagtatggtcaccgccatgggctagggtcacctgctcg
61  agcaccgctcacagggtccaggcgagagtctctccggcccccttctacatgcattttc
121  gcaggagcagtatcatgaaaccgaaaccgatggatctgtgtgttttgcaggcatcaag
181  caacctgatgttgtggcactcggacgaecgcagcctaccgtgggtgtctgtgttctcactc
241  cccgaatctggatcccatttgtgaataagccattcagactcacattc

```

Abbildung 16: Sequenz des durch *GATA3* BT Ex5_F2 und *GATA3* BT 3'UTR_R2 begrenzten PCR-Produkts in der 3'UTR des *GATA3*.

Die Lokalisation der Primer ist in Fettdruck dargestellt. Die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *TaaI* ist unterstrichen. Die Sequenzvariante ist in der Zeile darüber dargestellt.

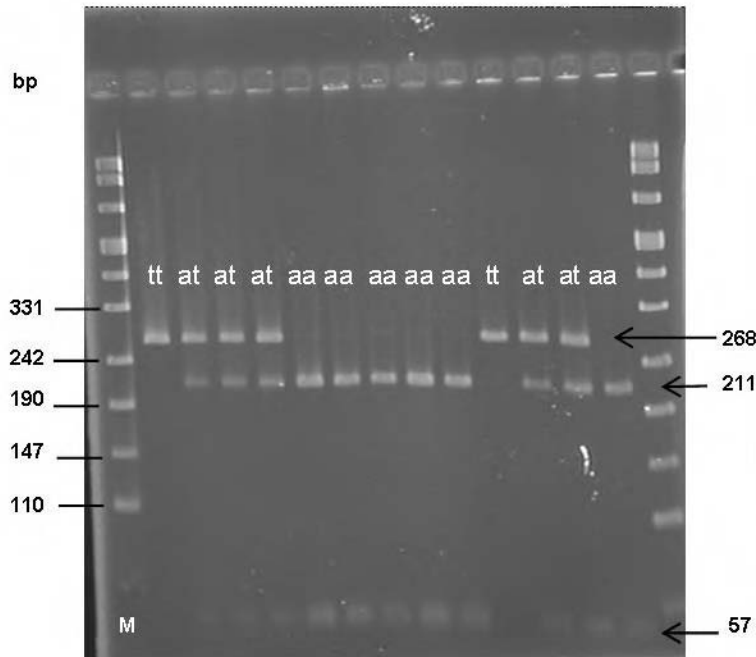


Abbildung 17: Darstellung der Genotypen im *GATA3* durch PCR-RFLP-Analyse.

Fragmente von 268 bp repräsentieren das t-Allel, Fragmente von 211 und 57 bp repräsentieren das a-Allel. Für a- und t-Allel mischerbige Proben ergaben alle drei Fragmente; M, pUC Größenmarker 8.

4.3.6 Vergleichende *In-silico*-Analyse von Polymorphismen

Die Bedeutung des gefundenen, nicht synonymen Aminosäureaustausches R258H im *CARD15* des Rindes wurde vergleichend zu den Austausch R675W und G881R im menschlichen Protein *in silico* mittels SIFT-Software und der BLOSUM62-Matrix untersucht (Tabelle 31).

Zu diesem Zweck wurden die Proteinsequenzen von Hausrind (*Bos taurus*), Buckelrind (*Bos indicus*), Bison (*Bison bison*), Hund (*Canis familiaris*), Mensch (*Homo sapiens*), Schimpanse (*Pan troglodytes*), Lisztaffe (*Saguinus oedipus*), Hausmaus (*Mus musculus*) und Ratte (*Rattus norvegicus*) abgeglichen. Für den Austausch R258H wurde ein SIFT-Score von 0,61 ermittelt. Dem Wert 0 unter Verwendung der BLOSUM62-Matrix folgend, handelt es sich um einen konservativen Aminosäureaustausch.

Die Analyse der flankierenden Sequenz des SNP *CARD15* E11(-14) mit dem Programm TFSEARCH ergab, dass ein potenzielles Sequenzmotiv („WGATAR“) für die Transkriptionsfaktoren GATA-2 und GATA-3 nur dann besteht, wenn das häufiger auftretende Allel „A“ an dieser Position vorhanden ist, nicht jedoch bei Allel „G“ (Abbildung 18). Der Aminosäureaustausch *NRAMP1* E5(+165) hatte keinen Einfluss auf Sequenzmotive für Transkriptionsfaktoren.

Tabelle 31: Eigenschaften von Aminosäureaustauschen im CARD15 unter Vergleich der Spezies *Bos taurus*, *Bos indicus*, *Bison bison*, *Canis familiaris*, *Homo sapiens*, *Pan troglodytes*, *Saguinus oedipus*, *Mus musculus* und *Rattus norvegicus*.

Spezies	Aminosäure-austausch	Evolutionäre Konservierung ^a									SIFT-Wert ^b	BLOSUM62-Wert ^c
		<i>Bos taurus</i>	<i>Bos indicus</i>	<i>Bison bison</i>	<i>Canis familiaris</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>Pan troglodytes</i>	<i>Saguinus oedipus</i>	<i>Mus musculus</i>	<i>Rattus norvegicus</i>		
<i>Bos taurus</i>	R258H	R	R	R	C	P	P	P	H	H	0,61	0
<i>Homo sapiens</i>	R675W	R	R	R	R	R	R	Q	Q	Q	0,00	3
<i>Homo sapiens</i>	G881R	G	G	G	G	G	G	G	G	G	0,00	2

^a Die evolutionäre Konservierung zwischen den Spezies wurde durch das Alignment verschiedener Proteinsequenzen untersucht. Jeder Buchstabe steht für die Aminosäure an der Position des jeweiligen Austausches im Protein der Spezies *Bos taurus*, *Bos indicus*, *Bison bison*, *Canis familiaris*, *Homo sapiens*, *Pan troglodytes*, *Saguinus oedipus*, *Mus musculus* und *Rattus norvegicus* in der entsprechenden Reihenfolge.

^b SIFT-Scores < 0,08 deuten an, dass die Proteinfunktion durch den Austausch beeinträchtigt wird.

^c positive BLOSUM62-Werte deuten konservative Aminosäureaustausche an, negative Werte nicht konservative Austausche.

```

5' catcctcaaagttcaccattctatacttctctctctaggetgtctaacaaccacatc 3'
3' gtaggagtttcaagtggtaagatagaaggagagatccgacagattggttgtag 5'

```

Abbildung 18: Von der DNA-Variante *CARD15* E11(-14) a>g betroffenes Sequenzmotiv (unterstrichen) für die potentiell bindenden Transkriptionsfaktoren.

Die Position des Basenaustausches ist in Fettdruck dargestellt, der Beginn des Exon XI ist hellgrau unterlegt.

4.3.7 Zusammenfassung der Nachweismethoden

Im Folgenden sind alle durchgeführten Methoden zusammenfassend dargestellt. Alle dargestellten SNPs sind benannt nach ihrer Position in der jeweiligen originalen mRNA-GenBank-Sequenz (z. B. *TLR4* E3+2021). Für Basenaustausche, die in flankierenden Introns identifiziert wurden, erfolgte die Benennung in Relation zu dem nächstliegenden Exon. So bezeichnet z. B. E5(+165) einen SNP, der 165 Basen stromabwärts der letzten Base des

Exon V im darauf folgenden Intron liegt, E11(-14) einen SNP, der 14 Basen stromaufwärts der ersten Base des Exon XI im vorigen Intron liegt.

Durch Direktsequenzierung von PCR-Produkten ermittelte Sequenzvarianten, die sich bei der Rasse Dt. Holstein als nicht polymorph erwiesen, sind ebenfalls aufgeführt, wurden aber nicht für Assoziationsstudien verwandt.

Tabelle 32: Zusammenfassung der etablierten Screeningmethoden für DNA-Varianten in Kandidatengenem.

Gen	Genbereich	Position	Sequenz-variante	Screeningmethode	typisierte Proben (n =)
<i>NRAMP1</i>	Intron5	E5(+165)	SNP, a>g	PCR-RFLP (ACRS)	1082
<i>TLR4</i>	Exon III	+1040	SNP, c>a	PCR-RFLP (ACRS)	192 ¹
	Exon III	+2021	SNP, c>t	Tetra ARMS	906
<i>CARD15</i>	Intron1	E2(-32)	SNP, g>a	Sequenzierung	23
	Exon IV	+921	SNP, g>a	PCR-RFLP	1145
	Intron10	E11(-14)	SNP, a>g	PCR-RFLP (ACRS)	1121
<i>IL2</i>	Promotor	-146	SNP, a>g	PCR-RFLP	192 ¹
	Intron2	+148	SNP, t>c	PCR-RFLP (ACRS)	1132
	Intron2	+28	Ins aattt	Fragmentlängenanalyse	192 ¹
<i>GATA3</i>	3'UTR	168	SNP, a>t	PCR-RFLP	1129

E5(+165) bezeichnet einen SNP, der 165 Basen stromabwärts der letzten Base des Exon V liegt, E11(-14) einen SNP, der 14 Basen stromaufwärts der ersten Base des Exon XI liegt.

¹Sequenzvarianten, die bei der Rasse Dt. Holstein nicht polymorph waren. Es konnten mit diesen SNPs keine Assoziationsstudien durchgeführt werden.

4.3.8 Allel- und Genotypfrequenzen

Tabelle 33 und Tabelle 34 zeigen die Allel- und Genotypfrequenzen der untersuchten SNPs in der MAP-positiven Gruppe und in der Kontrollgruppe.

Die Gesamtanzahl der typisierten Proben entspricht nicht exakt der Anzahl der Tiere in der Fall- und Kontrollgruppe, da nicht immer von allen DNA-Proben ein Amplifikat gewonnen werden konnte. Es handelte sich hierbei um verschiedene Proben.

Bei den Kandidatengenem *NRAMP1* sowie *CARD15* (SNP im Exon IV) lag das seltene Allel jeweils in sehr niedriger Frequenz vor (1,89 % bzw. 5,64 % in der Fallgruppe und 1,43 % bzw. 3,78 % in der Kontrollgruppe), wobei im *CARD15*-Gen das Allel a statistisch signifikant häufiger bei den MAP-positiven Rindern (5,64 %) als in der Kontrollgruppe (3,78 %) auftrat ($p < 0,05$).

Die Allele der untersuchten Basenaustausche *TLR4* E3+2021, *CARD15* E11(-14), *IL2* In2+148 und *GATA3* 3'UTR 168 wiesen mittlere Allelfrequenzen auf (Tabelle 33).

ERGEBNISSE

Tabelle 33: Allelfrequenzen (%) der untersuchten Basenaustausche in den einzelnen Kandidatengenomen in der Fall- (MAP-positive) und Kontrollgruppe (MAP-negative) und Anzahl untersuchter Proben (gesamt) sowie berechnete Signifikanzen.

Untersuchte Sequenzvariante	Status	Allelfrequenz		gesamt (n)	Signifikanz
<i>NRAMP1</i> E5(+165)	MAP-negativ	a	g	525	n. s.
	MAP-positiv	0,0143	0,9857		
<i>TLR4</i> E3+2021	MAP-negativ	c	t	475	n. s.
	MAP-positiv	0,8274	0,1726		
<i>CARD15</i> E4+921	MAP-negativ	a	g	569	*
	MAP-positiv	0,0378	0,9622		
<i>CARD15</i> E11(-14)	MAP-negativ	a	g	569	n. s.
	MAP-positiv	0,8515	0,1485		
<i>IL2</i> In2+148	MAP-negativ	c	t	558	n. s.
	MAP-positiv	0,1559	0,8441		
<i>GATA3</i> 3'UTR 168	MAP-negativ	a	t	568	n. s.
	MAP-positiv	0,6972	0,3028		
				561	

n. s., nicht signifikant; *, signifikant bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 %

Zwischen den ermittelten Genotypfrequenzen konnten in keinem Fall signifikante Unterschiede nachgewiesen werden. Sie befanden sich für alle untersuchten SNPs im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

Im Intron 5 des *NRAMP1*-Gens war nur ein Tier der Fallgruppe homozygot aa, jedoch keines der Kontrollgruppe. Ein ähnliches Bild zeigte sich bei Auswertung der Varianten in *CARD15* E4+921, die signifikante Allelfrequenzunterschiede aufwies. Hier waren zwei Tiere der positiven Gruppe homozygot für das seltene Allel. Diese Kombination trat in der Kontrollgruppe nicht auf.

ERGEBNISSE

Tabelle 34: Genotypfrequenzen (%) der untersuchten Basenaustausche in den einzelnen Kandidatengenomen in der Fall- (MAP-positive) und Kontrollgruppe (MAP-negative) und Anzahl untersuchter Proben (gesamt) sowie berechnete Signifikanzen.

Untersuchte Sequenzvariante	Status	Genotypfrequenz			gesamt (n)	Signifikanz
<i>NRAMP1</i> E5(+165)	MAP-negativ	aa	ag	gg	525	n. s.
	MAP-positiv	0,0019	0,0248	0,9733	525	
<i>TLR4</i> E3+2021	MAP-negativ	0,0000	0,0377	0,9623	557	n. s.
	MAP-positiv	0,0000	0,0377	0,9623	557	
<i>TLR4</i> E3+2021	MAP-negativ	cc	ct	tt	475	n. s.
	MAP-positiv	0,6779	0,2989	0,0232	475	
<i>CARD15</i> E4+921	MAP-negativ	0,6822	0,3016	0,0162	431	n. s.
	MAP-positiv	0,6822	0,3016	0,0162	431	
<i>CARD15</i> E4+921	MAP-negativ	aa	ag	gg	569	n. s.
	MAP-positiv	0,0000	0,0756	0,9244	569	
<i>CARD15</i> E11(-14)	MAP-negativ	0,0035	0,1059	0,8906	576	n. s.
	MAP-positiv	0,0035	0,1059	0,8906	576	
<i>CARD15</i> E11(-14)	MAP-negativ	aa	ag	gg	569	n. s.
	MAP-positiv	0,7135	0,2759	0,0105	569	
<i>IL2</i> In2+148	MAP-negativ	0,7029	0,2699	0,0272	552	n. s.
	MAP-positiv	0,7029	0,2699	0,0272	552	
<i>IL2</i> In2+148	MAP-negativ	cc	ct	tt	558	n. s.
	MAP-positiv	0,0233	0,2652	0,7115	558	
<i>GATA3</i> 3'UTR 168	MAP-negativ	0,0383	0,2962	0,6655	574	n. s.
	MAP-positiv	0,0383	0,2962	0,6655	574	
<i>GATA3</i> 3'UTR 168	MAP-negativ	aa	at	tt	568	n. s.
	MAP-positiv	0,4929	0,4085	0,0986	568	
<i>GATA3</i> 3'UTR 168	MAP-negativ	0,4492	0,4563	0,0945	561	n. s.
	MAP-positiv	0,4492	0,4563	0,0945	561	

n. s., nicht signifikant

5 Diskussion

5.1 Zusammenhänge zwischen Milchleistung, Betrieb, Alter und MAP-Status

5.1.1 Milchleistung

In den Laktationsparametern Milchleistung und Proteinmenge ergab sich kein Unterschied zwischen den beiden untersuchten Gruppen. Dies bestätigt nur teilweise die Ergebnisse der Untersuchung von Hendrick et al. (2005b), die die zwar ebenfalls keine Unterschiede in der 305-Tage-Milchleistung von serologisch positiven und serologisch negativen Tieren ermitteln konnten, allerdings eine signifikante Reduktion der Milchproteinmenge. Nordlund und Mitarbeiter (1996) konnten demgegenüber nur eine signifikant geringere Milchmenge bei ELISA-positiven Kühen nachweisen.

Der Parameter Milchfettmenge lag bei der untersuchten Fallgruppe mit 304,2 kg signifikant unter der Fettmenge negativer Kontrolltiere (310,7 kg). Dieser Effekt wurde in der vorgenannten Studie nur mit einer positiven Kotkultur assoziiert. Ein Grund für diese unterschiedlichen Ergebnisse könnte sein, dass in der vorliegenden Arbeit die erste Laktation der Tiere miteinander verglichen wurde, in anderen Studien die letzte abgeschlossene Laktation (Nordlund et al. 1996; Hendrick et al. 2005b). Aufgrund der Tatsache, dass die Infektion im Kälberalter erfolgt und Laktationsnummerneffekte auftreten, erscheint es sinnvoller, die erste Laktation als Grundlage zu verwenden. Das Alter der Kühe unterscheidet sich im vorliegenden Datenmaterial, ebenso die Anzahl der Laktationen, weshalb keine einheitliche Basis bei Vergleich der letzten Laktation vorliegt.

5.1.2 Einfluss von Betrieb und Alter auf den MAP-Status

Die großen Unterschiede serologisch positiver, negativer und verdächtiger Tiere zwischen den Betrieben lassen sich unter anderem durch die unterschiedliche Dauer der laufenden Sanierungsmaßnahmen sowie die initial unterschiedlichen Prävalenzen erklären. Aufgrund der geringen nachgewiesenen Erbllichkeit spielen Umwelteffekte eine große Rolle bei der Entwicklung der Paratuberkulose. Managementfaktoren erscheinen als wichtigster Punkt (vom Schloß 2000; Anonymus 2005), aber auch den Umgebungsbedingungen (Whittington et al. 2003; Raizman et al. 2004) wird eine Bedeutung zugemessen. Die sofortige Trennung des Kalbes vom Muttertier sowie die hygienische Gewinnung von Kolostrum, um die Kontamination mit erregerhaltigem Kot zu verhindern, sind wichtige Faktoren in der Infektionsprophylaxe (Goodger et al. 1996).

Der positive prädiktive Wert der serologischen Tests ist in Herden mit geringer Prävalenz niedriger als in Beständen, in denen eine hohe Prävalenz besteht (Hendrick et al. 2005b). Die in der vorliegenden Untersuchung gefundenen Altersmittelwerte lassen sich anhand der immunologischen Abläufe und des Verlaufs der Paratuberkulose erklären, da die

zellvermittelte Immunantwort im frühen Stadium der Erkrankung dominiert (Stabel 1996; Khalifeh und Stabel 2004a) und somit Antikörperbildung durch die üblichen Testsysteme erst mit zunehmendem Alter der Tiere zu detektieren ist (Jubb und Galvin 2000; Dreier et al. 2006).

5.2 Auswahl der Proben und Tiere für die Assoziationsanalysen

Da für die meisten Tiere nur die Einteilung in negative, verdächtige und positive Tiere vorlag, bot sich der Ansatz einer Fall-Kontroll-Studie an. Es sind mehrere Gründe denkbar, warum trotz der ausreichenden Tierzahlen (Long und Langley 1999; Hirschhorn 2005) keine bzw. nur in einem Fall statistisch signifikante Zusammenhänge zwischen dem MAP-Status der Tiere und Kandidatengenpolymorphismen feststellbar waren.

Der genetische Effekt ist zu gering, um im vorliegenden Probenmaterial erkannt zu werden. Besteht nur ein geringer genetischer Effekt, was aufgrund der geringen Heritabilität zu erwarten ist, so könnte ein Einfluss eines Gens auf den MAP-Status übersehen werden, da nur bedeutende genetische Effekte statistisch nachweisbar sind (Cardon 2006). Dies betrifft vor allem Genvarianten, bei denen Allele in geringen Frequenzen auftreten. Noch größere Tiergruppen würden das Auffinden von relevanten SNPs in Kandidatengenen erleichtern, da die Erhöhung der untersuchten Proben einen bedeutenderen Einfluss hat als die Zahl untersuchter Polymorphismen (Long und Langley 1999). Individuelle Unterschiede betreffen bei den meisten Krankheiten nur wenige Gene, die alle nur geringgradig zur Krankheitsdisposition beitragen (Zondervan und Cardon 2004). Es stellt sich daher die Frage, ob es sich bei einzelnen signifikanten Mutationen tatsächlich um für eine Krankheit empfänglich machende Allele (Disease Susceptibility Alleles, DSAs) handelt. Innerhalb des komplexen Krankheitsgeschehens bei der Paratuberkulose, bei dem auch Umwelt- und Managementfaktoren eine große Rolle spielen, ist die Penetranz einzelner Mutationen gering einzustufen. Dies trifft auch auf multifaktorielle Erkrankungen beim Menschen zu, wie entzündliche Darmerkrankungen (Chacon et al. 2004), Lupus erythematoses (Marshall 2002) oder Typ-II-Diabetes (Marx 2002), die auf keine Mutation in einem einzelnen Gen oder einzelne Umwelteinflüsse zurückgeführt werden können (Kiberstis und Roberts 2002).

Die Problematik bei der Merkmalsdefinition und damit bei der Einteilung in empfängliche bzw. resistente Tiere führte zu einer unbekanntem Anzahl falsch-positiver bzw. falsch-negativer Tiere und verschleierte so mögliche Effekte. In der Fall- wie auch in der Kontrollgruppe sind aufgrund der eingeschränkten Sensitivität der Testsysteme (SVANOVIR™Para-TB Ab ELISA Kit, Svanovir Biotech AB, Uppsala, Schweden oder IDEXX HerdChek® M. pt. Antibody ELISA, IDEXX Laboratories Inc., Maine, USA) sowohl falsch-positive als auch falsch-negative Tiere zu erwarten. Ist diese Verteilung in beiden Gruppen gleich, so wird der Genotypeneffekt unterschätzt und es gehen mögliche Signifikanzen verloren. Gründe hierfür sind, neben der aufgrund mangelnder Sensitivität und Spezifität schwierigen Merkmalerfassung, auch der vermutlich geringe Einzelgeneffekt (Zondervan und

Cardon 2004).

Die Präsenz von Antikörpern gegen MAP zeigt das fortgeschrittene Infektionsstadium an. MAP-Antikörper gelten als nicht protektiv (Chiodini 1996; Clarke 1997; Stabel 2000). Es wurde die Infektion mit MAP für die Auswahl der Proben dieser Studie angenommen, wenn eine Immunantwort (Titeranstieg) zu irgendeinem Zeitpunkt im Leben des Tieres nachweisbar war, basierend auf der Annahme, dass zu irgendeinem Zeitpunkt der Eintritt und eine Reaktion des Immunsystems auf MAP erfolgt sein müssen (siehe auch Nielsen et al. 2002b). Sweeney und Mitarbeiter (2006b) fanden, dass Tiere, deren Infektion im Vorfeld durch Kotkultur nachgewiesen worden war, teilweise erst positive ELISA-Ergebnisse, in darauf folgenden Tests jedoch negative Resultate zeigten. Dies trat unabhängig davon auf, ob die Titerhöhe nahe des Cut-off-Levels lag oder im deutlich positiven Bereich. Alle Tiere wurden jedoch bei weiteren Tests wieder serologisch positiv. In der Untersuchung von Hirst et al. (2002) war die Umkehr in den seronegativen Status bei Tieren mit niedrigeren S/P-Verhältnis wahrscheinlicher als bei Tieren mit höherem Antikörpertiter bei der ersten Beprobung. In der vorliegenden Untersuchung wurden daher Tiere, die mindestens einen positiven ELISA-Test aufwiesen, auch bei einer negativen Nachtestung als positiv eingestuft und blieben so in der positiven Fallgruppe vertreten.

Aufgrund der Beeinflussung von Sensitivität und Spezifität durch die Methode des serologischen Nachweises (Antigenpräparation) ist es möglich, dass die eingesetzten kommerziellen ELISA-Tests jeweils nur einen Teil der infizierten Tiere detektiert haben (Waters et al. 1999; Harris und Barletta 2001; Böttcher und Gangl 2004; Dreier et al. 2006). Da leider keine simultane Testung mit beiden verwendeten Methoden durchgeführt wurde, ist es im Rahmen dieser Studie nicht möglich gewesen, dies an dem vorhandenen Probenmaterial zu verifizieren.

Für die Einstufung aufgrund der Serologie spricht ebenfalls, dass der Antikörpertiter von Kühen mit negativer Kotkultur niedriger ist als der von Kühen mit positiver Kotkultur (Nielsen et al. 2002a) und 98 % der starken bzw. 95 % der schwachen Ausscheider von MAP durch ELISA-Verfahren erkannt werden können (Nielsen und Ersboll 2006).

In der vorliegenden Studie gab es für den Großteil der Kühe keine Angaben über den Status der Ausscheidung mit dem Kot, da nur Tiere mit positivem ELISA auch kotkulturell untersucht werden oder aber den Betrieb verlassen. Sie werden im Regelfall nicht weiter turnusmäßig auf Antikörper gegen MAP getestet. Daher lässt sich bei serologisch negativen Tieren nicht ausschließen, dass es sich um infizierte Tiere handelt, da über die mögliche Ausscheidung des Erregers keine Aussage getroffen werden kann. Jegliches eingesetztes Testverfahren kann zu einem Anteil fehlklassifizierter Proben führen. Eine geringe Spezifität führt hierbei zu vermehrt falsch-positiven Ergebnissen. Entscheidend bei der Einstufung der MAP-Proben ist jedoch allgemein die geringe Sensitivität, die unter anderem vom Stadium der Erkrankung abhängt (Nielsen et al. 2002b). Neben falsch-positiven bzw. falsch-negativen

Testergebnissen bergen schwankende Antikörperspiegel des Tieres und analytische Fehler Probleme in der korrekten Definition des MAP-Status (Sweeney et al. 2006b).

Bedingt durch die Probensammlung liegt nur ein Ergebnis zu einem bestimmten Zeitpunkt im Leben des Tieres vor. Bei älteren Tieren, die mehrfachen Tests unterlagen, entsteht so zwar eine relative Sicherheit über den Status (Spezifität IDEXX-ELISA 94 %, Svanova 76 %), es erlaubt jedoch keine Aussage darüber, ob ein negatives Kontrolltier weiter negativ bleiben wird. Auch bei mehrmaliger negativer serologischer Testung kann spekuliert werden, dass sich das untersuchte Tier in der Phase der dominant zellvermittelten Immunabwehr befand und erst später einen nachweisbaren Antikörpertiter entwickelt. Daher ist nicht auszuschließen, dass diese Tiere sich im Verlaufe weiterer Tests oder auch unter Verwendung anderer Testsysteme als positiv herausstellen (Dreier et al. 2006). Über den Wert wiederholter serologischer Tests bestehen in der Literatur unterschiedliche Ansichten. Laut Sweeney et al. (2006b) steigt hierbei auch die Möglichkeit eines falsch-positiven Ergebnisses, im Gegensatz dazu postulieren Nielsen und Mitarbeiter (2002a), dass wiederholte Tests von Einzeltieren die Sensitivität ohne Verlust von Spezifität erhöhen.

Eine Möglichkeit, das Studiendesign zu verbessern, wäre die Auswahl zweier Kontrolltiere pro positiver Kuh, analog zu Gonda et al. (2007), da hierbei die geringe Sensitivität (hohe Rate an falsch-negativen Tieren) besser ausgeglichen würde. Im vorliegenden Probenmaterial war dies nicht möglich, da nicht genügend Tiere gleicher väterlicher Abstammung, gleichen Alters und gleicher Herkunft vorhanden waren. Ein anderer Weg läge in der monatlichen serologischen Testung der Tiere, die bei unter vierjährigen Kühen in einer um 19 % erhöhten Wahrscheinlichkeit, Antikörper zu detektieren, resultiert und damit zu einer klareren Struktur der Kontrollgruppe führen würde (Nielsen und Ersboll 2006).

Da sämtliches Probenmaterial unter Feldbedingungen gewonnen wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass negative Tiere im Kälberalter keinen Erregerkontakt hatten und daher nicht die Chance hatten, sich zu infizieren. Diese würden fälschlich als resistent betrachtet. Negativ getestete Tiere können resistent sein, empfänglich aber nicht dem Erreger ausgesetzt (Taylor et al. 2006), sowie falsch-negativ aufgrund des Testverfahrens. Da durch die Berücksichtigung des Alters der Tiere eine gleich hohe Wahrscheinlichkeit des Antigenkontakts im relevanten Zeitraum *post natum* bestand, ist dieser Faktor zwar berücksichtigt worden, dennoch gibt es keinen Nachweis für erfolgten Antigenkontakt bei den negativen Kontrolltieren.

Die sichere Einstufung des Einzeltiers ist im besten Fall durch eine Untersuchung des Ileoäkallymphknotens gewährleistet. Ein minimalinvasives Verfahren zur Lymphknotenbiopsie bei Kälbern ist etabliert (Seeger et al. 2007), wird aber noch nicht in der Routinediagnostik in den Beständen eingesetzt (Seeger 2007, persönliche Mitteilung). Neue Studien von Sweeney et al. (2006a) lassen an der Eignung der Untersuchung des Ileoäkallymphknotens als Goldstandard zur Detektion der Infektion mit MAP zweifeln, da

bei zwei von sechs respektive 15 von 20 experimentell infizierten Kälbern, bei denen entweder aus Geweben oder aus dem Jejunallymphknoten die kulturelle Anzucht des Erregers gelang, die Kultur des Ileozäkallymphknotens negative Ergebnisse erbrachte.

Die Bestimmung der Grenzwerte trotz verdächtigen Bereiches ist kritisch, da für einen Teil der Tiere, für die nur der MAP-Status bekannt war, nicht zwischen hohem Titer (stark positiv) und niedrigem Titer (schwach positiv) unterschieden werden konnte.

Durch das binäre Modell gehen Informationen zur Höhe des Antikörpertiters verloren. Daher ist die Chance, Assoziationen zu finden, geringer als bei Verwendung der optischen Dichte (Hendrick et al. 2005b). Bei Zugrundlegung des ELISA-Titer wird die Wahrscheinlichkeit der Infektion über die Titerhöhe einbezogen, je geringer die gemessene optische Dichte, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass das Tier falsch-positiv reagiert hat (Collins et al. 2005). Berücksichtigt wurde diese Problematik jedoch durch die Auswahl von eindeutig positiven bzw. negativen Tieren und den Verzicht auf die Einbeziehung verdächtig getesteter Tiere in eine der Gruppen.

Ein anderer Lösungsansatz hierfür läge in der molekulargenetischen Typisierung aller 2084 Tiere, für die genaue OD-Werte vorlagen, und der Anwendung eines linearen Modells. Der erwartete Erkenntniszuwachs hierbei entspräche vermutlich nicht dem erforderlichen labortechnischen und finanziellen Aufwand.

Als Fazit lässt sich feststellen, dass die Anpassung von Fall- und Kontrollgruppe (Matching) gut, aber die Merkmalerfassung problembehaftet ist. Diese Tatsache konnte durch die große Zahl untersuchter Proben nur teilweise ausgeglichen werden.

5.3 Heritabilitätsschätzung

Die unter Verwendung von Tier- und Vatermodell geschätzten Heritabilitäten für die Antikörperantwort gegenüber *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* liegen mit 0,05 bis 0,14 im Bereich einer dänischen Studie (Mortensen et al. 2004), die ebenfalls auf den Ergebnissen serologischer Untersuchungen auf MAP-Antikörper, jedoch in der Milch, basierte. In diese Untersuchung gingen die Daten von 11535 Rindern (Dänische Holsteins) ein. Modellabhängig wurden Heritabilitäten von 0,10 bzw. 0,09 geschätzt. Eine weitere Studie in niederländischen Holsteins beschreibt Heritabilitäten von 0,06 (Gesamtpopulation) bzw. 0,09 für geimpfte Tiere (Koets et al. 2000). Zugrunde lagen dort die Ergebnisse histopathologischer Untersuchungen und kultureller Anzucht von Gewebeproben aus Darm und Lymphknoten, die *post mortem* entnommen worden waren. Der Antikörperstatus der Tiere wurde dabei nicht untersucht. Es liegt somit im Gegensatz zur oben genannten Untersuchung ein anderer Parameter, die Erbllichkeit der Ausbildung pathologischer Läsionen bei der Paratuberkulose, zugrunde.

Obwohl die Studien auf unterschiedlich erfassten Merkmalen basieren und somit eine genaue Vergleichbarkeit nicht gewährleistet ist, liegen die Heritabilitäten unabhängig vom

angewendeten Modell und der zugrunde liegenden Stauseinteilung bei rund 10 %. Damit liegt die ermittelte Erbllichkeit in der vorliegenden Population Dt. Holsteins im selben Bereich und bestätigt eine Heritabilität der Empfänglichkeit für Paratuberkulose.

Die geringen Unterschiede in den geschätzten Heritabilitäten zwischen den beiden Datensätzen (nur MAP-Status bzw. MAP-Status und OD-Wert) zeigen, dass der nur 2084 Tiere umfassende Datensatz 2 als repräsentativ für alle vorliegenden Daten betrachtet werden kann.

Der deutliche Unterschied in den ermittelten Heritabilitäten zwischen dem Schwellenwert-Tiermodell und dem Schwellenwert-Vatermodell kann durch die kleine Zahl an Töchtern pro Bulle erklärt werden, da bei geringem Informationsgehalt das Tiermodell Vorteile gegenüber dem Vatermodell zeigt (Ramirez-Valverde et al. 2001). Demzufolge erklärt die geringe durchschnittliche Zahl an Töchtern einerseits die Heritabilitätsunterschiede zwischen beiden Modellen, andererseits ist die im Tiermodell geschätzte Heritabilität von 0,05 bis 0,06 vermutlich realistischer als die Werte von über 10 % aus den Vatermodellen. In den Vatermodellen wird die additiv-genetische Varianz überschätzt, da die Verwandtschaft der Kühe innerhalb der väterlichen Halbgeschwistergruppen unterschätzt wird (Ramirez-Valverde et al. 2001).

5.4 Mikrosatellitenanalyse

Für alle untersuchten Mikrosatelliten konnten Multiplex-PCR-Reaktionen etabliert werden, was eine Verminderung des Labor- und Kostenaufwandes sowie eine Ersparnis im DNA-Verbrauch, verglichen mit Einzelreaktionen, bedeutete. Durch die unterschiedliche Fluoreszenzmarkierung der einzelnen Primerpaare konnten auch solche Amplifikate in der Multiplex-Reaktion analysiert werden, die ähnliche Produktgrößen aufwiesen.

Der Mikrosatellit *BMC9006* war in der untersuchten Dt. Holsteinpopulation gering polymorph mit drei dargestellten Allelen, wobei die Frequenz eines der Allele 97,61 % (MAP-positive Gruppe) bzw. 98,16 % (MAP-negative Kontrollgruppe) betrug. Es konnte auch mittels Durchführung der PCR, die den in Bezug auf Brucellose resistenten Genotyp GT(13) (Positionen 1908-1933 in GenBank U12862), entsprechend der Allelgröße von 163 bp, darstellte, bei Dt. Holstein kein Polymorphismus an dieser Position nachgewiesen werden. Dies bestätigt die Untersuchungen von Paixao und Mitarbeitern (2006), die 81 *Bos-taurus*-Rinder der Rasse Holstein und 167 *Bos-indicus*-Rinder (u. a. Nelore) im Hinblick auf Brucellose-Resistenz untersuchten und 100 % der Holstein-Rinder als homozygot für das Allel (GT)13 typisierten. Eine weitere Untersuchung an *Bos indicus* (Hariana) und *Bos indicus* x *Bos taurus* Kreuzungstieren wies ebenfalls nur homozygote Holsteinrinder im Bereich des GT-Repeats in der 3' UTR des *NRAMP1*-Gens nach (Kumar et al. 2005). Eine Erklärung für die Homozygotie an dieser Position läge in der erfolgten Ausmerzungen der Brucellose in Deutschland seit 1971 und somit der indirekten Zucht auf den resistenten Genotyp GT(13).

Aufgrund der unvollständigen Resistenz – es treten auch bei Brucellose-betroffenen Tieren Homozygote für das Allel GT(13) auf – ist jedoch auch dort eine Beteiligung weiterer Gene an Empfänglichkeitsunterschieden wahrscheinlich; somit ist (GT)13 als Marker und Stellvertreter für einen Polymorphismus im Gen anzusehen, der damit gekoppelt ist und die Resistenz gegen *Brucella abortus* vermittelt (Adams und Templeton 1998). In einer weiteren Studie konnte allerdings nicht bestätigt werden, dass das Allel GT(13) mit der Resistenz gegen *Brucella abortus* assoziiert ist (Paixao et al. 2007). Dieses Ergebnis und die Tatsache, dass kausal verantwortliche Polymorphismen in allen Rassen Unterschiede zeigen sollten, spricht dafür, dass es sich nicht um die kausale resistenzvermittelnde Variante gegen intrazelluläre Pathogene handelt, sondern dass eine Kopplung vorliegt, die nur populations- bzw. familienspezifisch auftritt.

Gründe für den Homozygotenüberschuss, der den Marker *BMC9006* betrifft, könnte eine Inzuchtproblematik sein. Da die Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht nur diesen einen Marker betrifft, scheint dies trotz des hohen Verwandtschaftsgrads innerhalb der Holsteinpopulation nicht wahrscheinlich (Hanslik et al. 2000). Auch ein nicht nachweisbares Mikrosatellitenallel („Nullallel“) könnte existieren, so dass Tiere, die homozygot sind, tatsächlich heterozygot sind und neben dem detektierten Allel ein Nullallel, welches nicht amplifiziert wird, besitzen (Peter et al. 2005).

Das Problem der Mikrosatelliten-Analyse liegt weiterhin darin, dass die Allelgrößenunterschiede nicht grundsätzlich in einer veränderten Anzahl der Repeatmotive wie bei der „DNA-Slippage“, einer Fehlpaarung während der DNA-Replikation (Levinson und Gutman 1987), begründet sind. Insertionen und Deletionen der das Repeatmotiv flankierenden Regionen, die der Anzahl Nukleotide pro Repeateinheit entsprechen, lassen sich in der Fragmentanalyse nicht erkennen, sondern nur mittels Sequenzierung. Dieses Phänomen der Größenhomoplasie, bei der Fragmente gleicher Größe unterschiedlicher Kausalität sind und fälschlich von einer Betroffenheit des Repeatmotivs ausgegangen wird (Grimaldi und Crouau-Roy 1997), konnte auch für die 3'UTR des *NRAMP1*-Gens nachgewiesen werden (Horin et al. 1999). Die Anzahl der an die GT-Repeats (Positionen 1781-1804 in GenBank U12862) 5'-angrenzenden Guaninbasen variiert und führt damit ebenfalls zu variablen Fragmentgrößen. Auch Studien bei Schweinen (Peischl et al. 2005), Pumas und Hauskatzen (Culver et al. 2001) ergaben analoge Befunde. Größenhomoplasie reduziert die Zahl detektierbarer Allele und den Anteil als heterozygot erkannter Tiere (Angers et al. 2000; Peischl et al. 2005). Die Möglichkeit, durch Auswahl der Primer nahe des Repeatmotivs kleine PCR-Produkte mit kurzen flankierenden Bereichen zu amplifizieren und damit die Rate an Fragmenten mit Größenhomoplasie zu verringern, führt gleichzeitig zu einem vermehrten Auftreten von Nullallelen und damit wieder zu einer verringerten Zahl nachweisbarer Allele (Peischl et al. 2005).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die Untersuchung des *NRAMP1* 3'UTR-Bereichs

mittels einer klassischen Mikrosatellitenanalyse für Assoziationsstudien in Bezug auf Unterschiede der Paratuberkuloseempfindlichkeit beim Dt. Holstein nicht eignet. Neben der geringen Variabilität bzw. Monomorphie der Region in dieser Rasse besteht die Gefahr, dass existente Allele nicht erkannt werden. Daher müsste dieser Bereich bei einer großen Probenzahl durch Sequenzierung oder Einzelstrang-Konformationspolymorphismen (SSCP)-Analyse (vgl. Angers et al. 2000) untersucht werden.

Es besteht weiterhin die Möglichkeit, dass eine Kopplung des Mikrosatelliten im *NRAMP1* mit der tatsächlich krankheitsassoziierten Variante zwar beim Schaf besteht, jedoch nicht beim Rind. Verantwortlich könnten ferner die immunologischen Mechanismen beim Schaf sein, die von denen des Rindes abweichen und sich auch in unterschiedlicher klinischer Symptomatik äußern (Clarke 1997); weshalb das ovine *NRAMP1* mit dem MAP-Status assoziiert ist (Reddacliff et al. 2005), diese Assoziation beim Rind aber nicht bestätigt werden kann.

Die beiden Mikrosatelliten *BMC9006* und *BB705* sind bei der Rasse Jersey auf ein Allel fixiert und wären deshalb in der betreffenden Rasse nicht zur Analyse von Assoziationen zwischen Mikrosatellitallelen und dem Paratuberkulosestatus geeignet.

Die auf BTA 20 liegenden Marker innerhalb des QTLs (Gonda et al. 2006a), *RM106* und *BM1225*, waren nicht statistisch signifikant mit dem Paratuberkulosestatus der Rinder in der Fall- und Kontrollgruppe assoziiert. Da sich der QTL auch bei Gonda nur in einer von drei typisierten Bullenfamilien zeigte und schwach signifikant war, liegt vermutlich ein geringer Effekt vor, der im hier vorliegenden Datenmaterial nicht ins Gewicht fällt und daher nicht nachweisbar war.

Eine QTL-Studie im Halbgeschwisterdesign ist prinzipiell geeignet, Bereiche mit quantitativem Einfluss auf das Merkmal „Paratuberkulose-resistenz“ zu ermitteln. In dieser Studie sind jedoch zu wenige Töchter in der untersuchten Stichprobe vorhanden, d. h. die Familien der einzelnen Bullen sind zu klein. Zudem ist der Infektionsstatus derjenigen Bullen unbekannt, deren Töchter in dieser Studie untersucht wurden. Für weiterführende Untersuchungen wäre es daher möglich, weitere punktuelle Analysen im QTL-Bereich durchzuführen. *DUSP1*, dessen Expression in Makrophagen durch Stimulation mit Peptidoglykan und IL-10 aktiviert wird, wirkt als endogener Regulator der Entzündungsreaktion (Hammer et al. 2006). Es wäre somit als funktionelles wie positionelles Kandidatengen im QTL-Bereich auf BTA 20 interessant für folgende Studien.

5.5 Kandidatengenanalyse

Primäre und sekundäre Komplement- und Antikörperdefizienzen beim Menschen führen nicht zu einer vermehrten Empfänglichkeit für Tuberkulose oder andere Mycobakterieninfektionen (Döffinger et al. 2006). Daher erschien es sinnvoll, das Hauptaugenmerk auf die angeborene und zelluläre Mycobakterienabwehr zu legen, da Mycobakterien typische Induktoren einer präferenziellen Th1-Immunantwort sind (Burrells et al. 1998; Stabel 2000), während in der

späten subklinischen Phase der Infektion mit MAP ist die proinflammatorische Typ-1-Antwort oft verringert ist oder fehlt (Coussens 2004). Der Antikörpertiter wurde als phänotypisches Merkmal für die Paratuberkuloseempfindlichkeit genutzt, da aufgrund des immunologischen Verlaufs auf hohe Antikörpertiter die Progression in die klinische Erkrankung folgt (Stabel 2000).

In den Kandidatengen *NRAMP1* und *CARD15* wurden durch die Sequenzanalyse Nukleotidvarianten gefunden, die im Bereich von Introns lagen. Theoretisch sollten Varianten außerhalb der Splicing-Regionen oder der Exon-Intron-Grenzen keine funktionelle Bedeutung haben, da sie aus der mRNA „herausgespliced“ wurden. Jedoch gibt es Varianten, die mit veränderter Genexpression, Genfunktion oder dem Ansprechen auf Medikamente assoziiert sind (Wang et al. 2006). Diese liegen zum Teil in hochkonservierten, nicht kodierenden Bereichen des Genoms, jedoch ist die Einschätzung ihrer Bedeutung im Gegensatz zu derer von Varianten in kodierenden Bereichen schwierig (Boffelli et al. 2004).

Der Basenaustausch *CARD15* E11(-14) betrifft ein potenzielles Bindungsmotiv für GATA-Transkriptionsfaktoren, „WGATAR“ (Merika und Orkin 1993). Es ergab sich aber kein statistisch signifikanter Zusammenhang mit dem MAP-Status der untersuchten Kühe und Allelen des SNP.

Durch Sequenzierung von Teilen der Promotorregion des *NRAMP1* konnte kein Polymorphismus detektiert werden. Durchschnittlich sind pro 10 kb 8 Basenaustausche zu erwarten, die Dichte an SNPs ist in der 5'UTR 4,83-mal geringer als in der 3'UTR (Zhao et al. 2003). Innerhalb von Genen liegt im Bereich der 5'UTR die geringste Dichte an Polymorphismen vor (0,27 %), im Gegensatz zu Introns. Dort liegen 95,96 % aller innerhalb von Genen nachgewiesenen SNPs (Zhao et al. 2003). So ist trotz der Variabilität dieser Region beim Menschen und der funktionellen Bedeutung dieser Polymorphismen (u. a. Romero-Gomez et al. 2004; Nishino et al. 2005; u. a. Zaahl et al. 2006) nachvollziehbar, dass in der 5'UTR sowie in den untersuchten Exons keine Polymorphismen detektierbar waren.

Der untersuchte Basenaustausch im *NRAMP1* Intron 5 kommt in der Population in äußerst geringer Frequenz vor, jedoch sollte das angewendete Fall-Kontroll-Studiendesign trotzdem ermöglicht haben, relevante Assoziationen zu finden. Da kein Probenmaterial anderer Rassen als des Dt. Holstein vorlag, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Bedeutung des Genes in der Abwehr von MAP bei anderen Rinderrassen zu verifizieren wäre. Die *Bos-indicus*-Rassen Gir, Nelore und Guzera sind in der 3'UTR variabler als Holsteins (Paixao et al. 2006), die Region von Intron 4 bis Intron 5 ist bei Fluss- (*Bubalus bubalis*) und Sumpfbüffeln (*Bubalus carabanesis*) deutlich variabler als bei N'Dama, Japanischem Schwarzvieh, Koreanischen Rindern, Angus und Holsteins (Ables et al. 2002). In der eigenen Studie waren ebenfalls zwei der drei durch Sequenzanalyse ermittelten Basenaustausche bei Tieren der Rassen Brahman (*Bos indicus*) sowie N'Dama nachweisbar.

Die Möglichkeit, dass DNA-Varianten rassespezifische Unterschiede in der Empfänglichkeit

gegenüber infektiösen Erkrankungen vermitteln, wurde beim Rind noch nicht ausreichend untersucht (Barthel et al. 2000). Bei der Scrapieerkrankung des Schafes beispielsweise kommt der VRQ-Haplotyp, der die höchste Anfälligkeit für die Erkrankung vermittelt, in einigen Rassen nicht vor, z. B. beim Merinolandschaf, oder in sehr niedrigen Frequenzen, z. B. bei Suffolk (Drögemüller et al. 2001). Hier besteht für den ARQ/ARQ-Genotyp das höchste Risiko für eine Erkrankung an klassischer Scrapie (Westaway et al. 1994; Hunter et al. 1997; Lühken et al. 2007).

Eine Assoziation von Allelen der untersuchten *NRAMP1*-Polymorphismen mit dem MAP-Status der Rinder konnte in der vorliegenden Studie nicht nachgewiesen werden. Im Gegensatz zur Maus (Vidal et al. 1993) und dem Menschen (Bellamy et al. 1998) scheinen beim Rind andere Genorte für die Resistenz gegen Tuberkulose verantwortlich zu sein (Chacon et al. 2004). Es besteht die Möglichkeit, dass dies auch bei der Abwehr gegen *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* der Fall ist. Dennoch sollten zur abschließenden Klärung weitere, evtl. variabelere Bereiche des Gens unter Verwendung zusätzlicher Proben in sich anschließenden Untersuchungen analysiert werden.

TLR4

Das C-Allel des SNP *TLR4* E3+2021, das in der kanadischen Holsteinpopulation mit verbesserter Laktationspersistenz und geringerer somatische Zellzahl signifikant assoziiert ist (Sharma et al. 2006), war nicht signifikant ($p > 0,05$) mit dem MAP-Status der hier untersuchten Rinder assoziiert. Das seltenere T-Allel trat in der eigenen Untersuchung mit einer Frequenz von rund 17 % häufiger auf als in kanadischen Holsteins mit 7 %. Der Anteil heterozygoter Tiere lag mit rund 30 % versus 12 % ebenfalls höher. Der höhere Anteil von Tieren, die in der eigenen Studie das T-Allel tragen, könnte auf eine schlechtere allgemeine Abwehrlage schließen lassen; da die Allelfrequenzen in der Fall- und Kontrollgruppe jedoch nahezu gleich verteilt sind, lässt sich dies ausschließen.

CARD15

Die Sequenzierung des Exon II und Teilen des Intron 1 von Tieren aus der Fall- und Kontrollgruppe ergab keine von der Referenzsequenz (GenBank AY518739) abweichenden Varianten.

Der publizierte SNP E2(-32) g>a, der in einem 7 bp großen regulatorischen Motiv innerhalb des Intron 1 liegt, ist potenziell von funktioneller Bedeutung (Taylor et al. 2006). Es wurden für diesen Basenaustausch über signifikant unterschiedliche Allelfrequenzen zwischen einer Fall- und Kontrollgruppe (Rassenpanel) innerhalb Tieren der Spezies *Bos taurus* berichtet, jedoch nicht bei Vergleichen innerhalb der Holsteins (Taylor et al. 2006). Die dort dokumentierte Frequenz des Referenzallels „g“ in der Fallgruppe betrug 1, auch alle Holsteins ($n = 7$) waren homozygot für dieses Allel. Des Weiteren war der MAP-Status der Tiere der Kontrollgruppe nicht untersucht worden und somit unbekannt. Ein einfacher

Kausalzusammenhang dieses SNP E2(-32) mit dem MAP-Status konnte nicht hergestellt werden (Taylor et al. 2006). Es kann daher vermutet werden, dass der SNP E2(-32) mit einem für die Krankheitsausprägung relevanten Genort gekoppelt ist und selbst nur als Marker dient. Es könnte durch jahrelange Selektion bei Holsteins auf Milchleistungsparameter nur noch diese Variante vertreten sein, aber aufgrund der Komplexität der Paratuberkuloseerkrankung nicht zu vollständiger Penetranz im Sinne einer Erkrankung bei allen Tieren, die dieses Allel tragen, führen.

Die Assoziation des Basenaustausches *CARD15* E4+921 mit dem MAP-Status der Tiere war statistisch signifikant. Dies bekräftigt die Hinweise aus den Untersuchungen von Taylor und Mitarbeitern (2006), dass *CARD15* Einfluss nimmt auf die Abwehrlage gegen MAP-Infektionen. Der SNP bewirkt einen Austausch der polaren Aminosäure Arginin gegen die ebenfalls polare Aminosäure Histidin (R258H). Die Ergebnisse der Analyse mit SIFT und der BLOSUM62-Matrix ergaben, dass es sich um einen konservativen Aminosäureaustausch handelt, der die Proteinfunktion nicht beeinträchtigt. Jedoch ist ein solcher an dieser Position generell nicht möglich, da sie zwischen den Spezies gering konserviert ist. Die Positionen der bekannten funktionellen Aminosäureaustausche des Menschen sind hoch konserviert. Dies lässt vermuten, dass es sich trotz der Assoziation nicht um den funktionellen SNP handelt, sondern um einen damit gekoppelten Austausch, der als LD-Marker in weiteren Untersuchungen verwendet werden könnte. Andererseits besteht die Möglichkeit, dass mittels der angewendeten Programme die funktionelle Bedeutung nicht erfasst werden konnte, eine solche aber grundsätzlich vorhanden ist. Hierfür spricht, dass bei komplexen Erkrankungen der Einfluss eines Basenaustausches meist erst in Wechselwirkung mit Umwelteffekten und anderen SNPs zu Tage tritt und häufig nur ein mäßiger Einfluss eines einzelnen Austausches auf das Krankheitsrisiko besteht (Thomas und Kejariwal 2004; Hirschhorn 2005). Die Untersuchungen von Thomas und Kejariwal (2004) lassen weiterhin vermuten, dass SNPs, die im Zusammenhang mit komplexen Erkrankungen stehen, bevorzugt an evolutionär nicht stark konservierten Positionen im Protein auftreten.

Des Weiteren spricht für eine funktionelle Bedeutung, dass für das a-Allel homozygote Kühe nur in der Fallgruppe, aber nicht in der Kontrollgruppe vorhanden waren. Dieser Unterschied war jedoch nicht statistisch abzusichern. Handelt es sich bei dem assoziierten Basenaustausch um einen SNP, der gekoppelt ist mit dem tatsächlich funktionellen SNP, muss die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse an großem Familienmaterial geprüft werden.

Das bovine Chromosom 18 repräsentiert evolutionär konservierte Regionen der menschlichen Chromosomen 16 und 19. *CARD15* wurde auf BTA18 in der Region kartiert (Taylor 2004), die homolog zu HSA 16q21 ist. Weiterhin wurden auf BTA 18 bisher QTL für Lebensleistung, Anteil lebend geborener Kälber, Leichtkalbigkeit (Kühn et al. 2003), Milchfettmenge und Milchmenge (Harder et al. 2006) beschrieben. Dies weist auf die Bedeutung des bovinen Chromosoms 18 in Bezug auf Merkmale der Krankheitsresistenz und

Vitalität hin.

Die Möglichkeit der Scheinassoziation aufgrund einer statistischen Verzerrung („Bias“) durch Populationsstratifikation (zusammengefasst von Hirschhorn 2005) lässt sich durch das erfolgte „Matching“ der Kontrollgruppe als gering einstufen, da Töchter eines Bullen jeweils in beiden Gruppen vertreten waren und die Anpassung nach Betrieb und Alter für Tiere in beiden Gruppen mit hoher Wahrscheinlichkeit die gleiche Chance der Infektion mit *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* bot. Ein Bias durch technische Fehler (Hirschhorn und Daly 2005), der z. B. durch die Typisierung von Proben der Fall- bzw. Kontrollgruppe in separaten Durchgängen entstanden sein könnte, lässt sich durch die immer mitgeführte Standardprobe ausschließen.

Der nachgewiesene Einfluss des intrazellulären Rezeptors CARD15 auf die Krankheitsausprägung des Morbus Crohn beim Menschen (Hugot et al. 2001), der zu einem ähnlichen Krankheitsbild wie die Paratuberkulose des Rindes führt, ist ein weiterer Faktor zur Festigung der Rolle als Kandidatengen für Paratuberkuloseresistenz beim Rind, zumal *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* ein intrazelluläres Pathogen darstellt.

5.6 Zuchtziel Paratuberkuloseresistenz?

Die Entwicklung von Antibiotikaresistenzen sowie die Gefahren für die menschliche Gesundheit aufgrund von Medikamentenrückständen und dem zoonotischen Potenzial keimbelasteter tierischer Lebensmittel zeigen die Vorteile und Relevanz der züchterischen Modifikation der Krankheitsresistenz beim Rind (Simianer und König 2002). Hier ist die markergestützte Selektion (MAS) in Bezug auf Krankheitsresistenz besonders attraktiv, da Merkmale, welche die Resistenz ausdrücken, schwierig zu messen sind und in den meisten Fällen eine geringe Heritabilität besteht (Dekkers und Hospital 2002; Raadsma und Fullard 2006).

Das Hauptproblem bei genetischen Untersuchungen zur Paratuberkuloseresistenz ist die Definition des Infektions- und Krankheitsstatus. Dies resultiert somit in Schwierigkeiten bei der Probenbeschaffung (Reddacliff et al. 2005). Ein Teil der infizierten Rinder tritt nie in das Stadium der klinischen Erkrankung ein, das von den typischen Symptomen geprägt ist (Toft et al. 2005), und es gibt aktuell auch kein Testsystem, das auf eine spätere klinische Erkrankung des getesteten Tieres hinweist.

Zellvermittelte Immunität und Verhinderung der Ausscheidung des Erregers gehen einher (Stabel 1996; Sweeney et al. 1998; Stabel 2000), basierend auf dieser Annahme wären auch Tiere, die zwar infiziert sind, jedoch nicht klinisch erkranken, ein mögliches Zuchtziel. Diese Rinder sind zwar in der Lage, die Infektion einzudämmen, die Gefahr der subklinischen Ausscheidung ist jedoch nicht von der Hand zu weisen. Eine Streuung des Erregers in der Herde und der Umwelt ist hier nicht auszuschließen und unerwünscht. Zusätzlich besteht das Problem der in vielen Studien nachgewiesenen verringerte Leistung der Tiere (Abbas et al.

1983; Nordlund et al. 1996; Johnson-Ifearulundu et al. 2000). Auch in dieser Untersuchung konnte eine signifikante Verringerung des Milchfettgehaltes bei serologisch positiven Kühen im Vergleich zur serologisch negativen Gruppe nachgewiesen werden.

Einerseits kann spekuliert werden, dass Tiere, die in früheren serologischen Tests positiv und später negativ auf das MAP-Antigen reagiert haben, die Infektion überwunden haben. Diese Rinder sind daher vom tierzüchterischen Standpunkt erwünscht, da sie aufgrund ihrer Konstitution eine Feiung des Erregers leisten können (Chiodini et al. 1984; Adams und Templeton 1998). Andererseits ist die Senkung des Antikörpertiters auch bei der Progression in die klinische Phase zu erwarten (Chiodini 1996). Sinkende Antikörpertiter vor der Niederbruchsphase der Erkrankung sind im B-Zell-Homing, einer spezifischen Anergie oder der außer Kraft gesetzten Antigenpräsentation durch T-Zellen zu begründen. Durch die Konzentration von Immunglobulin G im Kolostrum (Nielsen et al. 2002a) während des peripartalen Zeitraums kommt es ebenfalls zu einer Verminderung des Serumantikörpertiters (Sweeney et al. 2006b).

Zusammenfassend lässt sich im Hinblick auf die mögliche Beteiligung an der Ätiologie bzw. dem Verlauf des M. Crohn beim Menschen sowie aus Sicht des Tierseuchenrechts und der Zoonoseprophylaxe sagen, dass auch Tiere, die subklinisch infiziert sind, aber zeitlebens klinisch gesund bleiben und somit keine massiven finanziellen Verluste für den Landwirt verursachen, kein erwünschtes Zuchtziel sein können.

Es müssten demnach im Verlauf einer kontrollierten Langzeitstudie Tiere ermittelt werden, die trotz nachgewiesenem Erregerkontakt in ausreichender Dosis zeitlebens weder klinisch erkranken noch bei subklinischer Infektion Leitungsminderung zeigen, noch den Erreger mit dem Kot ausscheiden und damit streuen. Geeignet wäre eine prospektive Kohortenstudie, bei der Exposition und Kovariablen (Abstammung, Mutterfamilie, Betrieb, Managementfaktoren) vor Studienbeginn erhoben werden und sich eine langfristige Beobachtung anschließt (Klug et al. 2007).

Aufgrund der Kosten und der schwierigen Realisierbarkeit einer solchen Studie ist es notwendig, in folgenden Untersuchungen zusätzliche diagnostische Maßnahmen anzuwenden wie die kotkulturelle Untersuchung aller Proben, die Untersuchung des Ileozäkallymphknotens und die erweiterte Probennahme unter Einbeziehung mehrerer Rassen. Die Kombination mehrerer Testverfahren über eine längere Zeit und mit paralleler Testung mehrerer Gewebe des Tieres zu einer besseren Einstufung des Status in Bezug auf genetische Einflüsse auf die Immunabwehr bieten. Auch die Verwendung von Real-Time-PCR-Verfahren mit MAP-spezifischen Primern (Schönenbrücher et al. 2006) bietet zusätzliche Sicherheit in der Einstufung von Probenmaterial. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine verbesserte Diagnostik ebenfalls zu einem tieferen Einblick in die genetischen Empfänglichkeitsunterschiede gegenüber MAP beim Rind führen wird. Sie ermöglicht auch weitere Erkenntnisse über die Rolle der hier untersuchten Mikrosatelliten und Kandidatengene in der

Empfänglichkeit bzw. Resistenz gegenüber *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*.

Sinnvoll wäre gleichermaßen die Einbeziehung weiterer SNPs in Haplotypanalysen. Haplotypanalysen haben mehrere Vorteile gegenüber klassischen Assoziationsstudien mit einzelnen SNPs, da die Gefahr besteht, wirkliche Assoziationen aufgrund lückenhafter Informationen zu übersehen, während negative Ergebnisse die Assoziation mit benachbarten Basenaustauschen nicht ausschließen können (Daly et al. 2001). Khatkar et al. (2007) gehen davon aus, dass beim Rind unter Berücksichtigung von Haplotyp-Blöcken für Assoziationsanalysen im Schnitt ein für den Haplotyp-Block repräsentativer SNP (Tag-SNP) pro 30–50 kb typisiert werden müsste, was 75.000 bis 100.000 Tag-SNPs für genomweite Analysen entspräche. Ein kommerziell erhältlicher Chip („BovineSNP50 Bead Chip“; Illumina, Inc., San Diego, USA), der die Typisierung von durchschnittlich einem SNP pro 51,5 kb mit 54.001 SNP-Sonden insgesamt ermöglicht, könnte zu diesem Zweck eingesetzt werden.

Ferner könnte die Microarray-Technologie eingesetzt werden, um Unterschiede in der Expression möglicher für die Paratuberkulose-Abwehr relevanter Gene, z. B. der angeborenen Immunität (Donaldson et al. 2005), zwischen als positiv eingestuften Tieren und Kontrolltieren feststellen zu können (Coussens et al. 2003; Coussens et al. 2005; Skovgaard et al. 2006). Der Vorteil gegenüber der Untersuchung einzelner, wie in dieser Studie ausgewählter Kandidatengene läge in der simultanen Erfassung einer Vielzahl von Genen. In ungleich exprimierten Genen könnte so in der Fall- und Kontrollgruppe gezielt nach verantwortlichen Mutationen gesucht werden. Die Microarray-Technologie kann daher zur Klärung noch offener Fragen einen wesentlichen Beitrag leisten, ist jedoch immer noch mit hohen Kosten verbunden (Mühlhardt 2003).

Mögliche Angriffspunkte weiterer molekulargenetischer Untersuchungen sind Kaskaden der Abwehr, die sich gegen Lipoarabinomannan, dem Hauptantigen der Mycobakterien, oder Hitzeschockproteine, die ebenfalls hochantigen sind, richten. Ferner wäre eine Untersuchung der genetischen Hintergründe der Immunantwort gegen das HspX-Protein, ein Hitzeschockähnliches Protein, das von MAP in bovinen Makrophagen produziert wird (Bannantine und Stabel 2000), möglich.

Ein unterschiedlicher Verlauf der Infektion mit MAP kann neben einer genetisch bedingten variierenden Wirtsantwort auch aus Unterschieden im infizierenden MAP-Stamm herrühren. Es zeigten sich bei einer experimentellen Infektion von Lämmern mit ovinen und bovinen MAP-Stämmen, dass verschiedene immunopathologische Reaktionen hervorgerufen wurden (Verna et al. 2007). Die verschiedenen Stämme hatten vermutlich unterschiedliche Effekte auf die Produktion von γ -Interferon. Neben der Spezies, aus der das Bakterium isoliert wurde, kann auch die mikrobiologische Charakteristik des Stammes variieren (Juste et al. 1991). Die Identifizierung des MAP-Stammes ist für epidemiologische Untersuchungen zur Bestimmung von Risikofaktoren für die Übertragung, den Ursprung der Infektion und die nähere Charakterisierung der Pathogenese nützlich (Motiwala et al. 2006b). In einer mittels

Microarray-Technologie durchgeführten Studie von Motiwala und Mitarbeitern (2006a) zeigte sich, dass MAP-Isolate des RFLP-Typs C aus Rind, Mensch und Bison ein antiinflammatorisches und antiapoptotisches Genexpressionsmuster hervorriefen, während Schafisolate des Typs S eine proinflammatorische Immunantwort induzierten. Das Überleben von MAP in bovinen Makrophagen *in vitro* ist abhängig vom Infektionsstatus des Spendertieres, steht aber in Beziehung zum infizierenden MAP-Stamm (Gollnick et al. 2007). Daher besteht die Möglichkeit, dass auch beim Rind verschiedene MAP-Stämme verschiedene immunologische Kaskaden des Wirtes bevorzugt aktivieren. Wäre zusätzlich zum MAP-Status auch der verursachende MAP-Stamm bekannt, könnte auch dessen Einfluss, z. B. auf die Inkubationszeit, in weiteren Untersuchungen berücksichtigt werden.

Während für die Kandidatengene *NRAMP1*, *TLR4*, *IL2* und *GATA3* keine Assoziationen von Einzelbasenaustauschen mit dem serologischen Paratuberkulosestatus ermittelt werden konnten, wurde durch die vorliegende Untersuchung ein statistisch signifikanter Zusammenhang des SNPs *CARD15* E4+921 (g>a) mit der Antikörperbildung gegen MAP beim Dt. Holstein nachgewiesen. Somit bestehen starke Anhaltspunkte für eine Assoziation des Kandidatengens *CARD15* mit dem Auftreten von Paratuberkulose beim Rind.

Es gibt noch viele zu klärende Fragen zur genetischen Prädisposition für Paratuberkulose. Unter anderem obliegt es weiteren Studien, die funktionelle Bedeutung des *CARD15*-Polymorphismus in der immunologischen Abwehr beim Rind zu untersuchen. Die mögliche Korrelation mit Effekten, die wirtschaftliche oder sonstige Bedeutung haben und daher einer Nutzung dieses SNP im Sinne einer markergestützten Selektion entgegenstünden, ist ebenfalls zu berücksichtigen.

6 Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war die Charakterisierung von genetischen und umweltbedingten Einflüssen auf die Paratuberkulose des Rindes. Durch molekulargenetische sowie statistische Untersuchungen sollten genetische Prädispositionen für die Infektion mit *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) beim Milchrind analysiert werden.

Zunächst erfolgte die Schätzung von Heritabilitäten für die Antikörperantwort gegenüber der MAP-Infektion anhand eines erstellten Datenmaterials aus Thüringen, das 4524 Dt. Holstein Kühe aus 12 Betrieben einschließlich ihrer Pedigree- und Leistungsdaten umfasste. Zugrunde lagen den Schätzungen die serologischen Ergebnisse aus dem ersten Halbjahr 2005, wobei 14,1 % der Tiere positiv, 17,1 % verdächtig und 68,8 % negativ auf Antikörper gegen MAP getestet worden waren. Basierend auf der trichotomisierten Einstufung in positive, verdächtige und negative Tiere und die Zuteilung der verdächtigen Rinder zu jeweils einer der Gruppen bzw. auf den Messwerten des ELISA-Verfahrens lagen die geschätzten Heritabilitäten zwischen 0,05 und 0,14.

Weiterhin wurde durch molekulargenetische Untersuchungen auf der Basis von Kandidatengen- und Mikrosatellitenuntersuchungen die genetische Prädisposition für die Infektion mit *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) bei Dt. Holstein analysiert. Um eine Assoziation zwischen ausgewählten Mikrosatelliten bzw. Kandidatengenen aus den verschiedenen immunologischen Kaskaden und dem MAP-Status zu ermitteln, wurde das Design einer Fall-Kontroll-Studie gewählt.

Zu diesem Zweck wurde eine aus $n = 594$ Tieren bestehende Fallgruppe erstellt. Die Kontrollgruppe bestand aus 585 Tieren, die aus demselben Betrieb stammten wie das betroffene Tier, im entsprechenden Alter (± 3 Monate) und möglichst väterliche Halbgeschwister waren. War kein gleichaltriges Tier vorhanden, wurde ein älteres Tier als Kontrolltier gewählt.

Die Kandidatengene Natural Resistance associated Macrophage Protein 1 (*NRAMP1*), Toll-like Receptor 4 (*TLR4*), Caspase Recruitment Domain Family, Member 15 (*CARD15*) und GATA-binding Protein 3 (*GATA3*) wurden zunächst durch PCR-Direktsequenzierung in verschiedenen Rinderrassen auf Polymorphismen untersucht, Typisierungsmethoden etabliert und anschließend die MAP-Test-positiven und -Test-negativen Tiere genotypisiert. Die Proben wurden weiterhin auf Polymorphismen im Kandidatengen Interleukin 2 (*IL2*) mit bereits etablierten Methoden analysiert.

Die PCR-Amplifikation der Mikrosatelliten *BB717*, *BB705*, *BB704*, *BMC9006*, *BB719*, *BMS1617*, *BB702*, *BOBT24*, *RM106* und *BM1225* erfolgte mittels fluoreszenzmarkierter Primer in Multiplex-Ansätzen, danach erfolgte die Genotypisierung am ABI PRISM® 377 DNA Sequencer.

Die durchgeführten Assoziationsstudien zeigten sowohl in den Mikrosatelliten als auch in den Kandidatengen *NRAMP1*, *TLR4*, *IL2* und *GATA3* keine signifikanten Unterschiede in den Allelfrequenzen zwischen der Fall- und Kontrollgruppe. Beim Kandidatengen *CARD15* konnte eine statistisch signifikante Assoziation ($p < 0,05$) der Allelfrequenzen des Basenaustausches E4+921 g>a mit dem Infektionsstatus der untersuchten Kühe festgestellt werden. Tiere, die an dieser Position homozygot für das Allel „a“ waren, traten nur in der positiven, nicht jedoch in der Kontrollgruppe auf. Dieser Unterschied war in den Genotypfrequenzen nicht statistisch abzusichern. Demnach liegt voraussichtlich eine Kopplung dieses Basenaustausches mit einem funktionellen SNP vor. Es obliegt weiteren Forschungsarbeiten, die tatsächliche funktionelle Bedeutung und eventuelle Korrelationen des SNP *CARD15* E4+921 mit Merkmalen, die einer Anwendung im Sinne einer markergestützten Selektion entgegenstünden, zu prüfen.

7 Summary

The aim of this study was to characterize genetic and environmental factors on paratuberculosis (Johne's disease) in cattle.

Molecular genetics and statistical analyses were applied to examine the genetic predisposition to *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) infection in dairy cattle. First, heritability estimates for antibody response to MAP infection in German Holstein were calculated. Pedigree data, performance data and blood samples from 4,524 cows originating from 12 farms were collected in Thuringia.

Heritability estimates were based on serological results, ascertained in spring 2005. Of the animals tested, 14.1 % were positive, 17.1 % questionable and 68.8 % negative for serum antibodies to MAP. Based on this trichotomised classification (positive, questionable and negative) and the designation of questionable cows to either the negative or positive group, and in a second model based on ELISA OD-values, estimated heritabilities varied from 0.05 to 0.14.

Furthermore, the aim of this study was to analyse possible associations of microsatellites located near or within candidate genes involved in immune response to mycobacteria and of particular candidate genes with susceptibility to MAP in cattle. A case control study was chosen to determine the association between selected microsatellites and candidate genes, respectively, and MAP status of the animals.

For these purposes, a case panel of 594 MAP positive animals was composed. The control group comprised 585 animals testing negative for MAP, each of which correlated in age at the time of testing, descended from the same sire and originated from the same farm as each of the positive animals. If no matching half-sib was present in the population, preferably older animals born on the same farm and with repeated negative test results were chosen as controls.

To detect polymorphisms, the candidate genes natural resistance associated macrophage protein 1 (*NRAMP1*), toll-like receptor 4 (*TLR4*), caspase recruitment domain family, member 15 (*CARD15*) und GATA-binding protein 3 (*GATA3*) were sequenced in different cattle breeds. Screening methods for polymorphisms were established and the case and control groups were investigated, respectively. The samples were also tested for polymorphisms in the candidate gene *IL2* with previously established molecular methods.

Microsatellite loci were co-amplified in three groups using fluorescent labelled primers: *BB704*, *BB705*, *BB717*, *BB719* and *BMC9006* (Multiplex 1) and *BMS1617*, *BB702* and *BOBT24* (Multiplex 2) as well as *RM106* and *BM1225* (Multiplex 3). Fragment analysis was performed using the ABI PRISM[®] 377 DNA Sequencer.

Association studies did not reveal significant differences in allele frequencies between the case and control groups. This was the case for all microsatellites and for the candidate genes

NRAMP1, *TLR4*, *IL2* and *GATA3*. In the candidate gene *CARD15*, a statistically significant association ($p < 0.05$) of SNP E4+921 g>a allele frequencies with MAP infection status of investigated cows could be determined.

Animals homozygous for allele „a“ on this position were only detectable in the positive group, not in the control panel. This difference in genotype frequencies could not be ensured with statistic methods. According to these results, a linkage of this SNP with a functional variant is probable.

Additional research work is necessary to investigate the relevance and potential correlation of SNP *CARD15* E4+921 with traits that would allow implementation in marker assisted selection.

8 Literaturverzeichnis

- Abbas, B., H. P. Riemann und B. Lonnerdal (1983). Isolation of specific peptides from *Mycobacterium paratuberculosis* protoplasm and their use in an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of paratuberculosis (Johne's disease) in cattle. *American Journal of Veterinary Research* 44: 2229-2236.
- Ables, G. P., M. Nishibori, M. Kanemaki und T. Watanabe (2002). Sequence analysis of the *NRAMP1* genes from different bovine and buffalo breeds. *The Journal of Veterinary Medical Science* 64: 1081-1083.
- Adams, L. G. und J. W. Templeton (1998). Genetic resistance to bacterial diseases of animals. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)* 17: 200-219.
- Aderem, A. und R. Ulevitch (2000). Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406: 782-787.
- Aho, A. D., A. M. McNulty und P. M. Coussens (2003). Enhanced expression of interleukin-1alpha and tumor necrosis factor receptor-associated protein 1 in ileal tissues of cattle infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Infection and Immunity* 71: 6479-6486.
- Akira, S. (2004). Toll receptor families: structure and function. *Seminars in Immunology* 16: 1-2.
- Altare, F., A. Durandy, D. Lammas, J. F. Emile, S. Lamhamedi, F. Le Deist, P. Drysdale, E. Jouanguy, R. Doffinger, F. Bernaudin, O. Jeppsson, J. A. Gollob, E. Meinel, A. W. Segal, A. Fischer, D. Kumararatne und J. L. Casanova (1998a). Impairment of mycobacterial immunity in human interleukin-12 receptor deficiency. *Science* 280: 1432-1435.
- Altare, F., E. Joanguy, S. Lamhedi, R. Döffinger, A. Fischer und J. Casanova (1998b). Mendelian susceptibility to mycobacterial infection in man. *Current Opinion in Immunology* 10: 413-417.
- Alzuhherri, H., C. Woodall und C. Clarke (1996). Increased intestinal TNF- α , IL-1 β and IL-6 expression in ovine paratuberculosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 49: 331-345.
- Angers, B., A. Estoup und P. Jarne (2000). Microsatellite size homoplasy, SSCP, and population structure: a case study in the freshwater snail *Bulinus truncatus*. *Molecular Biology and Evolution* 17: 1926-1932.
- Anonymus (2004). ILSI International Life Science Institute Europe- Report on *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) and the food chain. International Life Science Institute Europe Report Series: Gould, G; Franken, P; Hammer, P (unter: <http://www.ilsa.org/file/RPMMyco.pdf>.)
- Anonymus (2005). Leitlinien für den Umgang mit der Paratuberkulose in Wiederkäuerbeständen vom 17. Januar 2005 (Paratuberkuloseleitlinien). Veröffentlicht im Bundesanzeiger Nr. 28 vom 10.02.2005: Seite 2165.
- Autschbach, F., S. Eisold, U. Hinz, S. Zinser, M. Linnebacher, T. Giese, T. Löffler, M. W. Buchler und J. Schmidt (2005). High prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* IS900 DNA in gut tissues from individuals with Crohn's disease. *Gut* 54: 944-949.
- Ayele, W. Y., M. Bartos, P. Svastova und I. Pavlik (2004). Distribution of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in organs of naturally infected bull-calves and breeding bulls. *Veterinary Microbiology* 103: 209-217.
- Band, M. R., J. H. Larson, M. Rebeiz, C. A. Green, D. W. Heyen, J. Donovan, R. Windish, C. Steining, P. Mahyuddin, J. E. Womack und H. A. Lewin (2000). An ordered comparative map of the cattle and human genomes. *Genome Research* 10: 1359-1368.
- Bannantine, J. P. und J. R. Stabel (2000). HspX is present within *Mycobacterium paratuberculosis*-infected macrophages and is recognized by sera from some infected cattle. *Veterinary Microbiology* 76: 343-358.

- Barendse, W., S. M. Armitage, L. M. Kossarek, A. Shalom, B. W. Kirkpatrick, A. M. Ryan, D. Clayton, L. Li, H. L. Neibergs und N. Zhang (1994). A genetic linkage map of the bovine genome. *Nature Genetics* 6: 227-235.
- Barthel, R., J. A. Piedrahita, D. N. McMurray, J. Payeur, D. Baca, F. Suarez Guemes, V. S. Perumaalla, T. A. Ficht, J. W. Templeton und L. G. Adams (2000). Pathologic findings and association of *Mycobacterium bovis* infection with the bovine *NRAMP1* gene in cattle from herds with naturally occurring tuberculosis. *American Journal of Veterinary Research* 61: 1140-1144.
- Barthel, R., J. Feng, J. A. Piedrahita, D. N. McMurray, J. W. Templeton und L. G. Adams (2001). Stable transfection of the bovine *NRAMP1* gene into murine RAW264.7 cells: effect on *Brucella abortus* survival. *Infection and Immunity* 69: 3110-3119.
- Beard, P., D. Henderson, M. Daniels, A. Pirie, D. Buxton, A. Greig, M. Hutchings, I. McKendrick, S. Rhind, K. Stevenson und M. Sharp (1999). Evidence for paratuberculosis in fox (*vulpes vulpes*) and stoat (*mustela erminea*). *The Veterinary Record* 145: 612-613.
- Beard, P. M., M. J. Daniels, D. Henderson, A. Pirie, K. Rudge, D. Buxton, S. Rhind, A. Greig, M. R. Hutchings, I. McKendrick, K. Stevenson und J. M. Sharp (2001). Paratuberculosis infection of nonruminant wildlife in Scotland. *Journal of Clinical Microbiology* 39: 1517-1521.
- Becker, S. (2002). Untersuchung der Assoziation eines Aldose-Reduktase-assoziierten Polymorphismus mit diabetischen Komplikationen bei Typ 2 Diabetikern. Dissertation Medizinische Fakultät, Ruhr-Universität Bochum;
- Behr, M. A., M. Semret, A. Poon und E. Schurr (2004). Crohn's disease, mycobacteria, and NOD2. *The Lancet Infectious Diseases* 4: 136-137.
- Bellamy, R. und A. Hill (1998). Genetic susceptibility to mycobacteria and other infectious pathogens in humans. *Current Opinion in Immunology* 10: 483-487.
- Bellamy, R., C. Ruwende, T. Corrah, K. P. McAdam, H. C. Whittle und A. V. Hill (1998). Variations in the *NRAMP1* gene and susceptibility to tuberculosis in West Africans. *The New England Journal of Medicine* 338: 640-644.
- Bellamy, R. (2000). Identifying genetic susceptibility factors for tuberculosis in Africans: a combined approach using a candidate gene study and a genome-wide screen. *Clinical Science (London, England: 1979)* 98: 245-250.
- Ben-Ali, M., M. Barbouche, S. Bousina, C. A und K. Dellagi (2004). Toll-like receptor 2 Arg677Trp polymorphism is associated with susceptibility to tuberculosis in Tunisian patients. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 11: 625-626.
- Benedictus, G., A. A. Dijkhuizen und J. Stelwagen (1987). Economic losses due to paratuberculosis in dairy cattle. *The Veterinary Record* 121: 142-146.
- Berger, S. und F. Griffin (2006). A comparison of ovine monocyte-derived macrophage function following infection with *Mycobacterium avium* ssp. *avium* and *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*. *Immunology and Cell Biology*: 1-8.
- Berger, S., J. P. Bannantine und J. F. Griffin (2007). Autoreactive antibodies are present in sheep with Johne's disease and cross-react with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* antigens. *Microbes and Infection* 9: 963-970.
- Berrebi, D., R. Maudinas, J. P. Hugot, M. Chamaillard, F. Chareyre, P. De Lagausie, C. Yang, P. Desreumaux, M. Giovannini, J. P. Cezard, H. Zouali, D. Emilie und M. Peuchmaur (2003). Card15 gene overexpression in mononuclear and epithelial cells of the inflamed Crohn's disease colon. *Gut* 52: 840-846.
- Biet, E., J. Sun und M. Dutreix (1999). Conserved sequence preference in DNA binding among recombination proteins: an effect of ssDNA secondary structure. *Nucleic Acids Research* 27: 596-600.

- Bishop, M. D., S. M. Kappes, J. W. Keele, R. T. Stone, S. L. Sunden, G. A. Hawkins, S. S. Toldo, R. Fries, M. D. Grosz und J. Yoo (1994). A genetic linkage map for cattle. *Genetics* 136: 619-639.
- Bisping, W. und G. Amtsberg (1988). Farbatlas zur Diagnose bakterieller Infektionserreger der Tiere, Verlag Parey, Berlin, Hamburg; Seiten 119-120.
- Böddeker, I. und A. Ziegler (2000). Assoziations- und Kopplungstudien zur Analyse von Kandidatengen. *Deutsche medizinische Wochenschrift* 125: 810-815.
- Boelaert, F., K. Walravens, P. Biront, J. P. Vermeersch, D. Berkvens und J. Godfroid (2000). Prevalence of paratuberculosis (Johne's disease) in the Belgian cattle population. *Veterinary Microbiology* 77: 269-281.
- Boffelli, D., M. A. Nobrega und E. M. Rubin (2004). Comparative genomics at the vertebrate extremes. *Nature Reviews. Genetics* 5: 456-465.
- Bonen, D. K. und J. H. Cho (2003). The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 124: 521-536.
- Böttcher, J. und A. Gangl (2004). *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* - Combined Serological Testing and Classification of Individual Animals and Herds. *Journal of Veterinary Medicine* 51: 443-448.
- Brownstein, M. J., J. D. Carpten und J. R. Smith (1996). Modulation of non-templated nucleotide addition by Taq DNA polymerase: primer modifications that facilitate genotyping. *Bio Techniques* 20: 1004-1010.
- Buergelt, C. D., A. W. Layton, P. E. Ginn, M. Taylor, J. M. King, P. L. Habecker, E. Mauldin, R. Whitlock, C. Rossiter und M. T. Collins (2000). The pathology of spontaneous paratuberculosis in the North American bison (*Bison bison*). *Veterinary Pathology* 37: 428-438.
- Buitkamp, J., F. W. Schwaiger, S. Solinas-Toldo, R. Fries und J. T. Epplen (1995). The bovine interleukin-4 gene: genomic organization, localization, and evolution. *Mammalian Genome* 6: 350-356.
- Buitkamp, J., G. Obexer-Ruff, M. Kessler und J. T. Epplen (1996). A microsatellite (BOBT24) located between the bovine IL4 and IL13 loci is polymorphic in cattle and goat. *Animal Genetics* 27: 212-213.
- Bull, T. J., E. J. McMinn, K. Sidi-Boumedine, A. Skull, D. Durkin, P. Neild, G. Rhodes, R. Pickup und J. Hermon-Taylor (2003). Detection and verification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fresh ileocolonic mucosal biopsy specimens from individuals with and without Crohn's disease. *Journal of Clinical Microbiology* 41: 2915-2923.
- Bülte, M., H. Schönenbrücher und A. Abdulmawjood (2005). From farm to fork- *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) as zoonotic agent? *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 118: 377-385.
- Burrells, C., C. J. Clarke, A. Colston, J. M. Kay, J. Porter, D. Little und J. M. Sharp (1998). A study of immunological responses of sheep clinically-affected with paratuberculosis (Johne's disease). The relationship of blood, mesenteric lymph node and intestinal lymphocyte responses to gross and microscopic pathology. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 66: 343-358.
- Burrells, C., C. J. Clarke, A. Colston, J. M. Kay, J. Porter, D. Little und J. M. Sharp (1999). Interferon-gamma and interleukin-2 release by lymphocytes derived from the blood, mesenteric lymph nodes and intestines of normal sheep and those affected with paratuberculosis (Johne's disease). *Veterinary Immunology and Immunopathology* 68: 139-148.
- Buza, J. J., Y. Mori, A. M. Bari, H. Hikono, G. Aodon, S. Hirayama, Y. Shu und E. Momotani (2003). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection causes suppression of RANTES, monocyte chemoattractant protein 1, and tumor necrosis factor alpha expression in peripheral blood of experimentally infected cattle. *Infection and Immunity* 71: 7223-7227.

- Cardon, L. R. (2006). Genetics. Delivering new disease genes. *Science* 314: 1403-1405.
- Cetinkaya, B., H. M. Erdogan und K. L. Morgan (1997). Relationships between the presence of Johne's disease and farm and management factors in dairy cattle in England. *Preventive Veterinary Medicine* 32: 253-266.
- Cetinkaya, B., H. M. Erdogan und K. L. Morgan (1998). Prevalence, incidence and geographical distribution of Johne's disease in cattle in England and the Welsh borders. *The Veterinary Record* 143: 265-269.
- Chacon, O., L. E. Bermudez und R. G. Barletta (2004). Johne's disease, inflammatory bowel disease, and *Mycobacterium paratuberculosis*. *Annual Review of Microbiology* 58: 329-363.
- Chiodini, R. J. und H. J. Van Kruiningen (1983). Eastern white-tailed deer as a reservoir of ruminant paratuberculosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 182: 168-169.
- Chiodini, R. J., H. J. Van Kruiningen und R. S. Merkal (1984). Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects. *The Cornell Veterinarian* 74: 218-262.
- Chiodini, R. J. (1996). Immunology: resistance to paratuberculosis. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*. 12: 313-343.
- Clarke, C. J. (1997). The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. *Journal of Comparative Pathology* 116: 217-261.
- Clayton, T. M., J. P. Whitaker, R. Sparkes und P. Gill (1998). Analysis and interpretation of mixed forensic stains using DNA STR profiling. *Forensic Science International* 91: 55-70.
- Clemens, D. L. und M. A. Horwitz (1995). Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* phagosome and evidence that phagosomal maturation is inhibited. *The Journal of Experimental Medicine* 181: 257-270.
- Collins, M. T. (1994). Clinical approach to control of bovine paratuberculosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 204: 208-210.
- Collins, M. T. (1996). Diagnosis of paratuberculosis. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*. 12: 357-371.
- Collins, M. T., S. J. Wells, K. R. Petrini, J. E. Collins, R. D. Schultz und R. H. Whitlock (2005). Evaluation of five antibody detection tests for diagnosis of bovine paratuberculosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 12: 685-692.
- Cook, W. E., T. E. Cornish, S. Shideler, B. Lasley und M. T. Collins (1997). Radiometric culture of *Mycobacterium avium paratuberculosis* from the feces of tule elk. *Journal of Wildlife Diseases* 33: 635-637.
- Cooper, A. M. und J. L. Flynn (1995). The protective immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Current Opinion in Immunology* 7: 512-516.
- Cousins, D. V., R. Whittington, I. Marsh, A. Masters, R. J. Evans und P. Kluver (1999). *Mycobacteria* distinct from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolated from the faeces of ruminants possess IS900-like sequences detectable IS900 polymerase chain reaction: implications for diagnosis. *Molecular and Cellular Probes* 13: 431-442.
- Coussens, P. M., C. J. Colvin, K. Wiersma, A. Abouzied und S. Sipkovsky (2002). Gene expression profiling of peripheral blood mononuclear cells from cattle infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Infection and Immunity* 70: 5494-5502.
- Coussens, P. M., C. J. Colvin, G. J. Rosa, J. Perez Laspiur und M. D. Elftman (2003). Evidence for a novel gene expression program in peripheral blood mononuclear cells from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*-infected cattle. *Infection and Immunity* 71: 6487-6498.
- Coussens, P. M. (2004). Model for immune responses to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in cattle. *Infection and Immunity* 72: 3089-3096.

- Coussens, P. M., M. J. Coussens, B. C. Tooker und W. Nobis (2004a). Structure of the bovine natural resistance associated macrophage protein (*NRAMP 1*) gene and identification of a novel polymorphism. *DNA Sequence: the Journal of DNA Sequencing and Mapping* 15: 15-25.
- Coussens, P. M., A. Jeffers und C. Colvin (2004b). Rapid and transient activation of gene expression in peripheral blood mononuclear cells from Johne's disease positive cows exposed to *Mycobacterium paratuberculosis* in vitro. *Microbial Pathogenesis* 36: 93-108.
- Coussens, P. M., N. Verman, M. A. Coussens, M. D. Elftman und A. M. McNulty (2004c). Cytokine gene expression in peripheral blood mononuclear cells and tissues of cattle infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: evidence for an inherent proinflammatory gene expression pattern. *Infection and Immunity* 72: 1409-1422.
- Coussens, P. M., C. B. Pudrith, K. Skovgaard, X. Ren, S. P. Suchyta, J. R. Stabel und P. M. Heegaard (2005). Johne's disease in cattle is associated with enhanced expression of genes encoding IL-5, GATA-3, tissue inhibitors of matrix metalloproteinases 1 and 2, and factors promoting apoptosis in peripheral blood mononuclear cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 105: 221-234.
- Crohn, B. B., L. Ginzburg und G. D. Oppenheimer (1932). Regional ileitis. A pathological and clinical entity. *JAMA: the journal of the American Medical Association* 99: 1323-1328.
- Culver, M., M. A. Menotti-Raymond und S. J. O'Brien (2001). Patterns of size homoplasy at 10 microsatellite loci in pumas (*Puma concolor*). *Molecular Biology and Evolution* 18: 1151-1156.
- Cymbron, T., A. R. Freeman, M. Isabel Malheiro, J. D. Vigne und D. G. Bradley (2005). Microsatellite diversity suggests different histories for Mediterranean and Northern European cattle populations. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society of London* 272: 1837-1843.
- Daly, M. J., J. D. Rioux, S. F. Schaffner, T. J. Hudson und E. S. Lander (2001). High-resolution haplotype structure in the human genome. *Nature Genetics* 29: 229-232.
- Dalziel, T. (1913). Chronic intestinal enteritis. *British Medical Journal* 2: 1068-1070.
- Dekkers, J. C. und F. Hospital (2002). The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations. *Nature Reviews. Genetics* 3: 22-32.
- Dekkers, J. C. (2004). Commercial application of marker- and gene-assisted selection in livestock: strategies and lessons. *Journal of Animal Science* 82 E-Suppl: E313-328.
- Döffinger, R., S. Y. Patel und D. S. Kumararatne (2006). Host genetic factors and mycobacterial infections: lessons from single gene disorders affecting innate and adaptive immunity. *Microbes and Infection* 8: 1141-1150.
- Donaldson, L., T. Vuocolo, C. Gray, Y. Strandberg, A. Reverter, S. McWilliam, Y. Wang, K. Byrne und R. Tellam (2005). Construction and validation of a Bovine Innate Immune Microarray. *BMC Genomics* 6: 135.
- Donat, K., K. Eulenberger und P. Kampfer (2005). Seroprevalence of paratuberculosis in cattle in Saxony. *Tierärztliche Umschau* 60: 497-501.
- Dreier, S., J. L. Khol, B. Stein, K. Fuchs, S. Gutler und W. Baumgartner (2006). Serological, Bacteriological and Molecularbiological Survey of Paratuberculosis (Johne's Disease) in Austrian Cattle. *Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health* 53: 477-481.
- Drögemüller, C., T. Leeb und O. Distl (2001). PrP genotype frequencies in German breeding sheep and the potential to breed for resistance to scrapie. *The Veterinary Record* 149: 349-352.
- Dukes, T. W., G. J. Glover, B. W. Brooks, J. R. Duncan und M. Swendrowski (1992). Paratuberculosis in saiga antelope (*Saiga tatarica*) and experimental transmission to domestic sheep. *Journal of Wildlife Diseases* 28: 161-170.

- Elzo, M., D. Rae, S. Lanhart, J. Wasdin, W. Dixon und J. Jones (2006). Associations between Reproduction and Preweaning Growth Traits and ELISA Scores for Paratuberculosis in an Angus-Brahman Multibreed Herd of Cattle. 8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, August 13-18, 2006, Belo Horizonte, MG, Brazil, 03-36.
- Feng, J., Y. Li, M. Hashad, E. Schurr, P. Gros, L. G. Adams und J. W. Templeton (1996). Bovine natural resistance associated macrophage protein 1 (*Nramp1*) gene. *Genome Research* 6: 956-964.
- Ferwerda, G., B. J. Kullberg, D. J. de Jong, S. E. Girardin, D. M. Langenberg, R. van Crevel, T. H. Ottenhoff, J. W. Van der Meer und M. G. Netea (2007). *Mycobacterium paratuberculosis* is recognized by Toll-like receptors and NOD2. *Journal of Leukocyte Biology*.
- Fischer, O. A., L. Matlova, L. Dvorska, P. Svastova, J. Bartl, R. T. Weston und I. Pavlik (2004). Blowflies *Calliphora vicina* and *Lucilia sericata* as passive vectors of *Mycobacterium avium* subsp. *avium*, *M. a. paratuberculosis* and *M. a. hominissuis*. *Medical and Veterinary entomology* 18: 116-122.
- Flynn, J. L., J. Chan, K. J. Triebold, D. K. Dalton, T. A. Stewart und B. R. Bloom (1993). An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *The Journal of Experimental Medicine* 178: 2249-2254.
- Franchimont, D., S. Vermeire, H. El Housni, M. Pierik, K. Van Steen, T. Gustot, E. Quertinmont, M. Abramowicz, A. Van Gossum, J. Deviere und P. Rutgeerts (2004). Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299gly polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut* 53: 987-992.
- Freeman, A. R., D. G. Bradley, S. Nagda, J. P. Gibson und O. Hanotte (2006). Combination of multiple microsatellite data sets to investigate genetic diversity and admixture of domestic cattle. *Animal Genetics* 37: 1-9.
- Frelief, P. F., J. W. Templeton, M. Estes, H. W. Whitford und R. D. Kienle (1990). Genetic regulation of *Mycobacterium paratuberculosis* infection in recombinant inbred mice. *Veterinary Pathology* 27: 362-364.
- Fujii, J., K. Otsu, F. Zorzato, S. de Leon, V. K. Khanna, J. E. Weiler, P. J. O'Brien und D. H. MacLennan (1991). Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science* 253: 448-451.
- Fujisawa, T., H. Ikegami, Y. Kawaguchi, E. Yamato, Y. Nakagawa, G. Q. Shen, M. Fukuda und T. Ogihara (1999). Length rather than a specific allele of dinucleotide repeat in the 5' upstream region of the aldose reductase gene is associated with diabetic retinopathy. *Diabetic medicine: a journal of the British Diabetic Association* 16: 1044-1047.
- Gasteiner, J., H. Wenzl, K. Fuchs, U. Jark und W. Baumgartner (1999). Serological cross-sectional study of paratuberculosis in cattle in Austria. *Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health* 46: 457-466.
- Gasteiner, J., M. Awad-Masalmeh und W. Baumgartner (2000). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in cattle in Austria, diagnosis with culture, PCR and ELISA. *Veterinary Microbiology* 77: 339-349.
- Gerlach, G. F. (2002). [Paratuberculosis: the pathogen and routes of infection]. *Deutsche tierärztliche Wochenschrift* 109: 504-506.
- Gerstenberger, J. (2002). Analyse alter DNA zur Ermittlung von Heiratsmustern in einer frühmittelalterlichen Bevölkerung. Dissertation Mathematisch-naturwissenschaftliche Fakultäten, Georg-August Universität Göttingen;
- Gilmour, A. R., B. J. Gogel, B. R. Cullis, S. J. Welham und R. Thompson (2002). ASReml User Guide Release 1.0 VSN International Ltd, Hempstead, HP1 1ES, UK. Online im Internet unter:
- Glowatzki-Mullis, M. L., C. Gaillard, G. Wigger und R. Fries (1995). Microsatellite-based parentage control in cattle. *Animal Genetics* 26: 7-12.

- Gollnick, N. S., R. M. Mitchell, M. Baumgart, H. K. Janagama, S. Sreevatsan und Y. H. Schukken (2007). Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine monocyte-derived macrophages is not affected by host infection status but depends on the infecting bacterial genotype. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 120: 93-105.
- Gonda, M. G., Y. M. Chang, G. E. Shook, M. T. Collins und B. W. Kirkpatrick (2006a). Genetic variation of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* infection in US Holsteins. *Journal of Dairy Science* 89: 1804-1812.
- Gonda, M. G., G. E. Shook, B. W. Kirkpatrick und M. T. Collins (2006b). Quantitative Trait Locus Affecting Susceptibility to *Mycobacterium paratuberculosis* Infection Identified on BTA 20 in US Holsteins. Proceedings of the 30th International Conference on Animal Genetics, Porto Seguro, Brazil., Belo Horizonte, Brazil: CBRA, 2006. ISBN 85-85584-02-5 (www.cbta.org.br), D472.
- Gonda, M. G., B. W. Kirkpatrick, G. E. Shook und 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.
- Goodger, W. J., M. T. Collins, K. V. Nordlund, C. Eisele, J. Pelletier, C. B. Thomas und D. C. Sockett (1996). Epidemiologic study of on-farm management practices associated with prevalence of *Mycobacterium paratuberculosis* infections in dairy cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 208: 1877-1881.
- Govoni, G. und P. Gros (1998). Macrophage NRAMP1 and its role in resistance to microbial infections. *Inflammation Research* 47: 277-284.
- Grant, I. R. (2005). Zoonotic potential of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: the current position. *Journal of Applied Microbiology* 98: 1282-1293.
- Greenstein, R. J. (2003). Is Crohn's disease caused by a mycobacterium? Comparisons with leprosy, tuberculosis, and Johne's disease. *The Lancet Infectious Diseases* 3: 507-514.
- Greenwood, C. M., T. M. Fujiwara, L. J. Boothroyd, M. A. Miller, D. Frappier, E. A. Fanning, E. Schurr und K. Morgan (2000). Linkage of tuberculosis to chromosome 2q35 loci, including *NRAMP1*, in a large aboriginal Canadian family. *American Journal of Human Genetics* 67: 405-416.
- Greig, A., K. Stevenson, V. Perez, A. A. Pirie, J. M. Grant und J. M. Sharp (1997). Paratuberculosis in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *The Veterinary Record* 140: 141-143.
- Grimaldi, M. C. und B. Crouau-Roy (1997). Microsatellite allelic homoplasmy due to variable flanking sequences. *Journal of Molecular Evolution* 44: 336-340.
- Gruenheid, S., E. Pinner, M. Desjardins und P. Gros (1997). Natural resistance to infection with intracellular pathogens: the Nramp1 protein is recruited to the membrane of the phagosome. *The Journal of Experimental Medicine* 185: 717-730.
- Hacker, U., K. Huttner und M. Konow (2004). Investigation of serological prevalence and risk factors of paratuberculosis in dairy farms in the State of Mecklenburg-Westpommern, Germany. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 117: 140-144.
- Haliassos, A., J. C. Chomel, L. Tesson, M. Baudis, J. Kruh, J. C. Kaplan und A. Kitzis (1989). Modification of enzymatically amplified DNA for the detection of point mutations. *Nucleic Acids Research* 17: 3606.
- Hammer, M., J. Mages, H. Dietrich, A. Servatius, N. Howells, A. C. Cato und R. Lang (2006). Dual specificity phosphatase 1 (DUSP1) regulates a subset of LPS-induced genes and protects mice from lethal endotoxin shock. *The Journal of Experimental Medicine* 203: 15-20.
- Hanslik, S., B. Harr, G. Brem und C. Schlötterer (2000). Microsatellite analysis reveals substantial genetic differentiation between contemporary New World and Old World Holstein Friesian populations. *Animal Genetics* 31: 31-38.

- Harder, B., J. Bennewitz, N. Reinsch, G. Thaller, H. Thomsen, C. Kuhn, M. Schwerin, G. Erhardt, M. Förster, F. Reinhardt und E. Kalm (2006). Mapping of quantitative trait loci for lactation persistency traits in German Holstein dairy cattle. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 123: 89-96.
- Harding, R. M., A. J. Boyce und J. B. Clegg (1992). The evolution of tandemly repetitive DNA: recombination rules. *Genetics* 132: 847-859.
- Harris, N. B. und R. G. Barletta (2001). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Veterinary Medicine. *Clinical Microbiology Reviews* 14: 489-512.
- Heinemeyer, T., E. Wingender, I. Reuter, H. Hermjakob, A. E. Kel, O. V. Kel, E. V. Ignatieva, E. A. Ananko, O. A. Podkolodnaya, F. A. Kolpakov, N. L. Podkolodny und N. A. Kolchanov (1998). Databases on transcriptional regulation: TRANSFAC, TRRD and COMPEL. *Nucleic Acids Research* 26: 362-367.
- Hendrick, S., T. Duffield, K. Leslie, K. Lissemore, M. Archambault und D. Kelton (2005a). The prevalence of milk and serum antibodies to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in dairy herds in Ontario. *The Canadian veterinary journal. La revue vétérinaire canadienne*. 46: 1126-1129.
- Hendrick, S. H., D. F. Kelton, K. E. Leslie, K. D. Lissemore, M. Archambault und T. F. Duffield (2005b). Effect of paratuberculosis on culling, milk production, and milk quality in dairy herds. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 227: 1302-1308.
- Henikoff, S. und J. G. Henikoff (1992). Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89: 10915-10919.
- Heringstad, B., Y. M. Chang, D. Gianola und G. Klemetsdal (2005). Genetic analysis of clinical mastitis, milk fever, ketosis, and retained placenta in three lactations of Norwegian red cows. *Journal of Dairy Science* 88: 3273-3281.
- Hermon-Taylor, J., N. Barnes, C. Clarke und C. Finlayson (1998). Grand round - *Mycobacterium paratuberculosis* cervical lymphadenitis, followed five years later by terminal ileitis similar to Crohn's disease. *British Medical Journal* 316: 449-453.
- Hiendleder, S., H. Lewalski, R. Wassmuth und 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.
- Hirschhorn, J. N. (2005). Genetic approaches to studying common diseases and complex traits. *Pediatric Research* 57: 74R-77R.
- Hirschhorn, J. N. und M. J. Daly (2005). Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. *Nature Reviews. Genetics* 6: 95-108.
- Hirst, H. L., F. B. Garry und M. D. Salman (2002). Assessment of test results when using a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of paratuberculosis in repeated samples collected from adult dairy cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 220: 1685-1689.
- Ho, I. C. und S. Y. Pai (2007). GATA-3 - not just for Th2 cells anymore. *Cellular & Molecular Immunology* 4: 15-29.
- Hole, N. H. und M. H. Maclay (1959). The diagnosis of Johne's disease in cattle and the identification of *M. johnei* infestation. *The Veterinary Record* 1959: 1145-1149.
- Homuth, M. (2002). [Diagnostics of paratuberculosis]. *Deutsche tierärztliche Wochenschrift* 109: 516-519.
- Horin, P., I. Rychlik, J. W. Templeton und L. G. Adams (1999). A complex pattern of microsatellite polymorphism within the bovine *NRAMP1* gene. *European Journal of Immunogenetics* 26: 311-313.

- Hornef, M. W., B. H. Normark, A. Vandewalle und S. Normark (2003). Intracellular recognition of lipopolysaccharide by toll-like receptor 4 in intestinal epithelial cells. *The Journal of Experimental Medicine* 198: 1225-1235.
- Hugot, J. P., P. Laurent-Puig, C. Gower-Rousseau, J. M. Olson, J. C. Lee, L. Beaugerie, I. Naom, J. L. Dupas, A. Van Gossum, M. Orholm, C. Bonaiti-Pellie, J. Weissenbach, C. G. Mathew, J. E. Lennard-Jones, A. Cortot, J. F. Colombel und G. Thomas (1996). Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature* 379: 821-823.
- Hugot, J. P., M. Chamaillard, H. Zouali, S. Lesage, J. P. Cezard, J. Belaiche, S. Almer, C. Tysk, C. A. O'Morain, M. Gassull, V. Binder, Y. Finkel, A. Cortot, R. Modigliani, P. Laurent-Puig, C. Gower-Rousseau, J. Macry, J. F. Colombel, M. Sahbatou und G. Thomas (2001). Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411: 599-603.
- Hunter, N., L. Moore, B. D. Hosie, W. S. Dingwall und A. Greig (1997). Association between natural scrapie and PrP genotype in a flock of Suffolk sheep in Scotland. *The Veterinary Record* 140: 59-63.
- Hunter, N. (2003). Scrapie and experimental BSE in sheep. *British Medical Bulletin* 66: 171-183.
- Ibeagha-Awemu, E. M. und G. Erhardt (2005). Genetic structure and differentiation of 12 African Bos indicus and Bos taurus cattle breeds, inferred from protein and microsatellite polymorphisms. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 122: 12-20.
- 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 und Y. Sugimoto (2004). A comprehensive genetic map of the cattle genome based on 3802 microsatellites. *Genome Research* 14: 1987-1998.
- Inohara, N. und G. Nunez (2003). NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nature Reviews. Immunology*. 3: 371-382.
- Jakobsen, M. B., L. Alban und S. S. Nielsen (2000). A cross-sectional study of paratuberculosis in 1155 Danish dairy cows. *Preventive Veterinary Medicine* 46: 15-27.
- Janeway, C. A., Jr. und R. Medzhitov (1998). Introduction: the role of innate immunity in the adaptive immune response. *Seminars in Immunology* 10: 349-350.
- Johnson-Ifeorundu, Y. und J. B. Kaneene (1999). Distribution and environmental risk factors for paratuberculosis in dairy cattle herds in Michigan. *American Journal of Veterinary Research* 60: 589-596.
- Johnson-Ifeorundu, Y. J. und J. B. Kaneene (1998). Management-related risk factors for M. paratuberculosis infection in Michigan, USA, dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine* 37: 41-54.
- Johnson-Ifeorundu, Y. J., J. B. Kaneene, D. J. Sprecher, J. C. Gardiner und J. W. Lloyd (2000). The effect of subclinical *Mycobacterium paratuberculosis* infection on days open in Michigan, USA, dairy cows. *Preventive Veterinary Medicine* 46: 171-181.
- Jubb, T. und J. Galvin (2000). Herd testing to control bovine Johne's disease. *Veterinary Microbiology* 77: 423-428.
- Juste, R. A., J. C. Marco, C. Saez de Ocariz und J. J. Aduriz (1991). Comparison of different media for the isolation of small ruminant strains of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Veterinary Microbiology* 28: 385-390.
- Kang, T. J. und G. T. Chae (2001). Detection of Toll-like receptor 2 (TLR2) mutation in the lepromatous leprosy patients. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 31: 53-58.
- Kappes, S. M., J. W. Keele, R. T. Stone, R. A. McGraw, T. S. Sonstegard, T. P. Smith, N. L. Lopez-Corrales und C. W. Beattie (1997). A second-generation linkage map of the bovine genome. *Genome Research* 7: 235-249.

- Kehrli, M. E., Jr., F. C. Schmalstieg, D. C. Anderson, M. J. Van der Maaten, B. J. Hughes, M. R. Ackermann, C. L. Wilhelmsen, G. B. Brown, M. G. Stevens und C. A. Whetstone (1990). Molecular definition of the bovine granulocytopeny syndrome: identification of deficiency of the Mac-1 (CD11b/CD18) glycoprotein. *American Journal of Veterinary Research* 51: 1826-1836.
- Khalifeh, M. S. und J. R. Stabel (2004a). Upregulation of transforming growth factor-beta and interleukin-10 in cows with clinical Johne's disease. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 99: 39-46.
- Khalifeh, M. S. und J. R. Stabel (2004b). Effects of gamma interferon, interleukin-10, and transforming growth factor beta on the survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in monocyte-derived macrophages from naturally infected cattle. *Infection and Immunity* 72: 1974-1982.
- Khatkar, M. S., K. R. Zenger, M. Hobbs, R. J. Hawken, J. A. Cavanagh, W. Barris, A. E. McClintock, S. McClintock, P. C. Thomson, B. Tier, F. W. Nicholas und H. W. Raadsma (2007). A primary assembly of a bovine haplotype block map based on a 15,036-single-nucleotide polymorphism panel genotyped in holstein-friesian cattle. *Genetics* 176: 763-772.
- Kiberstis, P. und L. Roberts (2002). It's Not Just the Genes. *Science* 296: 685.
- Kim, P. J., S. Y. Pai, M. Brigl, G. S. Besra, J. Gumperz und I. C. Ho (2006). GATA-3 regulates the development and function of invariant NKT cells. *Journal of Immunology* 177: 6650-6659.
- Klug, S. J., R. Bender, M. Blettner und S. Lange (2007). Wichtige epidemiologische Studientypen. *Deutsche medizinische Wochenschrift* 132 Suppl 1: e45-47.
- Koets, A. P., G. Adugna, L. L. Janss, H. J. van Weering, C. H. Kalis, G. H. Wentink, V. P. Rutten und Y. H. Schukken (2000). Genetic variation of susceptibility to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 83: 2702-2708.
- Koets, A. P., V. P. Rutten, M. de Boer, D. Bakker, P. Valentin-Weigand und W. van Eden (2001). Differential changes in heat shock protein-, lipoarabinomannan-, and purified protein derivative-specific immunoglobulin G1 and G2 isotype responses during bovine *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection. *Infection and Immunity* 69: 1492-1498.
- Krutzik, S. R. und R. L. Modlin (2004). The role of Toll-like receptors in combating mycobacteria. *Seminars in Immunology* 16: 35-41.
- Kühn, C., J. Bennewitz, N. Reinsch, N. Xu, H. Thomsen, C. Looft, G. A. Brockmann, M. Schwerin, C. Weimann, S. Hiendler, G. Erhardt, I. Medjugorac, M. Forster, B. Brenig, F. Reinhardt, R. Reents, I. Russ, G. Averdunk, J. Blumel und E. Kalm (2003). Quantitative trait loci mapping of functional traits in the German Holstein cattle population. *Journal of Dairy Science* 86: 360-368.
- Kumar, N., A. Mitra, I. Ganguly, R. Singh, S. M. Deb, S. K. Srivastava und A. Sharma (2005). Lack of association of brucellosis resistance with (GT)₁₃ microsatellite allele at 3' UTR of *NRAMP1* gene in Indian zebu (*Bos indicus*) and crossbred (*Bos indicus* x *Bos taurus*) cattle. *Veterinary Microbiology* 111: 139-143.
- Landegren, U., M. Nilsson und P. Y. Kwok (1998). Reading bits of genetic information: methods for single-nucleotide polymorphism analysis. *Genome Research* 8: 769-776.
- Larsen, A. B., R. S. Merkal und R. C. Cutlip (1975). Age of cattle as related to resistance to infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. *American Journal of Veterinary Research* 36: 255-257.
- Lee, H., J. R. Stabel und M. E. Kehrli, Jr. (2001). Cytokine gene expression in ileal tissues of cattle infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 82: 73-85.

- Leveque, G., V. Forgetta, S. Morroll, A. L. Smith, N. Bumstead, P. Barrow, J. C. Loredó-Osti, K. Morgan und D. Malo (2003). Allelic variation in TLR4 is linked to susceptibility to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in chickens. *Infection and Immunity* 71: 1116-1124.
- Levinson, G. und G. A. Gutman (1987). Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Molecular Biology and Evolution* 4: 203-221.
- Li, Y. C., A. B. Korol, T. Fahima, A. Beiles und E. Nevo (2002). Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology* 11: 2453-2465.
- Li, Y. C., A. B. Korol, T. Fahima und E. Nevo (2004). Microsatellites within genes: structure, function, and evolution. *Molecular Biology and Evolution* 21: 991-1007.
- Liebler-Tenorio, E. M. und R. Pabst (2006). MALT structure and function in farm animals. *Veterinary Research* 37: 257-280.
- Lien, E. und R. R. Ingalls (2002). Toll-like receptors. *Critical care medicine* 30: S1-S11.
- Litt, M. und 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.
- Long, A. D. und C. H. Langley (1999). The power of association studies to detect the contribution of candidate genetic loci to variation in complex traits. *Genome Research* 9: 720-731.
- Lugton, I. (1999). Mucosa-associated lymphoid tissues as sites for uptake, carriage and excretion of tubercle bacilli and other pathogenic mycobacteria. *Immunology and Cell Biology* 77: 364-372.
- 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, Justus-Liebig-Universität Giessen; VVB Laufersweiler Verlag.
- Lühken, G., A. Buschmann, H. Brandt, M. Eiden, M. H. Groschup und G. Erhardt (2007). Epidemiological and genetical differences between classical and atypical scrapie cases. *Veterinary Research* 38: 65-80.
- Lyons, D. T., A. E. Freeman und A. L. Kuck (1991). Genetics of health traits in Holstein cattle. *Journal of Dairy Science* 74: 1092-1100.
- MacMillan, J. C., R. G. Snell, A. Tyler, G. D. Houlihan, I. Fenton, J. P. Cheadle, L. P. Lazarou, D. J. Shaw und P. S. Harper (1993). Molecular analysis and clinical correlations of the Huntington's disease mutation. *Lancet* 342: 954-958.
- Marshall, E. (2002). Lupus: mysterious disease holds its secrets tight. *Science* 296: 689-691.
- Marx, J. (2002). Unraveling the causes of diabetes. *Science* 296: 686-689.
- McClure, H. M., R. J. Chiodini, D. C. Anderson, R. B. Swenson, W. R. Thayer und J. A. Coutu (1987). *Mycobacterium paratuberculosis* infection in a colony of stump-tail macaques (*Macaca arctoides*). *The Journal of Infectious Diseases*. 155: 1011-1019.
- McDonald, W. L., S. E. Ridge, A. F. Hope und R. J. Condon (1999). Evaluation of diagnostic tests for Johne's disease in young cattle. *Australian Veterinary Journal* 77: 113-119.
- McGuire, K., M. Jones, D. Werling, J. L. Williams, E. J. Glass und O. Jann (2006). Radiation hybrid mapping of all 10 characterized bovine Toll-like receptors. *Animal Genetics* 37: 47-50.
- Means, T. K., S. Wang, E. Lien, A. Yoshimura, D. T. Golenbock und M. J. Fenton (1999). Human toll-like receptors mediate cellular activation by *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Immunology* 163: 3920-3927.

- Means, T. K., B. W. Jones, A. B. Schromm, B. A. Shurtleff, J. A. Smith, J. Keane, D. T. Golenbock, S. N. Vogel und M. J. Fenton (2001). Differential effects of a Toll-like receptor antagonist on *Mycobacterium tuberculosis*-induced macrophage responses. *Journal of Immunology* 166: 4074-4082.
- Medzhitov, R. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nature Reviews. Immunology*. 1: 135-145.
- Merika, M. und S. H. Orkin (1993). DNA-binding specificity of GATA family transcription factors. *Molecular and cellular biology* 13: 3999-4010.
- Merkal, R. S., K. E. Kopecky und A. B. Larsen (1970). Immunologic mechanisms in bovine paratuberculosis. *American Journal of Veterinary Research* 31: 475-485.
- Momotani, E., D. L. Whipple, A. B. Thiermann und N. F. Cheville (1988). Role of M cells and macrophages in the entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* into domes of ileal Peyer's patches in calves. *Veterinary Pathology* 25: 131-137.
- Montgomery, G. W. und J. A. Sise (1990). Extraction of DNA from sheep white blood cells. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 33: 437-441.
- Mortensen, H., S. S. Nielsen und P. Berg (2004). Genetic variation and heritability of the antibody response to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Danish Holstein cows. *Journal of Dairy Science* 87: 2108-2113.
- Motiwala, A. S., H. K. Janagama, M. L. Paustian, X. Zhu, J. P. Bannantine, V. Kapur und S. Sreevatsan (2006a). Comparative transcriptional analysis of human macrophages exposed to animal and human isolates of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* with diverse genotypes. *Infection and Immunity* 74: 6046-6056.
- Motiwala, A. S., L. Li, V. Kapur und S. Sreevatsan (2006b). Current understanding of the genetic diversity of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Microbes and Infection* 8: 1406-1418.
- Mühlhardt, C. (2003). *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*, 4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin; Seiten 130; 199-201.
- Murray, P. J. und R. A. Young (1999). Increased antimycobacterial immunity in interleukin-10-deficient mice. *Infection and Immunity* 67: 3087-3095.
- Muskens, J., H. W. Barkema, E. Russchen, K. van Maanen, Y. H. Schukken und D. Bakker (2000). Prevalence and regional distribution of paratuberculosis in dairy herds in The Netherlands. *Veterinary Microbiology* 77: 253-261.
- Muskens, J., M. H. Mars, A. R. Elbers, K. Van Maanen und D. Bakker (2003). The results of using faecal culture as confirmation test of paratuberculosis-seropositive dairy cattle. *Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health* 50: 231-234.
- Naser, S. A., D. Schwartz und I. Shafran (2000). Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from breast milk of Crohn's disease patients. *The American Journal of Gastroenterology* 95: 1094-1095.
- Naser, S. A., G. Ghobrial, C. Romero und J. F. Valentine (2004). Culture of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from the blood of patients with Crohn's disease. *Lancet* 364: 1039-1044.
- Ng, P. C. und S. Henikoff (2001). Predicting deleterious amino acid substitutions. *Genome Research* 11: 863-874.
- Ng, P. C. und S. Henikoff (2002). Accounting for human polymorphisms predicted to affect protein function. *Genome Research* 12: 436-446.
- Ng, P. C. und S. Henikoff (2003). SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Research* 31: 3812-3814.

- Nicholas, K. B. und H. B. Nicholas (2000). 2.6.002 GeneDoc V 2.6.002: A tool for editing and annotating multiple sequence alignments. Distributed by the author. Online im Internet unter: <http://www.psc.edu/biomed/genedoc>.
- Nielsen, S. S., Y. T. Grohn und C. Enevoldsen (2002a). Variation of the milk antibody response to paratuberculosis in naturally infected dairy cows. *Journal of Dairy Science* 85: 2795-2802.
- Nielsen, S. S., C. Gronbaek, J. F. Agger und H. Houe (2002b). Maximum-likelihood estimation of sensitivity and specificity of ELISAs and faecal culture for diagnosis of paratuberculosis. *Preventive Veterinary Medicine* 53: 191-204.
- Nielsen, S. S. und A. K. Ersboll (2006). Age at occurrence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in naturally infected dairy cows. *Journal of Dairy Science* 89: 4557-4566.
- Nishino, M., H. Ikegami, T. Fujisawa, Y. Kawaguchi, Y. Kawabata, M. Shintani, M. Ono und T. Ogiwara (2005). Functional polymorphism in Z-DNA-forming motif of promoter of SLC11A1 gene and type 1 diabetes in Japanese subjects: association study and meta-analysis. *Metabolism* 54: 628-633.
- Nordlund, K. V., W. J. Goodger, J. Pelletier und M. T. Collins (1996). Associations between subclinical paratuberculosis and milk production, milk components, and somatic cell counts in dairy herds. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 208: 1872-1876.
- Ogura, Y., D. K. Bonen, N. Inohara, D. L. Nicolae, F. F. Chen, R. Ramos, H. Britton, T. Moran, R. Karaliuskas, R. H. Duerr, J. P. Achkar, S. R. Brant, T. M. Bayless, B. S. Kirschner, S. B. Hanauer, G. Nunez und J. H. Cho (2001). A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411: 603-606.
- Ogura, Y., S. Lala, W. Xin, E. Smith, T. A. Dowds, F. F. Chen, E. Zimmermann, M. Tretiakova, J. H. Cho, J. Hart, J. K. Greenson, S. Keshav und G. Nunez (2003). Expression of NOD2 in Paneth cells: a possible link to Crohn's ileitis. *Gut* 52: 1591-1597.
- OIE 2006 World Organisation for Animal Health (OIE) - Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Online im Internet unter: http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00045.htm (letzter Zugriff 15.11.2007)
- Ott, S. L., S. J. Wells und B. A. Wagner (1999). Herd-level economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations. *Preventive Veterinary Medicine* 40: 179-192.
- Paixao, T. A., C. Ferreira, A. M. Borges, D. A. Oliveira, A. P. Lage und R. L. Santos (2006). Frequency of bovine *Nramp1* (*Slc11a1*) alleles in Holstein and Zebu breeds. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 109: 37-42.
- Paixao, T. A., F. P. Poester, A. V. Carvalho Neta, A. M. Borges, A. P. Lage und R. L. Santos (2007). NRAMP1 3' untranslated region polymorphisms are not associated with natural resistance to *Brucella abortus* in cattle. *Infection and Immunity* 75: 2493-2499.
- Palmer, M. V., W. C. Stoffregen, J. G. Carpenter und J. R. Stabel (2005). Isolation of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* (Map) from Feral Cats on a Dairy Farm with Map-infected Cattle. *Journal of Wildlife Diseases* 41: 629-635.
- Payne, J. und J. Rankin (1961). The Pathogenesis of Experimental Johne's Disease in Calves. *Research in Veterinary Science*. 2: 167-174.
- Peischl, T., A. W. Kuss, E. Melchinger-Wild und H. Geldermann (2005). Nine porcine microsatellite loci tested for size homoplasmy in genetically diverse breeds. *Animal Genetics* 36: 244-247.
- Peter, C. (2005). Molekulargenetische Charakterisierung von Schafrassen Europas und des Nahen Ostens auf der Basis von Mikrosatelliten. Dissertation Fachbereich Veterinärmedizin, Justus-Liebig-Universität Giessen; VVB Laufersweiler Verlag.
- Peter, C., E.-M. Prinzenberg, G. Erhardt und the ECONOGENE Consortium (2005). Null allele at the *OarAE129* locus and corresponding allele frequencies in five German sheep breeds. *Animal Genetics* 36: 92.

- Prinzenberg, E.-M. (1998). Entwicklung von Gendiagnoseverfahren für seltene Milchproteinvarianten beim Rind unter Berücksichtigung des Vorkommens bei vom Aussterben bedrohten Rassen. Dissertation Fachbereich Veterinärmedizin, Justus-Liebig Universität Gießen; Fachverlag Köhler.
- Raadsma, H. und K. Fullard (2006). QTL mapping and Gene Markers for Resistance to Infectious Diseases in Sheep and Cattle. 8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, August 13-18, 2006, Belo Horizonte, MG, Brazil, 15-01.
- Raizman, E. A., S. J. Wells, S. M. Godden, R. F. Bey, M. J. Oakes, D. C. Bentley und K. E. Olsen (2004). The distribution of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in the environment surrounding Minnesota dairy farms. *Journal of Dairy Science* 87: 2959-2966.
- Ramirez-Valverde, R., I. Misztal und J. K. Bertrand (2001). Comparison of threshold vs linear and animal vs sire models for predicting direct and maternal genetic effects on calving difficulty in beef cattle. *Journal of Animal Science* 79: 333-338.
- Rankin, J. D. (1961). The experimental infection of cattle with *Mycobacterium johnei*. III. Calves maintained in an infectious environment. *Journal of Comparative Pathology* 71: 10-15.
- Reddacliff, L. A., K. Beh, H. McGregor und R. J. Whittington (2005). A preliminary study of possible genetic influences on the susceptibility of sheep to Johne's disease. *Australian Veterinary Journal* 83: 435-441.
- Richter, E., J. Wessling, N. Lugerling, W. Domschke und S. Rusch-Gerdes (2002). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in a patient with HIV, Germany. *Emerging infectious Diseases* 8: 729-731.
- Romero-Gomez, M., M. A. Montes-Cano, M. A. Otero-Fernandez, B. Torres, D. Sanchez-Munoz, F. Aguilar, N. Barroso, L. Gomez-Izquierdo, V. M. Castellano-Megias, A. Nunez-Roldan, J. Aguilar-Reina und M. F. Gonzalez-Escribano (2004). SLC11A1 promoter gene polymorphisms and fibrosis progression in chronic hepatitis C. *Gut* 53: 446-450.
- Romero, C., A. Hamdi, J. F. Valentine und S. A. Naser (2005). Evaluation of Surgical Tissue From Patients with Crohn's Disease for the Presence of *Mycobacterium avium* Subspecies *paratuberculosis* DNA by In Situ Hybridization and Nested Polymerase Chain Reaction. *Inflammatory Bowel Diseases* 11: 116-125.
- Rothuizen, J., G. J. Ubbink, P. van Zon, E. Teske, T. S. van den Ingh und V. Yuzbasiyan-Gurkan (1999). Diagnostic value of a microsatellite DNA marker for copper toxicosis in West-European Bedlington terriers and incidence of the disease. *Animal Genetics* 30: 190-194.
- Rozen, S. und H. J. Skaletsky (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386- Online im Internet unter: <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/input.htm>.
- Salem, M., A. A. Zeid, D. Hassan, A. El-Sayed und M. Zschoeck (2005). Studies on Johne's disease in Egyptian cattle. *Journal of Veterinary Medicine* 52: 134-137.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch und T. Maniatis (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2nd Edition., Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Sanger, F., S. Nicklen und A. R. Coulson (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74: 5463-5467.
- Schlötterer, C. (2000). Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* 109: 365-371.
- Schönenbrücher, H., A. Abdulmawjood und M. Bülte (2006). Real Time-PCR-assay for the detection of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* - Development and validation. *Fleischwirtschaft* 86: 123-125.

- Sechi, L. A., A. M. Scanu, P. Molicotti, S. Cannas, M. Mura, G. Dettori, G. Fadda und S. Zanetti (2005). Detection and Isolation of *Mycobacterium avium* Subspecies *paratuberculosis* from Intestinal Mucosal Biopsies of Patients with and without Crohn's Disease in Sardinia. *The American Journal of Gastroenterology* 100: 1529-1536.
- Seeger, T. (2007). Persönliche Kommunikation.
- Seeger, T., P. Berisha, K. Köhler und K. Doll (2007). Laparoskopisch kontrollierte Biopsie von Darmlymphknoten zur Paratuberkulose-Frühdagnostik bei Kälbern. Vortrag 4. Buiatrik-Tagung, München 2007.
- Shanahan, F. und J. O'Mahony (2005). The mycobacteria story in Crohn's disease. *American Journal of Gastroenterology* 100: 1537-1538.
- Sharma, B. S., I. Leyva, F. Schenkel und 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.
- Simianer, H. und S. König (2002). Ist Zucht auf Krankheitsresistenz erfolgreich? *Züchtungskunde* 74: 413-425.
- Singh, N., S. N. Kala, V. S. Vihan und V. S. Singh (1990). Genetic study on susceptibility to Johne's disease in goats. *Indian Journal of Animal Sciences* 60: 1163-1165.
- Skovgaard, K., S. N. Grell, P. M. Heegaard, G. Jungersen, C. B. Pudrith und P. M. Coussens (2006). Differential expression of genes encoding CD30L and P-selectin in cattle with Johne's disease: progress toward a diagnostic gene expression signature. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 112: 210-224.
- Snowder, G. D., L. D. Van Vleck, L. V. Cundiff und G. L. Bennett (2005). Influence of breed, heterozygosity, and disease incidence on estimates of variance components of respiratory disease in preweaned beef calves. *Journal of Animal Science* 83: 1247-1261.
- Sonstegard, T. S., N. L. Lopez-Corrales, S. M. Kappes, C. W. Beattie und T. P. Smith (1997). Comparative mapping of human chromosome 2 identifies segments of conserved synteny near the bovine mh locus. *Mammalian Genome* 8: 751-755.
- Sonstegard, T. S., W. M. Garrett, G. L. Bennett, S. M. Kappes, D. S. Zarlenga und L. C. Gasbarre (2000). Mapping of seven bovine cytokine genes involved in T-lymphocyte growth, differentiation and immune response. *Animal Genetics* 31: 406-408.
- Stabel, J. R. (1996). Production of gamma-interferon by peripheral blood mononuclear cells: An important diagnostic tool for detection of subclinical paratuberculosis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 8: 345-350.
- Stabel, J. R. (2000). Transitions in immune responses to *Mycobacterium paratuberculosis*. *Veterinary Microbiology* 77: 465-473.
- Stabel, J. R., S. J. Wells und B. A. Wagner (2002). Relationships between fecal culture, ELISA, and bulk tank milk test results for Johne's disease in US dairy herds. *Journal of Dairy Science* 85: 525-531.
- Stone, R. T., J. C. Pulido, G. M. Duyk, S. M. Kappes, J. W. Keele und C. W. Beattie (1995). A small-insert bovine genomic library highly enriched for microsatellite repeat sequences. *Mammalian Genome* 6: 714-724.
- Sugawara, I., H. Yamada, H. Kaneko, S. Mizuno, K. Takeda und S. Akira (1999). Role of interleukin-18 (IL-18) in mycobacterial infection in IL-18-gene-disrupted mice. *Infection and Immunity* 67: 2585-2589.
- Sugawara, I., H. Yamada, S. Mizuno und Y. Iwakura (2000). IL-4 is required for defense against mycobacterial infection. *Microbiology and immunology* 44: 971-979.

- Sweeney, R. W., R. H. Whitlock, A. N. Hamir, A. E. Rosenberger und S. A. Herr (1992a). Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* after oral inoculation in uninfected cattle. *American Journal of Veterinary Research* 53: 1312-1314.
- Sweeney, R. W., R. H. Whitlock und A. E. Rosenberger (1992b). *Mycobacterium paratuberculosis* cultured from milk and supramammary lymph nodes of infected asymptomatic cows. *Journal of Clinical Microbiology* 30: 166-171.
- Sweeney, R. W. (1996). Transmission of paratuberculosis. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*. 12: 305-312.
- Sweeney, R. W., D. E. Jones, P. Habecker und P. Scott (1998). Interferon-gamma and interleukin 4 gene expression in cows infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *American Journal of Veterinary Research* 59: 842-847.
- Sweeney, R. W., J. Uzonna, R. H. Whitlock, P. L. Habecker, P. Chilton und P. Scott (2006a). Tissue predilection sites and effect of dose on *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* organism recovery in a short-term bovine experimental oral infection model. *Research in Veterinary Science* 80: 253-259.
- Sweeney, R. W., R. H. Whitlock, S. McAdams und T. Fyock (2006b). Longitudinal study of ELISA seroreactivity to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in infected cattle and culture-negative herd mates. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 18: 2-6.
- Tachida, H. und M. Izuka (1992). Persistence of repeated sequences that evolve by replication slippage. *Genetics* 131: 471-478.
- Tamura, K., Y. Fukuda, H. Sashio, N. Takeda, H. Bamba, T. Kosaka, S. Fukui, K. Sawada, K. Tamura, M. Satomi, T. Yamada, T. Yamamura, Y. Yamamoto, J. Furuyama, H. Okamura und T. Shimoyama (2002). IL18 polymorphism is associated with an increased risk of Crohn's disease. *Journal of Gastroenterology* 37 Suppl 14: 111-116.
- Taylor, K. H. (2004). Genetic Analyses of Bovine *CARD15*, a Putative Disease Resistance Gene. Dissertation Texas A&M University, elektronische Dissertation, online im Internet unter: <https://txspace.tamu.edu/bitstream/handle/1969.1/219/etd-tamu-2004A-GENE-Taylor-1.pdf?sequence=1>.
- Taylor, K. H., J. F. Taylor, S. N. White und J. E. Womack (2006). Identification of genetic variation and putative regulatory regions in bovine *CARD15*. *Mammalian Genome* 17: 892-901.
- Thomas, P. D. und A. Kejariwal (2004). Coding single-nucleotide polymorphisms associated with complex vs. Mendelian disease: evolutionary evidence for differences in molecular effects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 15398-15403.
- Toft, N., S. S. Nielsen und E. Jorgensen (2005). Continuous-data diagnostic tests for paratuberculosis as a multistage disease. *Journal of Dairy Science* 88: 3923-3931.
- Uribe, H. A., B. W. Kennedy, S. W. Martin und D. F. Kelton (1995). Genetic parameters for common health disorders of Holstein cows. *Journal of Dairy Science* 78: 421-430.
- van Roermund, H. J., D. Bakker, P. T. Willemsen und M. C. de Jong (2007). Horizontal transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cattle in an experimental setting: calves can transmit the infection to other calves. *Veterinary Microbiology* 122: 270-279.
- Verna, A. E., C. Garcia-Pariente, M. Munoz, O. Moreno, J. F. Garcia-Marin, M. I. Romano, F. Paolicchi und V. Perez (2007). Variation in the immuno-pathological responses of lambs after experimental infection with different strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Zoonoses Public Health* 54: 243-252.
- Vidal, S. M., D. Malo, K. Vogan, E. Skamene und P. Gros (1993). Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for Bcg. *Cell* 73: 469-485.

- Vincze, T., J. Posfai und R. Roberts (2003). NEB cutter: A program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Research* 31: 3688-3691.
- Vogel, O. (1970). Paratuberkulose bei einem Hund. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 90: 419-421.
- vom Schloß, A. (2000). Auswertung eines Sanierungsverfahrens zur Bekämpfung der Paratuberkulose in Rinderbeständen in Nordrhein-Westfalen. Dissertation Tierärztliche Hochschule Hannover;
- Wang, G. J., P. Yang und H. G. Xie (2006). Gene variants in noncoding regions and their possible consequences. *Pharmacogenomics* 7: 203-209.
- Waters, W. R., J. R. Stabel, R. E. Sacco, J. A. Harp, B. A. Pesch und M. J. Wannemuehler (1999). Antigen-specific B-cell unresponsiveness induced by chronic *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection of cattle. *Infection and Immunity* 67: 1593-1598.
- Waters, W. R., J. M. Miller, M. V. Palmer, J. R. Stabel, D. E. Jones, K. A. Koistinen, E. M. Steadham, M. J. Hamilton, W. C. Davis und J. P. Bannantine (2003). Early induction of humoral and cellular immune responses during experimental *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection of calves. *Infection and Immunity* 71: 5130-5138.
- Weiss, D. J., O. A. Evanson, A. Moritz, M. Q. Deng und M. S. Abrahamsen (2002). Differential responses of bovine macrophages to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium*. *Infection and Immunity* 70: 5556-5561.
- Weiss, M. J. und S. H. Orkin (1995). GATA transcription factors: key regulators of hematopoiesis. *Experimental hematology* 23: 99-107.
- Werling, D. und T. W. Jungi (2003). TOLL-like receptors linking innate and adaptive immune response. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 91: 1-12.
- Westaway, D., V. Zuliani, C. M. Cooper, M. Da Costa, S. Neuman, A. L. Jenny, L. Detwiler und S. B. Prusiner (1994). Homozygosity for prion protein alleles encoding glutamine-171 renders sheep susceptible to natural scrapie. *Genes & Development* 8: 959-969.
- White, P. J., R. H. Borts und M. C. Hirst (1999). Stability of the human fragile X (CGG)(n) triplet repeat array in *Saccharomyces cerevisiae* deficient in aspects of DNA metabolism. *Molecular and cellular biology* 19: 5675-5684.
- White, S. N., S. R. Kata und J. E. Womack (2003a). Comparative fine maps of bovine toll-like receptor 4 and toll-like receptor 2 regions. *Mammalian Genome* 14: 149-155.
- White, S. N., K. H. Taylor, C. A. Abbey, C. A. Gill und J. E. Womack (2003b). Haplotype variation in bovine Toll-like receptor 4 and computational prediction of a positively selected ligand-binding domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 10364-10369.
- Whitlock, R. H. und C. Buergelt (1996). Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology). *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*. 12: 345-356.
- Whittington, R. J., I. B. Marsh, P. J. Taylor, D. J. Marshall, C. Taragel und L. A. Reddacliff (2003). Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from environmental samples collected from farms before and after destocking sheep with paratuberculosis. *Australian Veterinary Journal* 81: 559-563.
- Williams, E. S., S. P. Snyder und K. L. Martin (1983). Pathology of spontaneous and experimental infection of North American wild ruminants with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Veterinary Pathology* 20: 274-290.
- Winterhoff, C. (2000). Paratuberkulose-Diagnostik in Milch: Erreger- und Antikörpernachweis mittels PCR und ELISA. Dissertation Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen, Tierärztliche Hochschule Hannover;
- Withers, F. (1959). Incidence of the Disease. *The Veterinary Record* 71: 1150-1153.

- Wolf, E. (2005). Nutztiere - quo vadite? Neue Wege durch funktionale Genomanalyse. Online im Internet unter: http://www.fugato-forschung.de/download.php/29/nutztiere_wolf_neu.pdf.
- Wu, C. W., M. Livesey, S. K. Schmoller, E. J. Manning, H. Steinberg, W. C. Davis, M. J. Hamilton und A. M. Talaat (2007). Invasion and persistence of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis during early stages of Johne's disease in calves. *Infection and Immunity* 75: 2110-2119.
- Yamamura, M., K. Uyemura, R. J. Deans, K. Weinberg, T. H. Rea, B. R. Bloom und R. L. Modlin (1991). Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science* 254: 277-279.
- Ye, S., S. Dhillon, X. Ke, A. R. Collins und I. N. Day (2001). An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Research* 29: E88-88.
- Yeh, C., R. Yang, T. Boyle, Z.-H. Ye und J. Miao (1997). POPGENE V1.32. POPGENE- The user friendly freeware for population genetic analysis. Online im Internet unter:
- Zaahl, M. G., T. A. Winter, L. Warnich und M. J. Kotze (2006). The -237C-->T promoter polymorphism of the SLC11A1 gene is associated with a protective effect in relation to inflammatory bowel disease in the South African population. *International Journal of Colorectal Disease* 21: 402-408.
- Zhao, Z., Y. X. Fu, D. Hewett-Emmett und E. Boerwinkle (2003). Investigating single nucleotide polymorphism (SNP) density in the human genome and its implications for molecular evolution. *Gene* 312: 207-213.
- Zondervan, K. T. und L. R. Cardon (2004). The complex interplay among factors that influence allelic association. *Nature Reviews. Genetics* 5: 89-100.
- Zwick, L. S., T. F. Walsh, R. Barbiers, M. T. Collins, M. J. Kinsel und R. D. Murnane (2002). Paratuberculosis in a mandrill (*Papio sphinx*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians* 14: 326-328.

9 Anhang

Anhang Tabelle A: DNA-Proben von Rindern verschiedener Rassen, die zur Suche von Polymorphismen eingesetzt wurden.

Rasse (Probenanzahl [n])	Kennzeichnung der Probe
Gelbvieh (2)	Fracht (5)
	Indult (25)
Pinzgauer (2)	Lotto
	Midas
Limousin (1)	2347-2006
Angler (2)	A7
	A18
Brown Swiss (2)	S3
	S5
Braunvieh (1)	169-2006
Dt. Schwarzbunte (2)	D7
	D9
Jersey (3)	Liane (11)
	Madonna (13)
	Anneliese (1)
	Puppe (34)
Anatolisches Schwarzvieh (2)	AB 4
	AB 5
Ostanatolisches Rotvieh (2)	OARV 2
	OARV 5
Brahman (4)	Bh 151
	Bh 157
	Bh 171
	Bh 187
N'Dama (3)	ND 7
	ND 13
	ND 15
Dt. Angus (2)	DA Carl
	DA Pauker
Dt. Fleckvieh (3)	Honannes
	Max
	167-2006

Anhang Tabelle B: Allelfrequenzen (%) der Mikrosatelliten in der Vergleichsgruppe (Dt. Angus, Dt. Holstein, Dt. Fleckvieh, Jersey).

Rasse	Ermittelte Allele und Allelfrequenzen (%)													
<i>BB704</i>														
	118	120	146	148	150	154	158							
Dt. Angus	0,00	0,00	2,50	48,12	0,63	0,00	48,75							
Dt. Fleckvieh	0,00	0,00	0,57	39,66	1,15	1,15	57,47							
Dt. Holstein	0,00	0,00	0,96	54,81	0,00	12,50	31,73							
Jersey	0,00	0,00	0,00	58,97	0,00	0,00	41,03							
<i>BMC9006</i>														
	229	231	233	235										
Dt. Angus	4,84	93,08	1,04	1,04										
Dt. Fleckvieh	0,98	98,54	0,00	0,48										
Dt. Holstein	0,00	99,40	0,00	0,60										
Jersey	0,00	100,00	0,00	0,00										
<i>BMS1617</i>														
	148	150	152	156	158	160	162	164	166					
Dt. Angus	46,34	1,83	0,61	18,29	3,05	23,17	4,27	1,22	1,22					
Dt. Fleckvieh	15,52	0,00	0,57	8,62	6,34	62,64	5,17	0,57	0,57					
Dt. Holstein	43,44	0,00	0,82	21,31	2,46	21,31	4,10	4,92	1,64					
Jersey	7,29	0,00	0,00	10,42	12,50	57,29	11,46	0,00	1,04					
<i>BOBT24</i>														
	151	153	155	157	159	161								
Dt. Angus	0,00	70,89	3,16	17,09	0,00	8,86								
Dt. Fleckvieh	0,72	37,68	2,90	24,64	3,62	30,44								
Dt. Holstein	4,46	63,39	5,36	5,36	2,68	18,75								
Jersey	0,00	59,38	0,00	20,83	0,00	19,79								
<i>BB719</i>														
	258	260	264	266	268	276	278	280	282	284	286	288	290	292
Dt. Angus	1,54	2,31	17,69	0,77	0,00	0,77	2,30	3,85	1,54	1,54	52,31	9,23	6,15	0,00
Dt. Fleckvieh	24,40	1,79	33,33	2,38	0,00	0,00	1,78	10,71	0,00	2,98	21,43	0,60	0,00	0,60
Dt. Holstein	6,48	0,00	40,73	0,93	0,93	1,85	5,56	1,85	0,00	1,85	37,96	0,93	0,93	0,00
Jersey	0,00	0,00	18,97	5,17	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	75,86	0,00	0,00	0,00
<i>BB702</i>														
	183	187	189	191	193	195	197	199	203					
Dt. Angus	1,21	1,82	4,85	3,03	83,64	0,00	4,85	0,00	0,60					
Dt. Fleckvieh	1,72	1,72	27,59	0,00	48,28	0,00	19,54	1,15	0,00					
Dt. Holstein	0,00	8,20	9,84	0,00	74,58	0,00	3,28	0,00	4,10					
Jersey	0,00	0,00	0,00	0,00	79,60	5,10	8,16	0,00	7,14					

(Fortsetzung nächste Seite)

Anhang Tabelle B, Fortsetzung

Rasse	Ermittelte Allele und Allelfrequenzen (%)					
<i>BB717</i>						
	158	164	166	168	170	174
Dt. Angus	0,00	91,98	2,47	3,70	1,85	0,00
Dt. Fleckvieh	0,00	98,35	0,55	0,00	1,10	0,00
Dt. Holstein	0,00	90,98	3,28	3,28	2,46	0,00
Jersey	11,25	80,00	0,00	0,00	8,75	0,00
<i>BB705</i>						
	118	120	122	124	126	128
Dt. Angus	87,93	0,43	4,74	6,04	0,00	0,86
Dt. Fleckvieh	59,09	12,12	22,22	0,00	6,06	0,51
Dt. Holstein	87,69	0,00	10,77	1,54	0,00	0,00
Jersey	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

tggatgaattcattgggaatctcagacaggaagggcatgctgaaagggcaggtgggcttcaggagtcagctcc
 caaagtctcctttaattgaatagactagccaaaaccaagcatcctcaaagttcaccattcgrtcttcctctcta
 ggctgtctaacaaccacatcagctccctaggggagaggccctcctgcgggccccttgaaaagaatgacaccattct
 ggaagtctgtaagatcctgggcaggcctctttaacctctctgagcctcagttttccaacgtataacttgaggatga
 agggagagaggaactttagaatttctaagatcccttatggctcagacctctagtcctgcttctgcatgggatgaatc
 tggttccctgggaaaaatgtcttggtgttttaagcagggaccaactgtctcgtttttaattgtggttggttcaga
 aacat

Anhang Abbildung A: Sequenz des 421 bp großen PCR-Produkts zur Darstellung des *CARD15* Exon XI (grau unterlegt) und der flankierenden Sequenzen. Die Position der Primer ist unterstrichen. Fettdruck: SNP an Position E11(-14) (a>g).

DANKSAGUNG

Ich danke Herrn Prof. Dr. Erhardt für die freundliche Überlassung des sehr interessanten Themas und die gewährte konstruktive Kritik während der Anfertigung der Arbeit und der Durchsicht des Manuskripts.

Dr. Steffen Horner vom Tiergesundheitsdienst Thüringen gebührt Dank für die Hilfe bei der Auswahl der Betriebe und die Bereitstellung der Proben und Daten, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Susanne Theis danke ich für ihre Hilfe bei der Datenerfassung.

Besonderer Dank geht an Herrn apl. Prof. Dr. Horst Brandt für die unermüdliche Hilfe bei allen statistischen Fragestellungen und Auswertungen sowie für seine schier unendliche Geduld, wenn meine statistischen Gedankengänge abermals neu sortiert und entwirrt werden mussten.

Bei den Kolleginnen und Kollegen im Projekt Mensch–Ernährung–Umwelt bedanke ich mich für die aufschlussreichen Diskussionen und Anregungen bei den Projekttreffen und Seminartagen und so manchen hilfreichen Hinweis während der Bearbeitung des Themas.

Dr. Eva-Maria Prinzenberg danke ich für die Einführung in die Geheimnisse der Molekulargenetik und die Einarbeitung in die gesamte Thematik. Dr. Gesine Lühken gilt Dank für ihre Anregungen, wenn es im Labor knifflig wurde und die freundliche Unterstützung bei der Untersuchung des Interleukin 2 und anderen wissenschaftlichen Fragestellungen.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeiterinnen des Instituts für Tierzucht und Haustiergenetik für die Zusammenarbeit; ganz besonders jedoch Carina Luft und Stephanie Wack für ihre tatkräftige und zuverlässige Hilfe im Labor sowie Shirin und Daniela für viele interessante fachliche, aber auch persönliche Gespräche, Kekse und ihre unerschütterliche Gelassenheit bei schlechter Laune, wenn die Nerven einmal zu strapaziert waren. Bei Keri möchte ich mich für ihre übersetzerische und stilistische Hilfe bedanken.

Darüber hinaus ein herzliches Dankeschön Dr. Christina Weimann und Dr. Christina Lauer für die Durchsicht des Manuskripts.

Dank geht auch an meine Ziegen und Hunde, die sich nur selten nach dem Fortgang der Arbeit erkundigt und gerade dadurch zu ihrer Fertigstellung beigetragen haben.

Andreas, einfach Danke für Deine stetige Unterstützung und Motivation und dass Du für mich da bist.

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 Teststellen, 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.



edition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

ISBN 3-8359-5397-4

Tel: 0641-559888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

